

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE

**INFERÊNCIAS EVOLUTIVAS E IMPLICAÇÕES
BIOMÉTRICAS EM *Austropuccinia psidii* (G. Winter)**

Beenken 2017

TESE

RENAN MARCELO PORTELA

IRATI-PR

2023

RENAN MARCELO PORTELA

INFERÊNCIAS EVOLUTIVAS E IMPLICAÇÕES BIOMÉTRICAS EM
Austropuccinia psidii (G. Winter) Beenken 2017

Tese apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais para obtenção do título de Doutor em Ciências Florestais.

Prof. Dr. Flávio A. Oliveira Garcia
Orientador

Prof. Dr. Evandro Vagner Tambarussi
Coorientador

Prof. Dr. Silvio Carolo Junior
Coorientador

IRATI-PR

2023

Catálogo na Publicação
Rede de Bibliotecas da UNICENTRO

P843i Portela, Renan Marcelo
Inferências evolutivas e implicações biométricas em *Austropuccinia psidii* (G. Winter) Beenken 2017 / Renan Marcelo Portela. – Irati, 2023.
xiii, 70 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, 2023.

Orientador: Flávio A. Oliveira Garcia
Coorientador: Evandro Vagner Tambarussi
Coorientador: Silvio Carolo Junior
Banca examinadora: Flávio A. Oliveira Garcia, Evandro Vagner Tambarussi, Silvio Carolo Junior, Caio César Salgado, Regiane Abjaud Estopa

Bibliografia

1. Plantios florestais – produtividade. 2. Patógenos. 3. Ferrugem – eucalipto. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais.

CDD 634.9

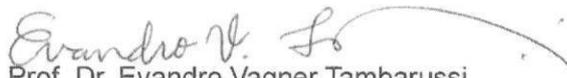
TERMO DE APROVAÇÃO

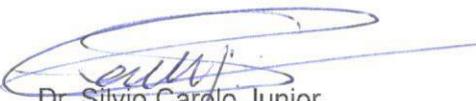
Defesa Nº 37

Renan Marcelo Portela

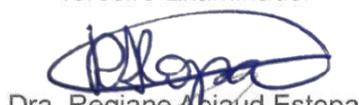
"INFERÊNCIAS EVOLUTIVAS E IMPLICAÇÕES BIOMÉTRICAS EM *Austropuccinia psidii* (G. Winter) Beenken 2017"

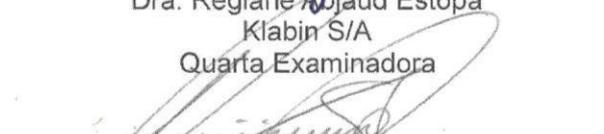
Tese aprovada em 17/02/2023, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, área de concentração em Manejo Sustentável de Recursos Florestais, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela seguinte Banca Examinadora:


Prof. Dr. Evandro Vagner Tambarussi
Universidade Estadual do Centro-Oeste
Primeiro Examinador


Dr. Silvio Carolo Junior
Reflorasul Agroflorestal S/A
Segundo Examinador


Dr. Caio César Salgado
Klabin S/A
Terceiro Examinador


Dra. Regiane Abojaud Estopa
Klabin S/A
Quarta Examinadora


Prof. Dr. Flavio Augusto de Oliveira Garcia
Universidade Estadual do Centro-Oeste
Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Irati – PR
2023

Home Page: <http://www.unicentro.br>

Campus Santa Cruz: Rua Salvatore Renna – Padre Salvador, 875, Bairro Santa Cruz – Cx. Postal 3010 – Fone: (42) 3621-1000 – FAX: (42) 3621-1090
CEP 85.015-430 – GUARAPUAVA – PR

Campus Cedeteg: Alameda Élio Antonio Dalla Vecchia, 838, Bairro Vila Carli – Fone: (42) 3629-8100 – CEP 85.040-167 – GUARAPUAVA – PR

Campus de Irati: Rua Professora Maria Roza Zanon de Almeida, Bairro Engenheiro Gutierrez – Cx. Postal, 21 – Fone: (42) 3421-3000
CEP 84.505-677 – IRATI – PR

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, em especial para minha querida avó Daluz, pela educação, ensinamentos e todos os momentos que ela me proporcionou, do meu nascimento até agora.

Aos meus pais, Valquíria e Celso, por sempre me apoiarem e incentivarem, pelos sacrifícios feitos para viabilizar minha formação acadêmica.

Ao meu orientador, Professor Flavio, por todas as oportunidades, orientações, aulas, incentivos, amizade, paciência e por sempre acreditar no meu trabalho e capacidade, mesmo em momentos que nem eu acreditei.

Aos meus co-orientadores, Prof. Evandro Tambarussi e Silvio Carolo, agradeço imensamente pela amizade, orientações, conselhos e por todo conhecimento compartilhado, além das oportunidades de desenvolver e expandir meus horizontes acadêmicos.

Aos meus colegas e amigos da Pesquisa Florestal, Aline, Leticia, Caio, Regiane, Fabrício, Mariane, James, Marco Figura, Marina, Paula, Bruno, Carlos e João Gabriel por todo o apoio, aprendizado e amizade.

Aos meus amigos da Unicentro, do PPGF e da turma XVIII de Psicologia, pelos momentos de descontração, amizade e apoio.

As amizades e parcerias que fiz nesses incríveis anos de aprendizado.

Aos meus amigos de Rebouças, Jonh, Eder, Bruno, Mifrinho, Tâbes e aos “piá da catequese”, pela força e pelos momentos de felicidade e companheirismo que me propiciaram. Agradeço ao João F, João de Lara, Caio, Lorhan, Ingryd, George, Gisele, Yamuna, Bruno, Renato, Luizito, Matheus.

Aos professores que passaram por minha formação, desde a base até agora, minha eterna gratidão.

A Unicentro, a Silvana do PPGF, além de todos os funcionários que tive oportunidade de conviver nesse período.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa, e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001”.

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese a todos os meus Professores,
meus grandes mestres.

Por qualquer caminho que eu traçar na vida,
sempre lembrarei dos excelentes guias
que tive.

EPÍGRAFE

Não considere nenhuma prática como imutável.

Mude e esteja pronto a mudar novamente.

Não aceite verdade eterna. Experimente.

(Skinner, B.F. 1948)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Locais de amostragem de isolados *Austropuccinia psidii* associados a família Myrtaceae no Brasil e Uruguai. Às espécies são *Eucalyptus* spp., *Eugenia uniflora*, *Myrciaria cauliflora*, *Psidium guajava*, *Psidium guineense*, *Syzygium jambos*, *Syzygium cumini*. 31
- Figura 2.: Esquema gráficos dos seis modelos genético-populacionais de fluxo gênico propostos pelo autor e testados no software Migrate-N. 33
- Figura 3: Estimativas do número efetivo de migrantes por geração (N_{mji}), obtidas considerando os isolados de quatro subpopulações de *A. psidii* associados as sete espécies hospedeiras da família Myrtaceae no Brasil e Uruguai, para os dez loci microssatélites utilizados..... 39
- Figura 4: Padrões alélicos entre subpopulações de *A. psidii* com base em 10 loci microssatélites. Sendo número médio de alelos diferentes (N_a), número médio de alelos efetivos (N_e), número médio de alelos privados (N_o . de alelos privados) e heterozigosidade esperada (H_e) para os quatro grupos populacionais considerados no trabalho. Sendo SPOP1 (*Eucalyptus* spp. + *S. jambos*), SPOP2 (*P. guajava* + *P. guineense*), SPOP3 (*S. cumini*) e SPOP4 (*M. cauliflora* e *E. uniflora*)..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos <i>loci</i> amplificados pela PCR , com os respectivos <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> , bem como o n° de acesso no GenBank, a indicação do motivo da sequência e o tamanho em pares de base da sequência amplificada dos dez microssatélites usados para estimar o tamanho efetivo e o fluxo gênico no presente trabalho adaptado de Zhong et al., (2008) e Graça et al. (2013).....	32
Tabela 2: Estimativas das taxas de migração, escalonadas pela taxa de mutação (M_{ij}), considerando isolados <i>A. psidii</i> associados as sete espécies hospedeiras da família Myrtaceae no Brasil e Uruguai, para a média dos dez loci microssatélites utilizados. Sendo na primeira coluna as populações migrantes e nas demais colunas as populações de estabelecimento dos migrantes.	39
Tabela 3: Número efetivo de migrantes por geração (N_{imji}), estimado para as subpopulações de <i>A. psidii</i> associada as espécies hospedeiras da família Myrtaceae no Brasil e Uruguai, e considerando o intervalo de confiança de 95%.	41
Tabela 4: Estimativas de tamanho efetivo populacional e ($\Theta_i=4N_e\mu$) para as subpopulações de <i>A. psidii</i> associada as espécies hospedeiras da família Myrtaceae no Brasil e Uruguai, e considerando o intervalo de confiança de 95%.	41
Tabela 5: Análise de variância molecular (AMOVA) obtidas para a espécie <i>A. psidii</i> considerando a estrutura hierárquica utilizando dez loci microssatélites utilizados na pesquisa.	42
Tabela 6: Valores de F_{ST} abaixo da diagonal. Valores de probabilidade com base em 9999 permutações é mostrada acima da diagonal.	44

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos Específicos	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1. <i>Austropuccinia psidii</i> : Considerações no estudo genético-populacional.....	18
3.2. Marcadores genéticos e suas aplicações	22
3.3. Diversidade Genética no contexto de doenças de plantas	24
3.4. Genética de Populações e Teoria da Coalescência	25
3.5. Tamanho efetivo populacional e Fluxo gênico.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Origem dos dados utilizados.....	32
4.2. Estimativas de Fluxo gênico e Tamanho efetivo via coalescência.....	34
4.3. Diversidade genética e estrutura populacional	39
5. RESULTADOS	40
5.1. Estimativas de Fluxo gênico e Tamanho efetivo via coalescência.....	40
5.2. Diversidade genética e estrutura populacional	44
6. DISCUSSÃO.....	47
6.1. Estimativas de Fluxo gênico e tamanho efetivo via coalescência	47
6.2. Diversidade genética e estrutura populacional	54
7. CONCLUSÃO.....	56
8. REFERÊNCIAS	57

RESUMO

A atividade de base florestal desempenha um importante papel socioeconômico no país. Atualmente, o Brasil é líder no ranque de produtividade em plantios florestais, entretanto, esta vem sendo afetada pelos ataques constantes de patógenos que ocasionam danos econômicos a esses cultivos. Um exemplo é a ferrugem em *Eucalyptus* spp., causada por *Austropuccinia psidii* (G. Winter) Beenken, que possui ampla distribuição geográfica e o patógeno apresenta grande variabilidade genética entre as suas populações, atacando também outras espécies da família Myrtaceae. Nesse sentido, buscou-se estudar aspectos genéticos-populacionais e evolucionários de populações de *A. psidii*. A base de dados foi obtida na plataforma DRYAD sob a licença CC0 1.0. Esses dados referem-se a *loci* microssatélites de isolados de *A. psidii*, obtidos a partir de isolados fúngicos advindos de amostra de 148 plantas, das quais originaram esses marcadores depositados no DRYAD. O modelo usado nas estimativas foi de quatro subpopulações de *A. psidii* agrupadas com base em sete hospedeiros da família Myrtaceae, sendo SPOP1 (*Eucalyptus* spp. + *Syzygium jambos*), SPOP2 (*Psidium guajava* + *Psidium guineense*), SPOP3 (*Syzygium cumini*) e SPOP4 (*Myrciaria cauliflora* e *Eugenia uniflora*). Essas subpopulações foram formadas com coletas feitas pelos autores do depósito dos dados nos estados da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Rio Grande do Sul, além do Uruguai. Também estimou o tamanho efetivo e fluxo gênico entre as subpopulações, por meio do método de inferência bayesiana, baseado na teoria de coalescência implementada no *software* MIGRATE-N. Além de estatísticas descritivas e gráficos dos padrões alélicos populacionais, realizou estimativas pareadas de F_{ST} e diferenciação intra e intergrupos por análise de variância molecular (AMOVA) considerando os grupos genéticos de quatro subpopulações e os sete hospedeiros de maneira hierárquica. O fluxo gênico (Nm) entre os pares de populações foram baixos (todos < 1 unidade), e variou de 0,04 a 0,67. As estimativas do tamanho efetivo populacional (N_e) foram 119, 111, 189 e 1315 para SPOP1, SPOP2, SPOP3 e SPOP4, respectivamente. A AMOVA mostrou que a porcentagem da variação foi de 39,43% entre as subpopulações, 16,29% entre os hospedeiros dentro de subpopulação e 44,28% dentro dos hospedeiros. Os análogos de F_{ST} foram de $\Phi_{CT} = 0,394$ (Entre Subpopulações); $\Phi_{SC} = 0,269$ (Entre Hospedeiros dentro de Subpopulação); $\Phi_{ST} = 0,556$ (Dentro dos Hospedeiros), além de altos valores pareados de F_{ST} que variaram entre 0,355 e 0,560. Os resultados obtidos agregam conhecimento acerca da compreensão da genética de populações de *A. psidii*, propondo cenários plausíveis em relação ao passado evolutivo e demográfico, bem como os processos que deram origem a variabilidade observadas. Possivelmente as subpopulações de *A. psidii* terão diferentes comportamentos ecológicos e representar ameaças invasivas distintas, sendo indicado estudos que possam mensurar os riscos invasivos apresentados pelas diferentes subpopulações. O trabalho ressalta a evidente importância da conservação genética de maneira adequada em espécies florestais comerciais, visando garantir a existência genótipos de plantas resistentes para serem usados em programas de melhoramento, considerando que a resistência será suplantada ou reduzida pelo surgimento de novas raças de *A. psidii* capazes de se adaptarem às defesas presente nos genótipos atualmente cultivados.

ABSTRACT

Forest-based activity plays an important socioeconomic role in the country. Currently, Brazil is the leader in the rank of forest productivity, however, this high productivity has been affected by the constant attacks of pathogens that cause economic damage to these crops, an example is the myrtle rust caused by *Austropuccinia psidii* (G. Winter) Beenken, which has a wide geographic distribution and presents great genetic variability among its populations, attacking several species of the Myrtaceae family. In this sense, we sought to study population-genetic and evolutionary aspects of *A. psidii* populations. These data were about microsatellite loci for obtaining *A. psidii* isolates in about 148 populations of plants, from which they originated and deposited in DRYAD. The model used in the estimates was of four subpopulations of *A. psidii* grouped based on seven hosts of the Myrtaceae family, being SPOP1 (*Eucalyptus* spp. + *S. jambos*), SPOP2 (*P. guajava* + *P. guineense*), SPOP3 (*S. cumini*) and SPOP4 (*M. cauliflora* and *E. uniflora*). These populations were formed from collections carried out by the authors of the deposits in the states of Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Rio Grande do Sul, in addition to Uruguay. Effective size and gene flow were estimated using the Bayesian inference method, based on the coalescence theory implemented in the MIGRATE-N software. In addition to descriptive statistics and graphs of population allelic patterns, paired estimates of F_{ST} and intra and intergroup differentiation by analysis of molecular variance (AMOVA) considering the genetic groups of four subpopulations and the seven hosts in a hierarchical manner. Gene flow (Nm) between population pairs was low (all < 1 unit), and ranged from 0.04 to 0.67. Estimates of effective population size (N_{and}) were 119, 111, 189 and 1315 for SPOP1, SPOP2, SPOP3 and SPOP4 respectively. AMOVA showed that the percentage of variation was 39.43% between subpopulations, 16.29% between hosts within subpopulations and 44.28% within hosts. F_{ST} analogues were $\Phi_{CT} = 0.394$ (Among Subpopulations); $\Phi_{SC} = 0.269$ (Among Hosts within Subpopulation); $\Phi_{ST} = 0.556$ (Within the Hosts), in addition to high paired F_{ST} values that ranged between 0.355 and 0.560. The results obtained add knowledge about the understanding of *A. psidii* population genetics, proposing plausible scenarios in relation to the evolutionary and demographic past, as well as the processes that gave rise to the observed variability. Possibly the subpopulations of *A. psidii* will have different ecological behaviors and represent different invasive threats, being indicated studies that can measure the invasive risks presented by the different subpopulations. The work emphasizes the evident importance of genetic conservation in an adequate way in commercial species, aiming to guarantee the existence of resistant plant genotypes to be used in breeding programs, considering that resistance will be supplanted or reduced by the emergence of new races of *A. psidii* capable of adapting to the defenses present in the genotypes currently cultivated.

1. INTRODUÇÃO

A silvicultura brasileira é um dos importantes geradores de receita para o PIB nacional. O setor é responsável por um significativo número de empregos e indiretamente responde também pela atividade fabril das indústrias que processam os produtos madeireiros e não-madeireiros. Como reflexo disto, ocorreu entre 2010 e 2020, expansão dos plantios florestais, principalmente de eucalipto, com cerca de 6,97 milhões de hectares, representando 77 % (IBÁ, 2020).

Em 2022, o Brasil é líder no ranque de produtividade de plantios florestais mundiais. Atribui-se em razão de suas características edafoclimáticas e do desenvolvimento tecnológico obtido na área de silvicultura, sendo que produtividade média dos plantios brasileiros de eucalipto são de $35,3 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$, mais que o dobro produzido nos anos 70 (IBÁ, 2020).

As técnicas que permitem a alta produtividade, sobretudo, associado aos plantios de eucalipto acabam tornando estas florestas suscetíveis a fitopatógenos. Isto implica na ocorrência de epidemias de doenças nos plantios (FERREIRA e MILANI, 2002). Nesse sentido, a alta produtividade vem sendo afetada por constantes ataques de patógenos que ocasionam danos econômicos a esses cultivos, um exemplo é a ferrugem-das-mirtáceas, causada pelo fungo *Austropuccinia psidii* (G. Winter) Beenken 2017 (sin. *Puccinia psidii*) (ALFENAS et al., 2009).

No Brasil, a ferrugem-das-mirtáceas é uma das doenças mais importantes para a cultura do eucalipto (FERREIRA, 1989; ALFENAS et al., 2009) ocasionando severos danos aos plantios (COUTINHO et al., 1998; PÉREZ et al., 2011; MIRANDA et al., 2013). As perdas são maiores em localidades com variáveis ambientais favoráveis ao patógeno como ocorrem em sítios do sul e sudeste brasileiro (GALLI, 1980; PIZA e RIBEIRO, 1988).

Além de eucalipto, o fungo *A. psidii* é patogênico a várias espécies botânicas de importância econômica da família Myrtaceae, como *Eugenia stipitata* MacVaugh (araçá-boi), *Psidium cattleianum* Sabine (araçá), *Psidium guajava* Linn. (goiaba), *Syzygium jambos* L. (jambo), *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (jabuticaba), *Eugenia uniflora* L. (pitanga), *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel (melaleuca), *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (cambucá), *Eugenia pyriformis* Cambess. (uvaia) entre mais de 70 outras espécies documentadas como hospedeiros do fungo (COUTINHO et al. 1998;

FERREIRA, 1989; GALLI, 1980; JOFFILY, 1944; RAYACHHETRY et al. 2001; SILVEIRA, 1951; SIMPSON et al. 2006; SOUZA, 1985).

A. psidii é um parasita biotrófico, caracterizando-se como autoécio e microcíclica. Pertence ao filo basideomycota, classe Pucciniomycetes, ordem Pucciniales, subordem Uredinarieae, família Sphaerophragmiaceae e gênero *Austropuccinia*. É originário da América do Sul, descrito inicialmente no Brasil. Entretanto, vem sendo relatado em diversas partes do mundo, como África, Ásia, Oceania, Américas Central e do Norte, Ilhas do Caribe e do Pacífico (MOON et al., 2012).

O processo de infecção é altamente influenciado pelas condições ambientais (FURTADO et al., 2009). A penetração do patógeno ocorre em brotações novas e/ou juvenis do hospedeiro, em tecidos jovens e tenros, como folhas, ramos, inflorescências e gemas, sendo observado tanto em plantas adultas no campo, como em mudas no viveiro (FERREIRA, 1989; FURTADO et al., 2009).

O complexo sintomatológico inicia-se com pontuações cloróticas que se transformam em pústulas contendo em seu interior esporulação de cor amarelo vivo. Estas pústulas podem coalescer, recobrando a superfície das brotações do ramo, quando o ataque é intenso. Em consequência, os tecidos afetados necrosam, adquirindo coloração que varia de parda a negra. Após infectadas, as plantas ainda podem formar novas folhas e ramos, substituindo os tecidos necrosados. Todavia, estes também poderão ser infectados se esta nova formação ocorrer em período com ambiente favorável ao patógeno por meio de reinfecção (FERREIRA e MILANI, 2002).

Dependendo da incidência e da severidade da epidemia, poderá haver redução na produtividade em plantios e aumento dos custos de produção, quando houver necessidade de controle (FURTADO et al., 2009). Em áreas ambientalmente favoráveis, a ferrugem é uma condição limitante para a cadeia produtiva, principalmente às atividades de talhadia e reforma (SILVA et al., 2015).

Atualmente, o controle de *A. psidii* é feito prioritariamente pela seleção e plantio de materiais resistentes (ALFENAS et al., 2009; FURTADO et al., 2009). Também há o plantio de materiais suscetíveis, nesse caso o controle é pelo escape, com a atividade realizada em épocas e locais desfavoráveis ao patógeno. Isto se deve à grande variabilidade genética intra e interespecífica de *Eucalyptus* spp., em relação à ferrugem (DIANESE et al. 1984, CARVALHO et al. 1998, TOMMERUP et al., 2003, BERTONCINI et al. 2017). É possível o controle químico eficiente em casos de ataques intensos em viveiro (FERREIRA e MILANI, 2002), além de ser uma alternativa viável

em condições de plantio em árvores jovens com idade entre seis meses e um ano de idade (AUER et al., 2010; MASSON et al., 2011).

No que concerne à resistência, descreve-se uma família específica de *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden, em que a resistência à ferrugem é controlada por um único gene, o *Ppr-1* (gene de resistência 1 de *Puccinia psidii*), com expressão variável dependendo do *background* genético do hospedeiro (JUNGHANS et al., 2003).

Tendo-se então nesse caso específico, uma resistência raça específica ou vertical para a doença, mudanças na estrutura populacional do patógeno é um risco iminente na suplantação dessa resistência (GRAÇA et al., 2011). É uma possibilidade preocupante para a setor florestal brasileiro, pois os urediniósporos, esporos reprodutivos e de dispersão do patógeno, podem ser dispersos por longas distâncias e têm grande capacidade de formar novas populações. Este fato é observado em outros fungos causadores de ferrugens, como na do cafeeiro em que se assume que os urediniósporos vieram do continente africano para o Brasil (FERNANDES; EVANS; BARRETO, 2009). Assim, considerando a possibilidade que *A. psidii* tenha alta variabilidade genética e consequentemente alto potencial evolutivo, o que seria um desastre para a silvicultura nacional.

Diversos estudos mostram a existência de variabilidade fisiológica e genética entre populações de *A. psidii* (MARLATT; KIMBROUGH, 1980; FERREIRA, 1983; CASTRO et al., 1983; 1984; COELHO et al., 2001; APARECIDO et al., 2003; ZHONG et al., 2011). No entanto, a maioria dos métodos utilizados para estudar a diversidade do fungo, são baseados em caracteres fenotípicos ou apenas nas frequências dos alelos para compreender os níveis de diferenciação. Considerando que isso possa retratar eventos de fluxo gênico recentes, por vezes, não considerando os eventos migratórios que aconteceram no passado (WILSON e RANNALA, 2003). Podendo dificultar o entendimento das relações do passado evolutivo das populações de *A. psidii* e mesmo da coevolução destas com as plantas e demais biota associada.

Também deve-se levar em consideração que, a partir dessa estimativa torna-se possível inferir a magnitude das relações históricas entre as populações (ROSA, 2016). Uma visão genealógica do fluxo gênico e estrutura populacional é de grande valia para nortear as estratégias de seleção visando a resistência a doenças e do manejo da doença em geral. A falta de informação sobre a origem e variação genética da população de patógenos pode ainda prejudicar as medidas de controle adotadas (ZHONG et al., 2011).

A teoria da coalescência usa de modelos retrospectivos que se baseiam nas genealogias dos alelos, buscando seguir a trilha dos alelos de um gene, que é compartilhado entre os indivíduos de uma população no momento atual até uma única cópia ancestral, conhecida como ancestral ou alelo comum mais recente (ACMR). Levando em consideração processos evolutivos importantes, como mutação e fluxo gênico. Esse método é tido por diversos cientistas como mais popular (MARJORAM e TAVARÉ, 2006) e moderna (PALCZEWSKI e BEERLI, 2013) abordagem nos estudos genéticos-populacionais, revolucionando o entendimento sobre os processos do passado histórico-evolutivo envolvidos (HOLSINGER e WEIR, 2009).

Questões a serem elucidadas com essa pesquisa:

- As amostras de *A. psidii* estão estruturadas geograficamente ou de acordo com o hospedeiro?
- Ocorre fluxos gênicos entre as amostras coletadas geograficamente próximas?
- Quais são as magnitudes do fluxo gênico? Como isso afeta as subpopulações?
- Quais são as implicações ligadas à fitopatologia?

Hipótese de trabalho:

- O modelo panmítico é o que melhor estima o fluxo gênico e tamanho efetivo populacional, relacionados a gama de hospedeiros dos isolados de *A. psidii*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Estudar os aspectos genéticos e evolucionários de populações de *A. psidii* oriundas de sete espécies de mirtáceas, usando uma abordagem baseada na teoria da coalescência para estimativa dos parâmetros.

2.2. Objetivos Específicos

- Demonstrar que as populações de *A. psidii* dividem-se em subpopulações estruturadas de acordo com o hospedeiro;
- Estimar índices de diversidade em populações de *A. psidii* e inferir sobre a estrutura genética nas subpopulações de estudo;
- Estimar tamanho efetivo populacional e fluxo gênico entre as subpopulações com base na teoria da coalescência;
- Concluir sobre a ocorrência do fluxo gênico entre as subpopulações.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nessa revisão são abordados tópicos relativos à patologia florestal no Brasil, englobando brevemente os aspectos de históricos e sua importância; É abordado os principais assuntos ligados ao estudo da *A. psidii*, englobando características biológicas, taxonômicas, geográficas e ecológicas, além dos aspectos fitopatológicos da doença no gênero *Eucalyptus*; É discutido brevemente sobre os marcadores genéticos em geral, havendo ênfase nos microssatélites e suas características principais; Em seguida é discorrido sobre diversidade genética no contexto de doenças de plantas, a importância do estudo e da compreensão do tema, bem como as implicações; Aborda-se ainda sobre genética de populações e a teoria da coalescência, mostrando informações referentes ao surgimento dos estudos, objetivos e o interesses da genética de populações como disciplina, sua importância, citando metodologias usuais utilizadas nas estimativas dos parâmetros, apresentando noções básicas acerca da teoria da coalescência, particularidades do desenvolvimento e uso da teoria; Por último, é discutido brevemente sobre o tamanho efetivo populacional e o fluxo gênico, abordando aspectos conceituais, históricos e importância dos parâmetros, além dos métodos usuais de estimativas de tais parâmetros.

3.1. *Austropuccinia psidii*: Considerações no estudo genético-populacional

O agente causal da ferrugem-das-mirtáceas, *A. psidii* (sin. = *Puccinia psidii*) classifica-se no reino Fungi, filo Basidiomycota, classe Pucciniomycetes, ordem

Pucciniales, família Sphaerophragmiaceae, gênero *Autropuccinia*, espécie *A. psidii* Sphaerophragmiaceae (BEENKEN, 2017).

A ordem Pucciniales é cosmopolita, possui mais de 7.800 espécies catalogadas e distribuídas no mundo todo, havendo uma vasta gama de plantas hospedeiras (AINSWORTH, 2008). Essas espécies causam doenças conhecidas por “ferrugens”, denominação originada da ferrugem do trigo causada por *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* Eriksson & Henning, que a sintomatologia apresenta cor muito similar à ferrugem de metais (SALAZAR e CARVALHO JÚNIOR, 2010).

A espécie *A. psidii* é considerada originada da América do Sul (GLEN et al., 2007), sendo descrita pela primeira vez infectando *P. guajava* (goiaba) no Brasil (WINTER, 1884).

No Brasil, a ferrugem das mirtáceas é uma das doenças mais importantes para a cultura do eucalipto (FERREIRA, 1989; ALFENAS et al., 2009) ocasionando severos danos às plantações (COUTINHO et al., 1998; PÉREZ et al., 2011; MIRANDA et al., 2013). Constitui-se um sério problema principalmente quando as condições ambientais são favoráveis (GALLI, 1980; PIZA e RIBEIRO, 1988).

Além de eucalipto, *A. psidii* é patogênica à várias espécies botânicas de importância econômica da família Myrtaceae, como *E. stipitata* (araçá-boi), *P. cattleianum* (araçá), *P. guajava* (goiaba), *S. jambos* (jambo), *P. cauliflora* (jabuticaba), *E. uniflora* (pitanga), *M. alternifolia* (melaleuca), *P. edulis* (cambucá), *E. pyriformis* (uvaia) entre mais de 70 outras espécies documentadas como hospedeiros do fungo (COUTINHO et al. 1998; FERREIRA, 1989; GALLI, 1980; JOFFILY, 1944; RAYACHHETRY et al. 2001; SILVEIRA, 1951; SIMPSON et al. 2006; SOUZA, 1985).

A distribuição de *A. psidii* engloba os continentes da África, Ásia, Oceania, Américas Central e do Norte, Ilhas do Caribe e do Pacífico (MOON et al., 2012), com diversos ataques registrados na literatura, citando-se os países da África do Sul, Alemanha, Argentina, Austrália, Bélgica, China, Colômbia, Canadá, Equador, Estados Unidos, França, Indonésia, Japão, Jamaica, Nova Caledônia, Porto Rico, Paraguai, Portugal, República Dominicana, Uruguai, Trindade e Tobago, Venezuela entre outros (COUTINHO et al., 1998; CARNEGIE et al., 2010; GIBLIN, 2013; ROUX et al., 2013; MORIN et al., 2014; MACHADO et al., 2015; MCTAGGART et al., 2016).

No Brasil o patógeno tem ampla distribuição geográfica, principalmente nos estados da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul, podendo causar danos

consideráveis dependendo manejo silvicultural e dos materiais genéticos utilizados (SANTOS et al., 2001; ALFENAS et al., 2009; GRAÇA et al. 2013).

O ciclo parasitário das ferrugens é subdividido didaticamente em cinco fases, sendo denominado de uma ferrugem macrocíclica (COUTINHO et al., 1998) e quando uma dessas fases não ocorre, é chamada microcíclica. Segundo Figueiredo e Passador (2008), ciclos da ferrugem descrevem-se como (0, espermogônio e espermácias; I, écios e eciósporos; II, uredínios e urediniósporos; III, télio e teliósporos “probasídio”; IV, basídio “metabasídios” e basidiósporos). Os ciclos que ocorrem em um único hospedeiro são chamados (autoécio) ou se ocorrer através de dois hospedeiros filogeneticamente distintos (heteroécio). No caso da *A. psidii*, seu ciclo de vida é atípico comparado às outras espécies de ferrugens, e vem sendo considerada uma ferrugem autoécia e microcíclica com ciclo incompleto com a ausência do estágio de espermagônio (pícnio) e sem hospedeiro alternativo para ocorrência desse estágio (HENNEN et al., 2005; MORIN et al., 2014). Porém, não se descarta a possibilidade de que ocorra a fase de espermogônio, mas até então a mesma não foi demonstrada e/ou descrita.

A infecção é altamente influenciada pelas condições ambientais (FURTADO et al., 2009), e ocorre no início das brotações do hospedeiro, com o patógeno atacando tecidos jovens e tenros, como folhas, inflorescências e gemas, sendo observado tanto em plantas adultas no campo, como em mudas na fase de viveiro (FERREIRA, 1989; FURTADO et al., 2009).

Após a infecção, o quadro sintomatológico inicia-se com pontuações cloróticas que se transformam em pústulas contendo em seu interior esporulação de cor amarelo vivo. Estas pústulas podem coalescer, recobrando a superfície das brotações do ramo, quando o ataque é intenso. Em consequência, os tecidos afetados necrosam, adquirindo coloração negra, como se fossem queimados. Depois de infectadas, as plantas ainda podem formar novas folhas e ramos após a seca das pústulas, deste modo, a incidência da doença resultará na redução da produtividade em plantios e aumento dos custos de produção, quando houver necessidade do uso de algumas medidas de manejo (FURTADO et al., 2009). Em áreas ambientalmente favoráveis a doença, ela apresenta-se como condição limitante para o processo de regeneração e desenvolvimento das plantas de eucalipto (SILVA et al., 2015).

Em espécies do gênero *Eucalyptus*, o controle da *A. psidii* é feito principalmente pela seleção e plantio de materiais genéticos resistentes (ALFENAS et al., 2009;

FURTADO et al., 2009), além do plantio de materiais suscetíveis em épocas e locais desfavoráveis à doença (visando escape).

A grande variabilidade genética intra e interespecífica para resistência à ferrugem de *Eucalyptus* spp. permitiu em alguns locais o controle da doença por meio da seleção para resistência (CARVALHO et al. 1998, DIANESE et al. 1984, TOMMERUP et al. 2003). Entretanto, demonstrou, em uma família particular de *E. grandis*, que a resistência à ferrugem é controlada por um único gene principal, o *Ppr-1* (gene de resistência 1 de *Puccinia psidii*), com expressão variável dependendo do *background* genético do hospedeiro (JUNGHANS et al., 2003). Considerando esse padrão genético, mudanças na estrutura populacional do patógeno poderiam ser o suficiente para suplantarem esse gene de resistência (GRAÇA et al., 2011), o que é preocupante para o setor florestal brasileiro, pois os uredinósporos, estrutura dispersiva e reprodutiva do patógeno, são facilmente dispersos por longas distâncias e têm grande capacidade de formar populações, como observado com outras ferrugens, considerando possível que *A. psidii* tenha alta variabilidade genética e conseqüentemente alto potencial evolutivo.

Diversos estudos mostram a existência de variabilidade fisiológica e genética entre populações de *A. psidii* (MARLATT; KIMBROUGH, 1980; FERREIRA, 1983; CASTRO et al., 1983; 1984; COELHO et al., 2001; APARECIDO et al., 2003; ZHONG et al., 2011).

No entanto, a maioria dos métodos utilizados para estudar a diversidade *A. psidii* até o momento são baseados em caracteres fenotípicos, ou apenas nas frequências dos alelos para compreender os níveis de diferenciação, considerando que isso possa retratar eventos de fluxo gênico recentes, por vezes, não considerando os eventos migratórios que aconteceram no passado (WILSON e RANNALA, 2003). Podendo dificultar o entendimento das relações do passado co-evolutivo e evolutivo das populações de *A. psidii*.

O passado evolutivo da *A. psidii* ainda não é conclusivo, pesquisadores buscam explicações concretas que possam elucidar como o patógeno foi capaz de infectar hospedeiros do gênero *Eucalyptus* em tempo evolutivamente curto, visto que se trata de uma espécie exótica introduzida, com relatos da doença descritos já em 1912 e comprovados em 1944 (JOFFILY, 1944). Uma das hipóteses mais aceitas é a de *host jump*, onde partem de um processo onde há um “salto” do patógeno entre hospedeiros taxonomicamente distantes (STUKENBROCK e MCDONALD, 2008). A princípio

achavam ser possível que a *A. psidii* se deslocou da *P. guajava* para o gênero *Eucalyptus*, hipótese rejeitada por Graça et al. (2013).

3.2. Marcadores genéticos e suas aplicações

Os marcadores genéticos podem ser divididos em marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Os marcadores morfológicos são baseados em características fenotípicas, geralmente de fácil visualização e com mecanismos de herança mendeliana, que podem ser utilizados para avaliar diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos. Foram o primeiro tipo de marcador genético utilizado, sendo a base para o melhoramento convencional em caracteres discretos, de modo que as características fenotípicas desejáveis são selecionadas nos genitores.

Há diversas aplicações para esse tipo de marcador, citando-se a identificação de genótipos, caracterização da variabilidade, diferenciação entre acessos, agrupamentos (SOUZA e SORRELLS, 1991; ZHONG-HU, 1991), de maneira menos eficiente, em mapas de ligação genética para várias espécies (COE e NEUFFER, 1993; HART et al., 1993) entre outras aplicações. Esses estudos baseiam-se na pressuposição de que similaridade morfológica retrata a similaridade genética.

Entretanto, diversas limitações são associadas a marcadores morfológicos (PATERSON et al., 1991; BORÉM e MIRANDA, 2017). O número reduzido de características para se usar; acentuado efeito de genes determinantes pode afetar a análise genética para caracteres de importância; um número reduzido de caracteres pode ser estudado simultaneamente devido aos efeitos de interações gênicas; O resultado da interação decorrente dos genes com ambiente irá alterar a expressão do fenótipo, refletindo na análise (HARTL e CLARK, 2010).

Devido aos avanços tecnológicos obtidos, por volta da década de 1950, surgiram outro grupo de marcadores genéticos, os chamados marcadores bioquímicos, citando-se os terpenos, as proteínas (isoenzimas e aloenzimas) (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

As primeiras moléculas a serem empregadas como marcadores genéticos bioquímicos foram metabólitos secundários, como antocianinas e compostos fenólicos, usados para diferenciar variedades de espécies vegetais (GROVER e SHARMA, 2016). Logo após, os marcadores enzimáticos, os quais foram muito importantes, entretanto,

apesar de detectar um baixo grau de polimorfismo, foram utilizados em diversos estudos como análises filogenéticas, acesso da variabilidade genética, identificação de acessos e de forma mais limitada na associação de características de interesse (BORÉM e MIRANDA, 2017), além de servir de base para teorias evolutivas, citando-se principalmente a teoria neutralista da evolução e a teoria quase neutra da evolução (KIMURA, 1968; KIMURA e OHTA, 1974; OHTA e GILLESPIE, 1996).

É importante ressaltar que a base desse tipo de marcador vem das modificações pós-tradução das enzimas, podendo produzir “proteínas conformacionais”, ocasionando polimorfismos em resposta a condições ambientais, diferenças nas atividades enzimáticas, podendo haver alterações associadas a diferentes de desenvolvimento, além de ter uma reduzida cobertura do genoma (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores bioquímicos perderam popularidade anos depois, devido surgimento das técnicas de marcadores moleculares, com foco no DNA, com capacidade de detectar maiores polimorfismos, possibilitando a análise do genótipo, sem a necessidade de ter ocorrido a expressão fenotípica, excluindo a influência do ambiente no polimorfismo, com uma amostragem mais ampla do genoma, pois os marcadores bioquímicos amostram apenas as regiões ativas na expressão gênica (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

Nos anos 1980, a tecnologia de marcadores moleculares era rotineiramente usada nas mais diversas espécies, desde então vêm sendo aperfeiçoados e suas metodologias evoluindo em conjunto com os avanços nas técnicas de sequenciamento em larga escala. De maneira genérica, os marcadores de DNA podem ser classificados em três categorias, sendo os baseados em hibridização, baseados em *PCR* e baseados em sequenciamento.

Existe um vasto número de marcadores disponíveis para serem utilizados, os quais diferem nos seus princípios, métodos e aplicações potenciais, bem como os recursos técnicos, financeiros e laboratoriais necessários. Entre as aplicações em ciências florestais, pode-se citar o estudo da diversidade genética, inferências acerca estrutura genética, fluxo gênico, sistema reprodutivo, tamanho efetivo, análise de parentesco, reconstituição de *pedigrees*, resolução de problemas taxonômicos, estudos filogenéticos, mapeamento genético, sinalização de genes e seleção assistida visando resistência a pragas e doenças, avaliação e caracterização de germoplasma, introgressão de genes, seleção genômica ampla e associação com caracteres quantitativos, estudos de interação genótipos-ambientes, registro e proteção de materiais genéticos desenvolvidos entre outros (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; BORÉM e CAIXETA, 2009;

RESENDE et al., 2012; SORK et al., 2013; GRATTAPAGLIA, 2014; BORÉM e MIRANDA, 2017).

No presente estudo utilizou-se marcadores microssatélites, que são sequências repetidas constituídas de 1 a 6 nucleotídeos que se repetem lado a lado em forma de tandem (HARTL e CLARK, 2010). Esse tipo de marcador é amplamente usado em análises genéticas, em uma vasta gama de seres vivos, sobretudo, devido ao seu elevado grau de informações e transferibilidade entre espécies (BORÉM e CAIXETA, 2009).

Deste modo, marcadores microssatélite geralmente são usados em estudos relacionados a testes de parentesco, sistema de reprodução, diversidade genética e estudos evolutivos, por se tratarem de sequências com alta taxa evolutiva. Isto ocorre mesmo em comparações de germoplasmas com estreita base genética, em que geralmente é possível detectar um alto número de alelos por loco SSR (SELKOE e TOONEN, 2006). Esses marcadores têm ainda como vantagem serem codominantes, multialélicos, baseados em PCR, estarem distribuídos de forma ampla no genoma e necessitarem de pequena quantidade de DNA coletado dos indivíduos a serem analisados (BUSO, 2003).

3.3. Diversidade Genética no contexto de doenças de plantas

A diversidade genética diz respeito a quantidade total de variações genéticas, podendo ser entre populações de uma espécie ou entre os indivíduos de uma população.

As alterações direcionais nas frequências alélicas, podem influenciar a capacidade dos indivíduos de uma espécie de responderem aos estímulos abióticos e bióticos do meio. Podendo haver o comprometimento da capacidade de perpetuação da espécie e da sua biota depende (PRIMACK e RODRIGUES, 2001). Dessa forma, populações que fiquem sujeitas a perda de genes e genótipos presentes, irão consequentemente restringir a variabilidade genética e ocasionando a erosão genética.

Ao pensar na diversidade genética num contexto fitopatológico, verifica-se que a resistência de plantas a doenças é uma das principais estratégias de manejo, empregadas nos sistemas de cultivos, sendo eficaz, econômica e segura para o ser humano e para o meio ambiente (CASELA, 2005).

Conseguir manter a durabilidade da resistência a doenças é atualmente um dos principais temas de interesse enfrentados por fitopatologistas e melhoristas, considerando

que por vezes a resistência pode ser suplantada ou reduzida pelo surgimento de novas raças de patógenos capazes de se adaptarem às defesas presente nos genótipos cultivados.

Na outra ponta estão os patógenos e diversos são os mecanismos que propiciam a variabilidade desse grupo. Para fungos fitopatogênicos destaca-se mutação, recombinação sexual, parassexualidade, heterocariose, ação de transposons, herança extranuclear e a própria reprodução sexuada. Esses mecanismos podem acabar influenciando positivamente no potencial adaptativo desses organismos em relação aos genes de resistência do hospedeiro (AGRIOS, 2005; CASELA, 2005; HARTL e CLARK, 2010).

Nesse sentido, compreender a dinâmica populacional dos fitopatógenos e a maneira como ocorre a distribuição da variabilidade genética nos diferentes níveis hierárquicos entre e dentro das subpopulações, poderá contribuir no desenvolvimento de estratégias mais eficientes de para a durabilidade da resistência e assim do controle como um todo.

3.4. Genética de Populações e Teoria da Coalescência

A genética populacional tem seu interesse na origem, quantificação e distribuição da variabilidade genética em populações, bem como o destino dessa variação ao longo do tempo e do espaço (HARTL e CLARK, 2010).

De modo geral, a genética biométrica e genética populacional surgiu de duas visões do estudo da evolução que acabaram sintetizadas. Esses ramos da genética foram influenciados pelos trabalhos de Charles Darwin, que enfatizavam a continuidade essencial da variabilidade genética e a extrema minúcia dos processos evolutivos individuais (CROW, 1987).

Além das teorias Darwianas, outros pensadores como Francis Galton, com uma visão biometristas, influenciaram o surgimento de duas escolas que dominaram o pensamento genético evolucionista nos primeiros anos do século XX: os Biometristas, e os Mendelistas (PROVINE, 2020). Vale ressaltar que esses pontos de vistas contrastantes, a princípio antecederam a redescoberta das leis de Mendel e foram intensificadas após a divulgação dos conceitos Mendelianos e pela teoria da mutação de DeVries.

Em seus trabalhos, Mendel mostrou que a heterozigosidade é reduzida pela metade a cada geração e demonstrando matematicamente as frequências genótípicas em

gerações sucessivas. Entretanto, Mendel não considerou as consequências do acasalamento aleatório, provavelmente por causa do hábito de cultivar suas ervilhas. A solução proposta veio pelo que conhecemos atualmente como princípio de Hardy-Weiberg (HARDY, 1908; WEINBERG, 1908).

O princípio de Hardy-Weiberg é a base de grande parte das inferências em genética de populações, e postula que em populações que não houve diferença de aptidão, geneticamente determinada, sem migração, sem mutação e sem flutuação aleatória, a frequência alélica não muda de geração em geração. Com o acasalamento aleatório, o arranjo de genótipos com dois alelos é dado pela expansão binomial do quadrado do arranjo gamético (FALCONER, 1997). De modo simplificado, a população precisa ser infinitamente grande, reproduzir-se aleatoriamente, e não haver forças evolutivas atuando sobre elas.

A síntese e conciliação dessas ideias vieram com as análises matemáticas de Sewall Wright, Sir Ronald Fisher e John Burdon Sanderson Haldane, o que ficou conhecido como síntese moderna da evolução. Wright, Fisher e Haldane foram pioneiros, e dominaram o campo por décadas e o converteram em uma nova disciplina científica, usando teoria matemática, amplas generalizações e previsões quantitativas (CROW, 1987).

Tradicionalmente, métodos estatísticos “clássicos” de inferência são fundamentados quase que exclusivamente na frequência dos alelos, e são utilizados nas estimativas de parâmetros genéticos populacionais, partindo de conjuntos de dados (ROSA, 2016).

Esses métodos foram aprimoradas e desenvolvidas com o passar do tempo, decorrente de avanços tecnológicos e científico se expandiram em diversas variantes aceitas e debatidas por muitos cientistas, como exemplos as estatísticas F desenvolvidas por Wright (1951, 1978), as estatísticas de Nei (1973) e suas extensões e derivações para diversos outros tipos de marcadores (NATH e GRIFFITHS, 1996), métodos de inferência bayesiana para estrutura populacional como o STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000), agrupamentos hierárquicos clássicos (ODONG et al., 2011), componentes principais (CRUZ et al., 2011), entre diversas outras metodologias.

A maioria desses métodos focam na frequência dos alelos para compreender os níveis de diferenciação. De modo que resultados obtidos possam retratar eventos de fluxo gênico recentes, por vezes, não considerando os eventos migratórios que aconteceram no passado (WILSON e RANNALA, 2003; ROSA, 2016). Há assim uma perda de

informação que tende a dificultar o entendimento das relações do passado co-evolutivo e evolutivo das populações.

As estatísticas F de Wright e estatísticas de Nei geralmente são o marco inicial da maioria dos estudos genético-populacional. Porém, algumas limitações se tornam evidentes com o tempo (NEIGEL, 2002). A maioria dos métodos citados pressupõem suposições restritivas e pouco realistas para certos cenários, como exemplo, não permitem considerar mutação. As estatísticas F de Wright e seus parâmetros análogos a F , são utilizados frequentemente para populações em pares, por vezes ocasionando tendências na estimativa dos parâmetros (BEERLI, 2004; SLATKIN, 2005) e a reutilização de dados baseados em pares não é ideal do ponto de vista estatístico (BEERLI, 2009).

Sir John Frank Charles Kingman no ano de 1982 desenvolveu ao longo de três importantes trabalhos, a teoria da coalescência (KINGMAN, 1982 a, b, c). Os frutos das pesquisas de Kingman começaram a ter enorme representatividade e importância nos estudos evolutivos e de genética de populações. Deram oportunidade para novos métodos, considerando ainda que as estimativas inferenciais baseadas na teoria da coalescência não eram viáveis na maioria dos casos até metade dos anos 1990, principalmente pelas restrições computacionais (BEERLI, 2009).

A teoria da coalescência se baseia em um modelo retrospectivo que tem como intuito modelar a genealogia dos alelos amostrados, baseando-se em princípio nos modelos populacionais propostos por Fisher (1930) e Wright (1931). A teoria da coalescência parte do pressuposto de que os alelos amostrados no presente surgiram de um alelo ancestral único, chamado de alelo comum mais recente (NORDBORG, 2001).

Considerando uma população com apenas um *locus* amostrado e dois alelos, seguindo o modelo de Fisher-Wright (Fisher, 1930; Wright, 1931). Nesse caso ancestralidade dessa amostra é inferida partindo-se do presente e caminhando em direção ao passado, até o tempo em que os alelos do *locus* se coalescem em seu ancestral comum mais recente (ACMR).

Um evento coalescente é basicamente a fusão de dois alelos presentes no tempo (t) em um único alelo no tempo ($t-1$). Considerando uma perspectiva histórica da genealogia das populações, os eventos coalescentes retratam os eventos de divergência dos alelos (FU; LI, 1999).

Partindo de uma amostra com tamanho n , haverá $n-1$ eventos coalescentes indo em direção passado, quando ocorrer o último evento coalescente, ele retratará o ancestral comum mais recente da amostra (NORDBORG, 2001; WAKELEY, 2009). Considerando

uma amostra também de tamanho n , haverá $\frac{n(n-1)}{2}$ combinações possíveis para o primeiro evento coalescente, analogamente esse raciocínio se aplica aos demais eventos coalescentes (FU; LI, 1999).

A chance de duas amostras quaisquer coalescerem em alguma geração no passado é de $\frac{1}{2N_e}$, onde N_e é o tamanho efetivo populacional. A chance de duas amostras não coalescerem é de $1 - \frac{1}{2N_e}$. Dessa maneira, a probabilidade de ocorrer o primeiro evento coalescente é dada por $\frac{n(n-1)}{2} * \frac{1}{2N_e}$ levando em consideração um total de n amostras. Isso porque em uma amostra com tamanho populacional efetivo constante, havendo $2N_e$ cópias de cada locus, conseqüentemente terá $2N_e$ "genitores em potencial" na geração antecedente (ROSA, 2016). Importante frisar, que a princípio, o modelo de Fisher-Wright descreve basicamente uma amostragem binomial de alelos para cada geração.

Pode-se usar a distribuição binomial para modelar os eventos coalescentes, e a distribuição geométrica para modelar o tempo de coalescência, o qual retrata os intervalos em gerações entre os eventos coalescentes sucessivos em cada geração anterior. A probabilidade de não ocorrer coalescência nas gerações que antecedem $t-1$ é multiplicada pela probabilidade de coalescência na geração de interesse, essa probabilidade é dada por $P_c(t) = \left(1 - \frac{1}{2N_e}\right)^{t-1} * \frac{1}{2N_e}$ (HALLIBURTON et al., 2004).

Quando as amostras de tamanho n são muito grandes, e a probabilidade de coalescer é muito pequena, desse modo os eventos de coalescência são modelados de acordo com distribuição de Poisson, havendo uma taxa de um evento de coalescência ($\lambda = 1$) para cada amostra em um intervalo de tempo (t_1, t_2, t_3 , até t_n). Fato explicado em razão da distribuição binomial se aproximar da distribuição de Poisson nos casos em que probabilidade de sucesso é pequena e há um tamanho n muito grande. Nestes casos, os tempos de coalescência são modelados usando a distribuição exponencial, e probabilidade é dada por $P_c(t) = \frac{1}{2N_e} e^{-\frac{t-1}{2N_e}}$ (HALLIBURTON et al., 2004).

O processo estatístico de inferência de determinada genealogia pela teoria da coalescência, é fundamentada em diferentes modelos probabilísticos. As combinações praticáveis de serem obtidas indicam o número de configurações possíveis (comumente chamado de número de genealogias) levando em consideração as amostras atuais das populações.

O tamanho efetivo e amostral das populações consideradas nos estudos baseados na teoria da coalescência, é proporcionalmente equivalente ao tempo necessário para que ocorram os eventos coalescentes. Geralmente, isso faz com que os primeiros eventos coalescentes aconteçam mais devagar em populações com maior diversidade, enquanto que os eventos coalescentes irão ocorrer cada vez mais, à medida em que o ACMR se aproxima, e as possibilidades se estreitam (WAKELEY, 2009).

Kingman (1982a; b; c), baseando-se nas observações feitas por Wright, ampliou as, considerando dois cromossomos escolhidos aleatoriamente em uma população de tamanho N sobre $2N$ gerações até se encontrarem no seu ancestral comum mais recente. Essas descobertas permitiram usar amostras aleatórias de indivíduos para inferir parâmetros para toda a população, possibilitando estimar às probabilidades de certas genealogias para qualquer número de indivíduos em uma população (NORDBORG, 2001).

Com o passar dos anos e a popularização e acessibilidade da matemática nos últimos anos, surgiram *softwares* que permitem estimar parâmetros genéticos por meio de dados de diferentes marcadores moleculares (BEERLI; FELSENSTEIN, 1999, 2001; BAHLO; GRIFFITHS, 2000; WILSON; RANNALLA, 2003; IORIO; GRIFFITHS, 2004; HEY; NIELSEN 2004; BEERLI, 2006; EWING; RODRIGO, 2006; KUHNER, 2006). A utilização dessas abordagens possibilita estimar parâmetros relacionados à genética de populações por meio de uma abordagem que considera o passado evolutivo e as relações genealógicas dos alelos.

3.5. Tamanho efetivo populacional e Fluxo gênico

O tamanho efetivo populacional (N_e) é um conceito importantíssimo em estudos genéticos populacionais, sendo inicialmente proposto por Wright (1930). Tem o objetivo de proporcionar um método de estimar a deriva genética, que em outras palavras, é taxa de mudança evolutiva causada pela amostragem aleatória de frequências alélicas no decorrer das gerações em uma população de tamanho finito.

Quanto maior o tamanho efetivo de uma população, menores são os efeitos da deriva genética, como a diminuição da variância entre populações e aumento da

diversidade dentro de populações. Diminuindo assim a probabilidade de fixação ou perda de alelos em populações com maiores tamanhos efetivos (RIDLEY, 2009).

Em termos conceituais, o tamanho efetivo é equivalente a uma população idealizada no modelo genético-populacional de Fisher e Wright. Pressupondo-se a redução da variabilidade genética em uma taxa equivalente a população do estudo (CABALLERO, 1994; CHARLESWORTH, 2009; SEBBENN; SEOANE, 2005). Geralmente o tamanho efetivo populacional teórico é diferente do tamanho censitário da população, na maioria das vezes sendo menor (WRIGHT, 1938).

Há uma grande variedade de estimadores de tamanho efetivo descritos, partindo de diferentes pressupostos, além de poderem ser baseados no fenótipo ou em marcadores moleculares, podendo serem utilizados medida de representatividade genética a partir certa amostragem (VENCOVSKY; CROSSA, 2003).

O termo fluxo gênico, refere-se genericamente a movimentação de genes de uma população em direção à outra. Inclui-se todos os mecanismos que possibilitam e resultam na movimentação dos alelos entre essas populações (NEIGEL, 1997).

O fluxo gênico é considerando um processo evolutivo, causando mudanças nas frequências alélicas das populações no tempo e no espaço (WILSON e BOSSERT, 1971). Essas mudanças evolutivas ocorrem em conjunto, sendo que todos os mecanismos evolutivos mutação, seleção, deriva genética e fluxo gênico ocorrem com maior ou menor intensidade, ocasionando a mudança nas frequências alélicas das populações ao longo do tempo.

Um tamanho efetivo populacional reduzido, bem como a endogamia ou a ocorrência conjunta desses, reduzem a variabilidade genética dentro de populações e acentuam os efeitos da deriva genética, contribuindo no sentido de aumentar a diferenciação, divergência e heterogeneidade genética entre as demais populações.

O fluxo gênico se contrapõe aos efeitos da deriva genética, possibilitando maior variabilidade nas populações. Isto por fazer com que ocorra disseminação de novos alelos e de suas combinações nas populações (SLATKIN e MADDISON, 1989). Simultaneamente, implica na diminuição da variabilidade no nível entre populações, em consequência do número de indivíduos que vão de uma população para outra a cada geração (WRIGHT, 1951). Caso não haja fluxo gênico, pode ser que às populações acumulem diferenças genéticas no decorrer das gerações, levando ao processo de especiação, possivelmente tornando-se espécies distintas (FUTUYAMA, 1992; RIDLEY, 2009; HARTL e CLARK, 2010).

Genericamente é descrito na literatura quatro modelos adotados para explicar como o fluxo gênico atua nas metapopulações, a partir desses modelos podem surgir variações (FUTUYAMA, 1992), citando-se:

- I. Modelo de n-ilhas: Os eventos migratórios ocorrem ao acaso em pequenas subpopulações agrupadas;
- II. Modelo continente-ilha: Ocorre um movimento no sentido unidirecional de uma subpopulação grande para uma menor, quase que isolada;
- III. Modelo de “alpondras” (*stepping-stone*): As subpopulações recebem migrantes apenas das subpopulações próximas;
- IV. Modelo de isolamento por distância: Nos indivíduos espacialmente próximos o fluxo ocorre de maneira preferencial, em relação as demais.

As estimativas de fluxo gênico são complexas, havendo uma série fatores além apenas da dispersão que afetam as estimativas e a interpretação das mesmas, tais como o tamanho efetivo da população que recebe os alelos, sucesso reprodutivo do migrante e capacidade de se perpetuar (ENNOS, 1994), sistema reprodutivo da espécie, e as relações ecológicas complexas interespecíficas e intraespecíficas, biologia da espécie e fatores co-evolutivos (DICK et al., 2003; HARTL e CLARK, 2010; ELLSTRAND, 2014; RIDLEY, 2009).

O fluxo gênico pode ser estudado por métodos diretos e indiretos (SLATKIN, 1985; 1987; BEERLI, 1998). Métodos diretos se baseiam em observações diretas ou inferências das distâncias de dispersão e de sucesso reprodutivo, sendo todas fundamentadas em observações do movimento dos vetores (LATTA et al., 1998) e na análise da paternidade (JONES; ARDREN, 2003). Entre as várias limitações do método direto, é sua inviabilidade na maioria dos estudos envolvendo microrganismos fitopatogênicos, pois em caso de taxas pequenas de migração, seria praticamente indetectável, ocasionando baixa precisão confiabilidade das estimativas, principalmente se a amostra for pequena (BEERLI, 1998). No caso de estudos sazonais e sem repetibilidade, seria impossível inferir se os padrões de fluxo gênico observado foram são padrões gerais da população ou aconteceu devido a fatores não controlados, pois as inferências desse método estão limitadas no tempo e no espaço, sem considerar o fluxo histórico dessas populações (BEERLI, 1998).

Métodos indiretos se baseiam em dados genéticos amostrados por meio marcadores moleculares seletivamente neutros em várias subpopulações, para realizar as estimativas de fluxo gênico (BEERLI, 1998; GRIFFITHS et al., 2004). As inferências

baseadas nesse método revelam padrões gerais de fluxo gênico e podem ser aplicados a qualquer tipo organismo. Ainda, os marcadores precisam mostrar elevado polimorfismo para que seja possível avaliar as diferenças entre subpopulações.

Atualmente há vários métodos indiretos descritos para as estimativas de fluxo gênico baseando-se em dados de marcadores genéticos, tais como os estimadores baseados em frequências alélicas (F de Wright e análogos (MICHALAKIS e EXCOFFIER, 1996); máxima verossimilhança (RANNALA e HARTIGAN, 1996; TUFTO et al. 1996); estimadores baseados na teoria da coalescência, que fundamenta-se genealogias dos indivíduos amostrados (KINGMAN, 1982), com taxas de migração estimadas usando procedimentos de Bahlo e Griffiths (1998); Beerli e Felsenstein, (1998); Wakeley (1998).

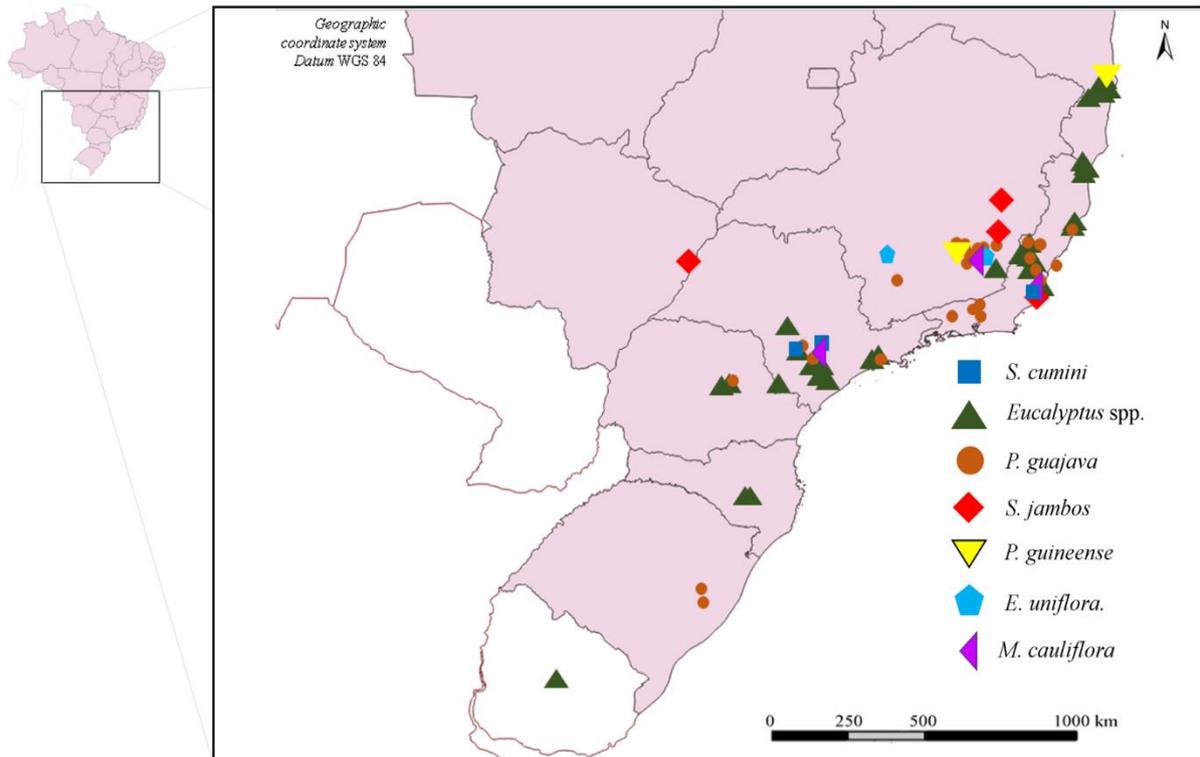
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem dos dados utilizados

Os dados utilizados na presente pesquisa foram obtidos do repositório internacional de acesso aberto a dados de pesquisa Dryad, sob a licença CC0 1.0 *Universal Public Domain Dedication*, publicados por Graça et al. (2013).

No trabalho foram utilizadas subpopulações de *A. psidii* agrupadas de acordo com sete hospedeiros, de amostras coletadas por Graça et al. (2013) da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul, além de um indivíduo do Uruguai (Figura 1).

Figura 1: Locais de amostragem de isolados *Austropuccinia psidii* associados a família Myrtaceae no Brasil e Uruguai. Às espécies são *Eucalyptus* spp., *Eugenia uniflora*, *Myrciaria cauliflora*, *Psidium guajava*, *Psidium guineense*, *Syzygium jambos*, *Syzygium cumini*.



Fonte: Graça (2013).
Imagem: O autor

Graça et al. (2013), coletaram de pústulas urediniais oriundas de 148 plantas de *Eucalyptus* spp., *P. guajava*, *S. jambos*, *P. guineense*, *S. cumini*, *M. cauliflora* e *E. uniflora*. onde todos os indivíduos amostrados foram georreferenciados.

As amostras foram genotipadas usando em 10 *loci* microssatélites (PpSSR012, PpSSR014, PpSSR018, PpSSR022, PpSSR087, PpSSR102, PpSSR146, PpSSR161, PpSSR178 e PpSSR195(Tabela 1).

O número de amostras coletadas em cada estado e táxon botânico foram diferentes, isso ocorreu devido ao fato de *A. psidii* infectar apenas tecidos jovens e tenros, além do desenvolvimento ser dependente das condições ambientais, microclimáticas, do estágio fenológico do hospedeiro e dos seus órgãos.

As informações sobre a extração de DNA, bem como a genotipagem, podem ser acessadas nos trabalhos de Graça et al. (2013).

4.2. Estimativas de Fluxo gênico e Tamanho efetivo via coalescência

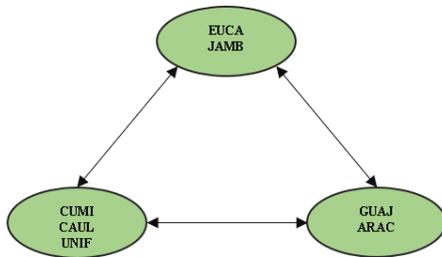
Seis diferentes modelos demográficos e de conectividade entre as populações foram testados (Figura 2). Esses modelos buscaram elucidar se populações estão em panmixia ou se estas se mostram estruturadas geneticamente e se há indícios de isolamento por distância. A comparação dos modelos foi realizada estimando-se a probabilidade do modelo (equação 1). Tendo-se que os modelos responsáveis pela maior proporção de verossimilhança são os mais prováveis, estimada a partir das probabilidades marginais obtidas pela integração termodinâmica no *software* Migrate-N 3.6.11 (BEERLI e PALCZEWSKI, 2010).

Tabela 1: Descrição dos *loci* amplificados pela PCR, com os respectivos *primers forward* e *reverse*, bem como o nº de acesso no GenBank, a indicação do motivo da sequência e o tamanho em pares de base da sequência amplificada dos dez microssatélites usados para estimar o tamanho efetivo e o fluxo gênico no presente trabalho adaptado de Zhong et al., (2008) e Graça et al. (2013).

Locus	GenBank n. acesso	Primer sequence (5' - 3')	Repeat motif	Size range
<i>PpSSR012</i>	EF523501	F: TTCAATCCCATAAGGCTTTC R: AAATCCTGAGTCTTCTTCCCC	(AG) ₉	229 - 239
<i>PpSSR014</i>	EF523502	F: TTCGACATCCAACGCTCTCAT R: AAAGGCTAAGTGAATGGGCA	(AG) ₁₃	206-214
<i>PpSSR018</i>	EF523503	F: AGCCTTCTCTCTCCCGTTA R: TCAGGAAGGACAAGACCAAGT	(AG) ₉	162-172
<i>PpSSR022</i>	EF523504	F: CCTTTAGGCTGTGGTTTCCA R: GCCCACTCTGTCAAGAGGAA	(AG) ₁₂	147-159
<i>PpSSR087</i>	EF523507	F: AAGAACGTGAACGGGAATGA R: GAAATGCCAGACGAAGGGTA	(AG) ₁₄ + G ₆ + A ₉	154-178
<i>PpSSR102</i>	EF523508	F: TGACTTTAATCATCTTCAAAACCAA R: ACCAATCCCCTTCCTTCATC	T ₇ + (AG) ₂₂ + T ₇	140-178
<i>PpSSR146</i>	EF523510	F: TTGGTAAAGAGGAGGGGATTC R: TCAGCACCAACCATTACCTTC	(AG) ₇₃	205-249
<i>PpSSR161</i>	EF523511	F: TCGAGGGGTCTCAGTTTCA R: GAGATCTATCGGACCAACGAA	(AG) ₂₅	272-292
<i>PpSSR178</i>	EF523512	F: TCGTGTGCATGTGTGTATCG R: GCCTTGGGTGCACACTTTAT	(AG) ₆₂	167-293
<i>PpSSR195</i>	EF523513	F: GAACGAACCCAAACTTCCA R: GGAAAGGAATGAGATTGAACACA	(AG) ₁₈	208-226

Figura 2.: Esquema gráficos dos seis modelos genético-populacionais de fluxo gênico propostos pelo autor e testados no *software* Migrate-N.

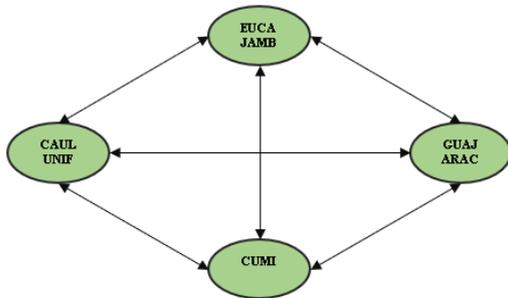
Figura 2.a: Modelo 1



Pop	EUCA JAMB	GUAJ ARAC	CUMI CAUL UNIF
EUCA JAMB	*	*	*
GUAJ ARAC	*	*	*
CUMI CAUL UNIF	*	*	*

em que EUCA, JAMB, GUAJ, ARAC, CUMI, CAUL e UNIF são respectivamente as subpopulações agrupadas pelas espécies *Eucalyptus* spp., *S. jambos*, *P. guajava*, *P. guineense*, *S. cumini*, *M. cauliflora* e *E. uniflora*; “*” significa que este parâmetro é estimado; “0” significa que este parâmetro não é estimado; “s” significa que o parâmetro de migração é simétrico ($M_{ij} = M_{ji}$).

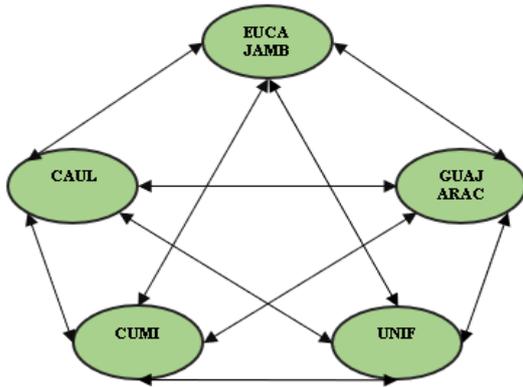
Figura 2.b : Modelo 2



Pop	EUCA JAMB	GUAJ ARAC	CUMI	CAUL UNIF
EUCA JAMB	*	*	*	*
GUAJ ARAC	*	*	*	*
CUMI	*	*	*	*
CAUL UNIF	*	*	*	*

em que EUCA, JAMB, GUAJ, ARAC, CUMI, CAUL e UNIF são respectivamente as subpopulações agrupadas pelas espécies *Eucalyptus* spp., *S. jambos*, *P. guajava*, *P. guineense*, *S. cumini*, *M. cauliflora* e *E. uniflora*; “*” significa que este parâmetro é estimado; “0” significa que este parâmetro não é estimado; “s” significa que o parâmetro de migração é simétrico ($M_{ij} = M_{ji}$).

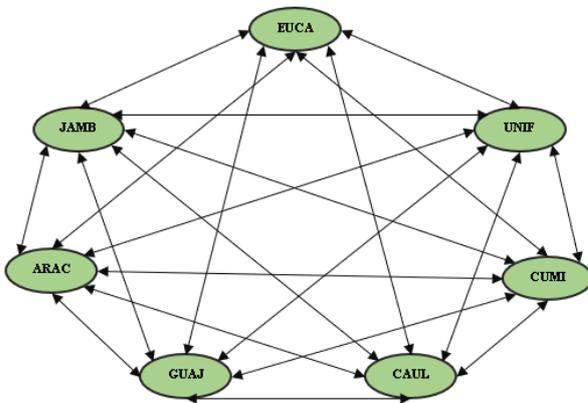
Figura 2.c : Modelo 3



Pop	EUCA JAMB	GUAJ ARAC	CUMI	UNIF	CAUL
EUCA JAMB	*	*	*	*	*
GUAJ ARAC	*	*	*	*	*
CUMI	*	*	*	*	*
UNIF	*	*	*	*	*
CAUL	*	*	*	*	*

em que EUCA, JAMB, GUAJ, ARAC, CUMI, CAUL e UNIF são respectivamente as subpopulações agrupadas pelas espécies *Eucalyptus* spp. , *S. jambos* , *P. guajava*, *P. guineense*, *S. cumini*, *M. cauliflora* e *E. uniflora* ; “*” significa que este parâmetro é estimado; “0” significa que este parâmetro não é estimado; “s” significa que o parâmetro de migração é simétrico ($M_{ij} = M_{ji}$).

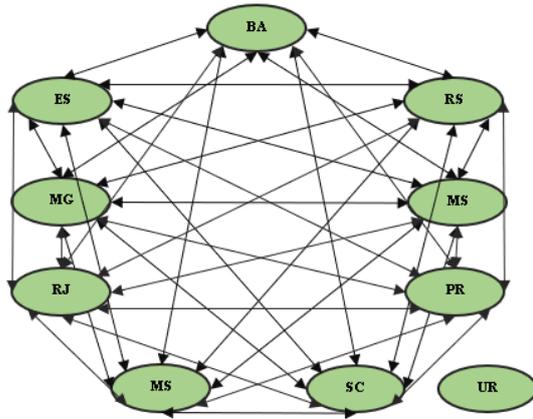
Figura 2.d : Modelo 4



Pop	EUCA	JAMB	GUAJ	ARAC	CUMI	CAUL	UNIF
EUCA	*	*	*	*	*	*	*
JAMB	*	*	*	*	*	*	*
GUAJ	*	*	*	*	*	*	*
ARAC	*	*	*	*	*	*	*
CUMI	*	*	*	*	*	*	*
CAUL	*	*	*	*	*	*	*
UNIF	*	*	*	*	*	*	*

em que EUCA, JAMB, GUAJ, ARAC, CUMI, CAUL e UNIF são respectivamente as subpopulações agrupadas pelas espécies *Eucalyptus* spp. , *S. jambos* , *P. guajava*, *P. guineense*, *S. cumini*, *M. cauliflora* e *E. uniflora* ; “*” significa que este parâmetro é estimado; “0” significa que este parâmetro não é estimado; “s” significa que o parâmetro de migração é simétrico ($M_{ij} = M_{ji}$).

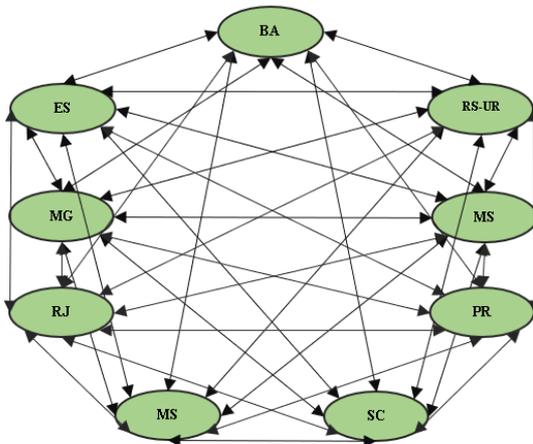
Figura 2.e: Modelo 5



Pop	BA	ES	MG	SP	RJ	MS	SC	PR	RS	UR
BA	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0
ES	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0
MG	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0
SP	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0
RJ	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0
MS	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0
SC	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0
PR	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0
RS	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0
UR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	*

em que BA, ES, MG, SP, RJ, MS, SC, PR, RS e UR são respectivamente as subpopulações geográficas da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Uruguai; “*” significa que este parâmetro é estimado; “0” significa que este parâmetro não é estimado; “s” significa que o parâmetro de migração é simétrico ($M_{ij} = M_{ji}$).

Figura 2.f: Modelo 6



Pop	BA	ES	MG	SP	RJ	MS	SC	PR	RS-UR
BA	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ES	*	*	*	*	*	*	*	*	*
MG	*	*	*	*	*	*	*	*	*
SP	*	*	*	*	*	*	*	*	*
RJ	*	*	*	*	*	*	*	*	*
MS	*	*	*	*	*	*	*	*	*
SC	*	*	*	*	*	*	*	*	*
PR	*	*	*	*	*	*	*	*	*
RS	*	*	*	*	*	*	*	*	*
UR	*	*	*	*	*	*	*	*	*

em que BA, ES, MG, SP, RJ, MS, SC, PR, RS- UR são respectivamente as subpopulações geográficas da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul + Uruguai em uma mesma subpopulação; “*” significa que este parâmetro é estimado; “0” significa que este parâmetro não é estimado; “s” significa que o parâmetro de migração é simétrico ($M_{ij} = M_{ji}$).

A probabilidade do modelo é dada pela divisão da probabilidade marginal pelo somatório das probabilidades marginais de todos os modelos utilizados.

$$Prob(\text{modelo}_i) = \frac{mL\text{modelo}(i)}{\sum mL\text{modelos}(\text{todos})} \quad (1)$$

Em que:

- a) $Prob(\text{modelo}_i)$ = a probabilidade do modelo i em relação aos demais modelos;
- b) $mL\text{modelo}(i)$ = a probabilidade marginal do modelo (i);
- c) $\sum mL\text{modelos}(\text{todos})$ = somatória das probabilidades de todos os modelos utilizados.

Para avaliar o tamanho efetivo e fluxo gênico assimétrico entre as populações foi utilizado o método de inferência bayesiana, baseado na teoria da coalescência implementado no *software* MIGRATE-N (BEERLI e PALCZEWSKI, 2010). Sendo os parâmetros tamanho efetivo populacional em escala de mutação (Θ_i) e a taxa de migração escalonada pela taxa de mutação (M_{ij}) são estimados simultaneamente:

$$\Theta_i = xN_e \quad (2)$$

Em que:

- a) x = um multiplicador que depende da ploidia e herança dos dados ($x=4$ para diploides nucleares);
- b) N_e = o tamanho efetivo da população e;
- c) μ = a taxa de mutação.

$$M_{ij} = \frac{m_{ij}}{\mu} \quad (3)$$

Em que:

- a) m_{ij} = taxa de migração entre grupo i para grupo j ;
- b) μ = taxa de mutação.

A partir desses valores, foi obtido o número efetivo de migrantes por geração ($xN_i m_{ji}$), o qual pode ser estimado por:

$$xN_im_{ji} = \Theta_i * M_{ij} \quad (4)$$

A distribuição *a priori* dos parâmetros escolhida foi a uniforme, com os valores de mínimo, máximo e delta respectivamente de 0, 100 e 10. O processo de estimação com 5.000.000 iterações, com um período de aquecimento (*burnin*) de 10.000, utilizando o esquema de aquecimento estático com quatro cadeias de diferentes temperaturas (1,0; 1,5; 3,0 e 100.000,0) (BEERLI e PALCZEWSKI, 2010). Após o término de cada análise, a área abaixo da curva de verossimilhança, realizada por meio de integração termodinâmica foi calculada utilizando a aproximação pela curva de Bezier, a qual possibilita uma melhor aproximação com um pequeno número de cadeias aquecidas (BEERLI e PALCZEWSKI, 2010). A taxa de mutação utilizada variou apenas entre *loci*, e assumiu-se uma taxa de mutação de 5×10^{-5} próximas as descritas por Bhargava e Fuentes (2010).

4.3. Diversidade genética e estrutura populacional

Os grupos genéticos das subpopulações nomeadas de acordo com o hospedeiro foram agrupadas com base nos resultados de modelos feitos no *software* MIGRATE-N como SPOP1 (*Eucalyptus* spp. + *S. jambos*), SPOP2 (*P. guajava* + *P. guineense*), SPOP3 (*S. cumini*) e SPOP4 (*M. cauliflora* e *E. uniflora*).

As frequências de alelos nulos foram estimadas utilizando o programa *MicroChecker* 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2006), baseado em simulações pelo método de Monte Carlo via procedimento *bootstrap*, para gerar frequências esperadas dos alelos em homozigose e heterozigose, utilizando um intervalo de confiança de 95% para cada loco individualmente.

As análises de diversidade foram feitas em relação a cada grupo de subpopulação, sendo realizadas as estimativas em diferentes níveis considerando os grupos genéticos e os hospedeiros de maneira hierárquica e com quatro populações, sendo estimado o F_{ST} no *software* GenAlEx 6.5 (PEAKALL e SMOUSE 2006 e 2012) e a diferenciação intra e intergrupos foi estimada por análise de variância molecular (AMOVA) considerando os grupos genéticos de quatro subpopulações e os hospedeiros de maneira hierárquica utilizando o programa *Arlequin* ver. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). As frequências e estatísticas descritivas da diversidade a nível total e de hospedeiro já foram previamente publicadas por Graça (2013) e desse modo, não foram estimadas nesse trabalho.

5. RESULTADOS

5.1. Estimativas de Fluxo gênico e Tamanho efetivo via coalescência

O Modelo 2 (Figura 2b) foi o que obteve a maior probabilidade dada pela equação 1) usando o critério de escolha a probabilidade do modelo, sendo assim o que melhor se adequa para realização das inferências. Partindo desse modelo, às subpopulações nomeadas de acordo com o hospedeiro foram agrupadas, sendo SPOP1 (*Eucalyptus* spp. + *S. jambos*), SPOP2 (*P. guajava* + *P. guineense*), SPOP3 (*S. cumini*) e SPOP4 (*M. cauliflora* e *E. uniflora*). Ainda nesse modelo prevê a possibilidade de fluxo gênico entre cada uma dessas subpopulações (Figura 2.b).

Foi realizado as estimativas dos parâmetros M_{ij} , juntamente com o intervalo de confiança de 95% para tal parâmetro (Tabela 2), em que M_{ij} representa a taxa de migração dimensionada pela taxa de mutação ($M_{ij} = m_{ij}/\mu$).

O M_{ij} estimado de ingresso na população SPOP1 vindos das populações SPOP2, SPOP3 e SPOP4 foi de 1,060; 1,750 e 2,870, respectivamente. A população SPOP2 recebeu imigrantes das populações SPOP1, SPOP3 e SPOP4, com as taxas de 0,790; 1,790 e 1,740, respectivamente. Para a população SPOP3 o M_{ij} as taxas de migração vindas de SPOP1, SPOP2 e SPOP4 foram 0,760; 0,790 e 1,540, respectivamente. A população SPOP4, as taxas de imigração oriundas das populações SPOP1, SPOP2 e SPOP3 foram de 0.590; 0.690 e 1.030, respectivamente (Tabela 2).

Obteve-se as estimativas do número efetivo de migrantes por geração ($N_i m_{ji}$) para cada *locus* (Figura 3) e para a média de todos os *loci* (Tabela 3).

As estimativas do número efetivo de migrantes em cada geração ($N_i m_{ji}$), recebidos pela subpopulação SPOP1, foram de 0,063; 0,104 e 0,171, oriundos respectivamente de SPOP2, SPOP3 e SPOP4. Para a subpopulação de SPOP2, os migrantes recebidos foram de 0,044; 0,099 e 0,096 respectivamente de SPOP1, SPOP3 e SPOP4. A subpopulação de SPOP3 recebeu 0,072; 0,075 e 0,075, vindos de SPOP1, SPOP2 e SPOP4. Na subpopulação de SPOP4, os migrantes recebidos foram de 0,388; 0,454 e 0,677, oriundas de SPOP1, SPOP2 e SPOP3 (Tabela 3).

Tabela 2: Estimativas das taxas de migração, escalonadas pela taxa de mutação (M_{ij}), considerando isolados *A. psidii* associados as sete espécies hospedeiras da família Myrtaceae no Brasil e Uruguai, para a média dos dez loci microsatélites utilizados. Sendo na primeira coluna as populações migrantes e nas demais colunas as populações de estabelecimento dos migrantes.

Valores de M_{ij}	Recebem			
	SPOP1 EUCA JAMB	SPOP2 GUAJ ARAC	SPOP3 CUMI	SPOP4 CAUL UNIF
SPOP1 EUCA JAMB	*	0.790 (0.13-3.27)	0.760 (0.00-3.00)	0.590 (0.00-3.47)
SPOP2 GUAJ ARAC	1.060 (0.00-3.27)	*	0.790 (0.00-2.67)	0.690 (0.00-3.40)
SPOP3 CUMI	1.750 (0.00-2.07)	1.790 (0.00-2.60)	*	1.030 (0.00-2.93)
SPOP4 CAUL UNIF	2.870 (0.00-3.33)	1.740 (0.06-4.87)	1.540 (0.00-3.00)	*

Sendo $M_{ij} = (m_{ij}/\mu)$ sendo m_{ij} a taxa de migração entre localidade i para j , e μ a taxa de mutação; EUCA, JAMB, GUAJ, ARAC, CUMI, CAUL e UNIF são respectivamente as subpopulações DE *A. psidii* agrupadas pelas espécies *Eucalyptus* spp., *S. jambos*, *P. guajava*, *P. guineense*, *S. cumini*, *M. cauliflora* e *E. uniflora*.

Figura 3: Estimativas do número efetivo de migrantes por geração (N_{imji}), obtidas considerando os isolados de quatro subpopulações de *A. psidii* associados as sete espécies hospedeiras da família Myrtaceae no Brasil e Uruguai, para os dez loci microsatélites utilizados.

		Locus 1				Locus 2			
		SPOP1	SPOP2	SPOP3	SPOP4	SPOP1	SPOP2	SPOP3	SPOP4
Doa	SPOP1	*	1,70	2,09	1,86	*	4,53	0,47	2,13
	SPOP2	0,62	*	1,62	1,01	2,05	*	0,32	2,22
	SPOP3	1,41	3,62	*	7,28	1,85	6,18	*	0,62
	SPOP4	1,08	2,61	2,79	*	2,09	6,44	0,36	*
		Recebe				Recebe			

Continua...

A

Locus 3

		SPOP1	SPOP2	SPOP3	SPOP4
Doa	SPOP1	*	0,26	0,15	0,96
	SPOP2	0,09	*	0,15	1,54
	SPOP3	0,09	0,17	*	0,47
	SPOP4	0,11	0,20	0,30	*
		Recebe			

Locus 4

		SPOP1	SPOP2	SPOP3	SPOP4
Doa	SPOP1	*	0,04	20,62	64,70
	SPOP2	0,07	*	26,30	35,20
	SPOP3	0,09	0,04	*	5,07
	SPOP4	0,11	0,05	0,33	*
		Recebe			

Locus 5

		SPOP1	SPOP2	SPOP3	SPOP4
Doa	SPOP1	*	0,12	16,57	2,60
	SPOP2	0,97	*	26,79	3,83
	SPOP3	1,50	0,20	*	4,64
	SPOP4	0,97	0,09	3,26	*
		Recebe			

Locus 6

		SPOP1	SPOP2	SPOP3	SPOP4
Doa	SPOP1	*	4,85	11,20	23,92
	SPOP2	1,30	*	15,60	15,42
	SPOP3	0,36	0,75	*	21,92
	SPOP4	2,00	3,57	5,30	*
		Recebe			

Locus 7

		SPOP1	SPOP2	SPOP3	SPOP4
Doa	SPOP1	*	0,04	2,33	8,56
	SPOP2	0,10	*	1,30	3,06
	SPOP3	0,06	0,13	*	82,54
	SPOP4	0,05	0,14	30,86	*
		Recebe			

Locus 8

		SPOP1	SPOP2	SPOP3	SPOP4
Doa	SPOP1	*	8,18	93,80	88,59
	SPOP2	0,13	*	112,10	89,32
	SPOP3	0,20	1,85	*	110,73
	SPOP4	0,16	2,84	111,30	*
		Recebe			

Locus 9

		SPOP1	SPOP2	SPOP3	SPOP4
Doa	SPOP1	*	0,04	2,02	5,04
	SPOP2	0,86	*	3,05	10,29
	SPOP3	0,72	62,87	*	10,36
	SPOP4	0,66	151,70	1,90	*
		Recebe			

Locus 10

		SPOP1	SPOP2	SPOP3	SPOP4
Doa	SPOP1	*	2,83	0,84	10,61
	SPOP2	5,77	*	0,56	7,49
	SPOP3	4,27	2,06	*	18,10
	SPOP4	2,58	3,13	0,49	*
		Recebe			

Sendo: SPOP1 (*Eucalyptus* spp. + *S. jambos*), SPOP2 (*P. guajava* + *P. guineense*), SPOP3 (*S. cumini*) e SPOP4 (*M. cauliflora* e *E. uniflora*).

Tabela 3: Número efetivo de migrantes por geração ($N_i m_{ji}$), estimado para as subpopulações de *A. psidii* associada as espécies hospedeiras da família Myrtaceae no Brasil e Uruguai, e considerando o intervalo de confiança de 95%.

Valores de $N_i m_{ij}$	Recebem			
	SPOP1 EUCA JAMB	SPOP2 GUAJ ARAC	SPOP3 CUMI	SPOP4 CAUL UNIF
SPOP1 EUCA JAMB	*	0.044 (0.01-3.23)	0.072 (0.00-2.55)	0.388 (0.00-2.95)
SPOP2 GUAJ ARAC	0.063 (0.00-2.78)	*	0.075 (0.00-2.27)	0.454 (0.00-2.89)
SPOP3 CUMI	0.104 (0.00-1.76)	0.099 (0.00-2.21)	*	0.677 (0.00-2.49)
SPOP4 CAUL UNIF	0.171 (0.00-2.83)	0.096 (0.04-4.14)	0.075 (0.00-2.55)	*

Sendo os valores são número efetivo de migrantes por geração ($N_i m_{ji}$), obtida por $xN_i m_{ji} = \theta_i * M_{ij}$ e abaixo os intervalos de confiança de 95%, as siglas EUCA, JAMB, GUAJ, ARAC, CUMI, CAUL e UNIF são respectivamente as subpopulações de *A. psidii* agrupadas pelas espécies *Eucalyptus* spp. , *S. jambos* , *P. guajava*, *P. guineense*, *S. cumini*, *M. cauliflora* e *E. uniflora*.

Tabela 4: Estimativas de tamanho efetivo populacional e $\theta_i = 4N_e\mu$ para as subpopulações de *A. psidii* associada as espécies hospedeiras da família Myrtaceae no Brasil e Uruguai, e considerando o intervalo de confiança de 95%.

Localidade	Tamanho efetivo populacional	$\theta_i = 4N_e\mu$
SPOP1 EUCA JAMB	119,26	0,238
SPOP2 GUAJ ARAC	110,78	0,221
SPOP3 CUMI	189,25	0,378
SPOP4 CAUL UNIF	1315,08	2,630

Onde N_e é o tamanho efetivo populacional; μ é a taxa de mutação por geração; as siglas EUCA, JAMB, GUAJ, ARAC, CUMI, CAUL e UNIF são respectivamente as subpopulações de *A. psidii* agrupadas pelas espécies *Eucalyptus* spp., *S. jambos*, *P. guajava*, *P. guineense*, *S. cumini*, *M. cauliflora* e *E. uniflora*.

Os tamanhos efetivos populacionais (N_e) estimados da expressão $\theta_i = 4N_e\mu$, são de 119,26; 110,78; 189,25 e 1315,08 para SPOP1, SPOP2, SPOP3 e SPOP4 respectivamente (Tabela 4).

5.2. Diversidade genética e estrutura populacional

Com base no agrupamento SPOP1 (*Eucalyptus* spp. + *S. jambos*), SPOP2 (*P. guajava* + *P. guineense*), SPOP3 (*S. cumini*) e SPOP4 (*M. cauliflora* e *E. uniflora*) foi realizado a análise de variância molecular (AMOVA) considerando a estrutura hierárquica entre subpopulações, entre hospedeiros dentro de subpopulação e dentro de hospedeiros (Tabela 5).

A porcentagem da variação foi respectivamente de 39,43% entre as subpopulações, 16,29% entre os hospedeiros dentro de subpopulação e 44,28% dentro dos hospedeiros.

Foram gerados estimadores análogos ao F_{ST} , chamadas Φ -statistics, as quais foram estimadas, sendo $\Phi_{CT} = 0,394$ (Entre Subpopulações); $\Phi_{SC} = 0,269$ (Entre Hospedeiros dentro de Subpopulação); $\Phi_{ST} = 0,556$ (Dentro dos Hospedeiros).

Tabela 5: Análise de variância molecular (AMOVA) obtidas para a espécie *A. psiddi* considerando a estrutura hierárquica utilizando dez *loci* microssatélites utilizados na pesquisa.

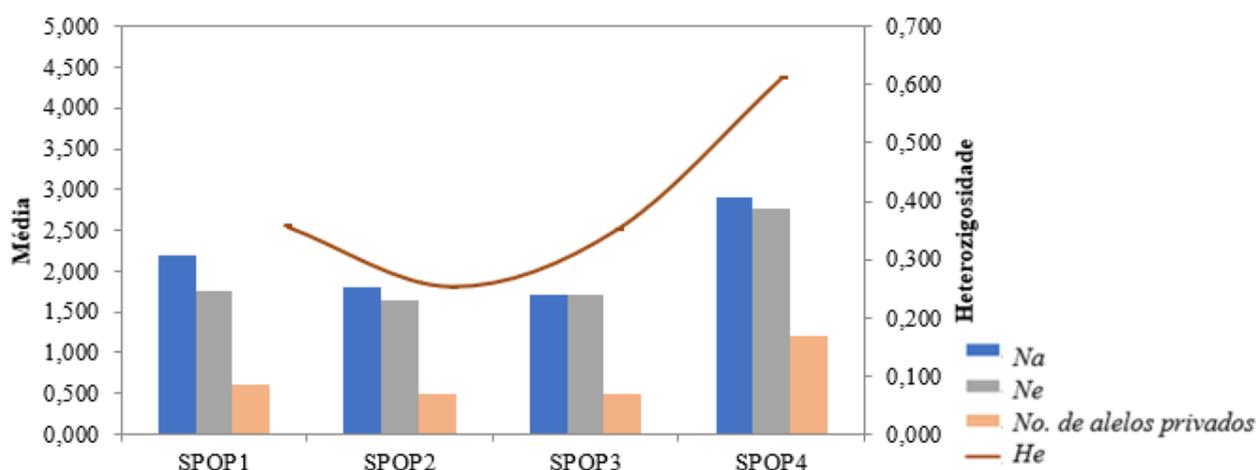
Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Componente da variância	Porcentagem da variação
Entre Subpopulações	3	317,597	1,38833	39,43%
Entre Hospedeiros dentro de Subpopulação	3	20,554	0,57338	16,29%
Dentro dos Hospedeiros	289	450,593	1,55914	44,28%
Total	295	788,743	3,52086	100

Estimativas feitas no *software* Alerquin 3.5 Excoffier e Lischer (2010) com base em Weir e Cockerham (1984); Excoffier, Smouse e Quattro (1992) e Weir (1996).

Os padrões alélicos descritivos obtidos para as subpopulações SPOP1, SPOP2, SPOP3 e SPOP4 estão postos na figura 4. Os valores estimados de heterozigidade esperada foram de $He = 0,355; 0,252; 0,350$ e $0,612$, ambos para SPOP1, SPOP2, SPOP3 e SPOP4.

Figura 4 : Padrões alélicos entre subpopulações de *A. psidii* com base em 10 *loci* microssatélites. Sendo número médio de alelos diferentes (N_a), número médio de alelos efetivos (N_e), número médio de alelos privados (*No. de alelos privados*) e heterozigidade esperada (He) para os quatro grupos populacionais considerados no trabalho. Sendo SPOP1 (*Eucalyptus* spp. + *S. jambos*), SPOP2 (*P. guajava* + *P. guineense*), SPOP3 (*S. cumini*) e SPOP4 (*M. cauliflora* e *E. uniflora*).

Padrões alélicos nas subpopulações



Fonte: O autor

Foram estimados os valores pareados análogos de F_{ST} para cada subpopulação (Tabela 6) Excoffier e Lischer (2010). Os valores obtidos de F_{ST} foram de 0,560 (SPOP1 com SPOP2); 0,468 (SPOP1 com SPOP3); 0,419 (SPOP1 com SPOP4); 0,608 (SPOP2 com SPOP3); 0,565 (SPOP2 com SPOP3) e 0,355 (SPOP3 com SPOP4).

Tabela 6: Valores de F_{ST} abaixo da diagonal. Valores de probabilidade com base em 9999 permutações é mostrada acima da diagonal.

Subpopulações	SPOP1 EUCA JAMB	SPOP2 GUAJ ARAC	SPOP3 CUMI	SPOP4 CAUL UNIF
SPOP1 EUCA JAMB		$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$
SPOP2 GUAJ ARAC	0,560		$p < 0,01$	$p < 0,01$
SPOP3 CUMI	0,468	0,608		$p < 0,01$
SPOP4 CAUL UNIF	0,419	0,565	0,355	

SPOP1 (*Eucalyptus* spp. + *S. jambos*), SPOP2 (*P. guajava* + *P. guineense*), SPOP3 (*S. cumini*) e SPOP4 (*M. cauliflora* e *E. uniflora*).

6. DISCUSSÃO

6.1. Estimativas de Fluxo gênico e tamanho efetivo via coalescência

Obteve-se evidências importantes em relação aos processos evolutivos e genético populacionais de *A. psidii*, partindo das estimativas fluxo gênico e tamanho efetivo populacional. Entre diferentes cenários populacionais propostos nos modelos desse trabalho, o que teve maior evidência foi o modelo 2, cujo as subpopulações foram agrupadas de acordo com o hospedeiro e fundamentado no critério de escolha na probabilidade do modelo.

A seleção do modelo foi feita pela comparação das verossimilhanças (BEERLI, 2012), em que é somado os cenários dos modelos e então os modelos são proporcionalizados ao todo para comparação. Então, o modelo com maior proporção de verossimilhança é predito como o mais provável. Desse modo, as subpopulações ficaram agrupadas como SPOP1 (*Eucalyptus* spp. + *S. jambos*), SPOP2 (*P. guajava* + *P. guineense*), SPOP3 (*S. cumini*) e SPOP4 (*M. cauliflora* e *E. uniflora*).

Salienta-se que o presente trabalho é o primeiro relato do uso de marcadores *SSR* abordando os parâmetros de fluxo gênico e tamanho efetivo total, com foco na teoria da coalescência para estudos populacionais de *A. psidii*.

Em relação a taxa de migração escalonada pela taxa de mutação (M_{ij}) os valores são provenientes da relação (m_{ij}/μ). Em que, m_{ij} é a taxa de imigração da população a qual é dependente da taxa de mutação, em outras palavras, significa razão do quão importante é o processo de migração, em relação a taxa de mutação, no que diz respeito a introdução da variabilidade nas populações estudadas.

Esses resultados devem ser interpretados com cautela, pois podem de maneira ambígua indicar fluxo gênico elevado ou baixa taxa mutação. Podendo gerar dificuldades para uma interpretação realista quando não se tem o conhecimento prévio das taxas de mutação. Dependendo dos valores de μ nas populações estudadas, pois taxas de migração diferentes podem ter o mesmo impacto na estrutura populacional, e as taxas de migração semelhantes podem ter impacto diferente na estrutura populacional (BEERLI, 1998). Usualmente o parâmetro mais utilizado para migração é o número efetivo de migrantes por geração (N_m), obtido facilmente pela manipulação algébrica da expressão $xN_m = \Theta_i * M_{ij}$.

Os valores referentes ao número efetivo de migrantes por geração (N_m ou $N_{im_{ji}}$) em todas as subpopulações foram relativamente baixos (todos < 1 unidade), variando entre 0,044 (SPOP1 → SPOP2) e 0,677 (SPOP3 → SPOP4). Curiosamente, em alguns casos as espécies de hospedeiros as quais foram coletadas as amostras de *A. psidii* utilizadas no presente trabalho ocorrem geograficamente próximas, entretanto, não apresentam fluxo gênico suficiente, o que indica uma variabilidade genética entre as cepas. Nas situações em que o fluxo gênico é superior a uma unidade, o efeito pode ser suficiente para prevenir parcialmente a diferenciação das frequências alélicas por deriva genética e fazer com que as populações se mantenham como uma única unidade evolutiva.

Algumas hipóteses podem explicar essa diferenciação entre as espécies geograficamente próximas, relacionando isso ao isolamento reprodutivo e a biologia reprodutiva. O ciclo de reprodução da *A. psidii* ainda não é totalmente elucidado, a princípio Ruiz et al. (1989) colocou que o espermagônio e aécio ocorrem em um hospedeiro alternativo e desconhecido, semelhante as ferrugens heteroécias. Isso implicaria em uma barreira pois cada conjunto de hospedeiros para que o fungo complete o ciclo, seriam como uma barreira geográfica, porém, isso não é consenso. Coutinho et al. (1998) sugeriu que ciclo de vida ocorre em um único hospedeiro sem produção de espermagônio e aécio.

Graça et al. (2013) e Machado et al. (2015), não encontraram evidências que sustentassem a reprodução sexuada como principal meio de reprodução para os seus conjuntos de dados. Para esses autores, *A. psidii* se reproduz principalmente pela formação de uredinósporos, por sucessivos ciclos mitóticos, ainda consideram a diversidade genotípica observada em populações de *A. psidii* como produto de mutação e não da reprodução sexual. Entretanto, McTaggart et al. 2018 realizaram experimentos que mostraram que *A. psidii* completa as partes assexuadas e sexuadas de seu ciclo de vida em um único hospedeiro (autoécio) e aquela recombinação meiótica produz basidiósporos que são capazes de infectar espécies de Myrtaceae.

McTaggart et al. (2020), testaram a hipótese de que a reprodução por basidiósporos ocorre em infecções de Myrtaceae na Nova Zelândia e África do Sul. Obtiveram fortes evidências do papel do ciclo sexual na diversidade, encontrando presença de um estágio sexual e alta diversidade genotípica dentro de uma população invasora.

Dessa maneira, podemos assumir que as subpopulações estão sujeitas a ambos os tipos de reprodução (sexuada e assexuada) e supor cenários em que esteja ocorrendo processos de especiação para explicar o motivo de não ocorrer fluxo gênico entre os indivíduos geograficamente próximos, mesmo sendo possível.

Outra hipótese, a especiação leva à formação de novos grupos genéticos (sinônimos de linhagem, raça, cepas, estirpes, espécies, etc...), envolvendo o isolamento reprodutivo entre os grupos de uma população ancestral, os quais vão acumulando diferenças genéticas entre si.

É plausível supor que possa estar ocorrendo especiação simpátrica, a qual acontece sem uma separação geográfica. Nesta, as populações da mesma espécie vivem em um mesmo local, porém, não há cruzamento devido a incompatibilidade resultante de rearranjos cromossômicos ou aloploidia, ou por meio de mutações que favoreçam indivíduos com certo genótipo intercruzarem entre si em detrimento os demais (KLEIN, 2017).

Uma possibilidade é que ocorra o sistema de cruzamento tetrapolar (também chamado de bifatorial), impedindo que ocorra o intercruzamento entre as populações não compatíveis (NIEUWENHUIS et al., 2013). No decorrer do tempo as diferenças irão se acumular e causar a especiação. No entanto, é importante dizer que a especiação simpátrica se trata de uma das especiações mais raras. O cruzamento tetrapolar não é necessariamente um isolamento reprodutivo, e sim um mecanismo que consiste em dois *loci* de acasalamento diferentes. Nesse mecanismo apenas células com alelos diferentes nos *loci* podem acasalar para produzir descendentes viáveis, de modo que possa aumentar a variabilidade e diminuir o cruzamento entre aparentados (NIEUWENHUIS et al., 2013; MAIA et al., 2015).

Granados et al. (2017), estudaram a diversidade genotípica de *A. psidii* associada a *Corymbia* spp., *Eucalyptus* spp., *Psidium* spp. e *Syzygium* spp. na Colômbia, juntamente com coleções da Austrália, Brasil, Indonésia, Paraguai e África do Sul. Usaram sete marcadores microssatélites em 58 amostras em 15 gêneros dentro de Myrtaceae. Entre amostras da Colômbia detectou duas linhagens de *A. psidii*, sendo um genótipo desconhecido em *P. guajava*, diferente dos amostrados no Brasil e o biótipo pandêmico que se encontra espalhado nos países do pacífico, como Austrália, Hawaii e Indonésia. Para explicar a diferença entre os genótipos de *A. psidii* em *P. guajava* entre o Brasil e Colômbia, cita sobre o processo de especiação alopátrica. De modo que a floresta

amazônica funcionaria como uma barreira de 4700 km, a qual evitaria o fluxo gênico entre populações.

Os resultados em relação aos padrões de agrupamentos das subpopulações formadas nesse trabalho e as condições edafoclimáticas geográficas também podem ser explicados pela possibilidade de especiação parapátrica. Nesse modo há um gradiente ambiental que seleciona fenótipos divergentes sem que as populações percam o contato entre si, pois há uma extensa área de ocorrência de *A. psidii* nas amostras utilizadas nesse trabalho englobando os estados da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul, além de um indivíduo do Uruguai. A maioria das áreas de ocorrência estão situadas dentro do Bioma Mata Atlântica, entretanto, há variações edafoclimáticas e ecossistêmicas na faixa de ocorrência, onde consequentemente as espécies hospedeiras e os gradientes ambientais são variáveis ao longo de sua distribuição geográfica.

Devido a interação entre seleção natural e fluxo gênico, se a magnitude da pressão de seleção for grande, mesmo em cenários em que ocorra fluxo gênico intenso é possível manter populações distintas. Caso a pressão de seleção diminua, o fluxo gênico irá homogeneizar as frequências alélicas rapidamente em populações distintas. Porém, em teoria, uma grande força seletiva irá manter a heterogeneidade entre duas populações, mesmo ocorrendo fluxo gênico (RIDLEY, 2009; HARTL e CLARCK, 2010).

Cenários com a especiação peripátrica também são possíveis, nesse processo ocorre a dispersão de indivíduos da população original (KLEIN, 2017). Geralmente ocorre pelo efeito do fundador, fazendo com que sua composição genotípica e fenotípica se distancie cada vez mais da original.

Em relação ao hospedeiro, sabe-se que há um processo chamado *host jump* (salto de hospedeiro) para alguns fitopatógenos. Nesse processo os patógenos se estabelecem em novos grupos de hospedeiros geneticamente distintos, levando ao isolamento do *pool* genético original, diferenciação genética e à especiação (CHOI e THINES, 2015). A princípio achavam ser possível que a *A. psidii* tivesse se deslocado de *P. guajava* para *Eucalyptus* spp. o salto de hospedeiro, hipótese rejeitada por Graça et al. (2013).

Contudo McTaggart et al. (2016), ao estudarem a linha do tempo evolutiva de várias espécies da ordem Pucciniales, inclusive de várias *Puccinias* spp. afirmam que o “salto de hospedeiro” moldou a diversidade das espécies de fungos causadores de ferrugem existentes. Outra evidência que não corrobora com Graça et al. (2013) e demonstram a importância do salto de hospedeiro para *A. psidii*, é a introdução do

patógeno na Austrália, em que colonizou uma variedade de Myrtaceae endêmicas (CARNEGIE e LIDBERTTER, 2012; CARNEGIE et al., 2016). Inclusive o salto de hospedeiros é uma forma de sobrevivência sem a qual os mesmos seriam eliminados, devido ao processo coevolutivo com os hospedeiros (THINES, 2019). Sendo esse processo plausível para explicar a diversidade genética de *A. psidii* observada no presente trabalho.

Essa diversidade genética observada, pode indicar que esteja ocorrendo a especiação deste fungo. Outro ponto que sustenta as hipóteses de que as subpopulações estejam em processos especiação, é o surgimento de novas linhagens de *A. psidii* no Brasil (GRAÇA et al. 2011; ALMEIDA et al. 2021). A percepção dessa variabilidade não é fato novo, todavia creditava-se a fatores fisiológicos do fungo (CASTRO et al., 1983), atribuindo ser uma variabilidade relacionada apenas a fatores de virulência do patógeno (XAVIER, 2002).

Possivelmente isso está atrelado ao aumento considerável de áreas ocupadas por plantios comerciais de *Eucalyptus* spp., dos sucessivos ciclos e do tempo em que o eucalipto é cultivado em conjunto com a fragmentação da Mata Atlântica, que pode ter servido como barreira entre populações de *A. psidii* que ocupam manchas de habitat vizinhas, hipótese está baseada nas diferenças genéticas.

No que concerne ao padrão de associação entre *A. psidii* e os hospedeiros obtidos nesse trabalho, os resultados reforçam a relação dos processos coevolutivos com fatores de seleção, deriva genética, migração e mutação. Os processos evolutivos são capazes de afetar a variabilidade e a capacidade de adaptação da espécie no ambiente em que ela está inserida (RYDLEY, 2007). Entretanto, quando se trata de doenças, as interações ecológicas se tornam multifatoriais e passam a envolver os aspectos do fungo, ambiente, do hospedeiro e também dos vetores, contemplando todos os aspectos dessa dinâmica (AGRIOS, 2005).

A teoria evolutiva da “hipótese de Rainha Vermelha” (VAN VALEN, 1973) explica a coevolução e a constante “guerra armamentista” entre planta-patógeno. Situações as quais duas espécies competidoras evoluem de maneira que a competição se mantém estável. O nome vem do livro “Alice através do espelho” de Lewis Carroll que diz “*aqui neste país Alice, você precisa correr o máximo que puder para permanecer no lugar...*”.

Mudanças coevolutivas que ocorreram nos *pools* gênicos do hospedeiro e do patógeno envolvido, que tenham grande impacto no valor adaptativo, irão desequilibrar

essa balança (BARBIERI e CARVALHO, 2001). Essa situação do ponto de vista fitopatológico é preocupante, pensando em um contexto de plantios comerciais. Nesses plantios a seleção dos genótipos é feita de maneira artificial (não há pressões de seleção recíprocas), sendo baseada em caracteres de interesse como redução do teor de casca, retidão de fuste, redução do teor de lignina, etc... nem sempre considerando a resistência da planta a patógenos. Pelo fato de *A. psidii* ser um fungo biotrófico, a coevolução tem maior impacto na interação planta-patógeno em relação aos fungos que obtém sua nutrição de organismos mortos (BARBIERI e CARVALHO, 2001).

Fica evidente a importância da conservação genética de maneira adequada em espécies comerciais, visando garantir a existência genótipos resistentes para serem usados em programas de melhoramento. Esta estratégia leva em consideração a possibilidade de a resistência ser suplantada ou reduzida pelo surgimento de novos genótipos do patógeno capazes de se adaptarem às defesas presente nos genótipos cultivados. A manutenção de materiais geneticamente dissimilares e interespecíficos nos bancos de germoplasma também podem ajudar no programa de melhoramento. Segundo Schulze-Lefert e Panstruga (2011), a resistência do não-hospedeiro a um determinado patógeno é função da distância filogenética ao hospedeiro desse patógeno. Essa pode ser uma estratégia interessante para *Eucalyptus* spp., sabendo-se que há uma grande variedade de espécies, algumas compatíveis e passíveis de hibridação.

Stewart et al. (2018) estudaram a *A. psidii* por meio de marcadores microssatélites em mais de duzentas amostras coletadas entre Brasil, Costa Rica, Jamaica, Mexico, Porto Rico, Uruguai e Estados Unidos, abrangendo 18 espécies de hospedeiros associados a *A. psidii*. Dentro do estudo foram obtidos 9 agrupamentos genéticos, sendo cinco desses agrupamentos feitos com amostras coletadas no Brasil, as quais formaram clusters semelhantes ao agrupamento das subpopulações utilizadas nessa pesquisa.

Entende-se que associação fungo-planta observada no presente trabalho, as semelhanças fisiológicas e biológicas, seguem essa lógica. Assume-se que se torna mais acessível para o patógeno interagir com um hospedeiro relacionado em detrimento de um hospedeiro não relacionado. Por exemplo o *S. jambos* tem como centro de origem o sul da Ásia, regiões como a Índia e também a Malásia e ilhas próximas, antes de ser cultivada no Brasil (LORENZI, 2006). Por ser mais próximo a Austrália, centro de origem de *Eucalyptus* spp. admite-se maior similaridade a essas plantas que a *P. guajava*. Dessa forma justifica-se o agrupamento das populações de *S. jambos* com *Eucaluyptus* spp.

observados por nós bem como por Stewart et al. (2018). podendo ser indício de uma coevolução na região de ocorrência.

Isto elucidava questões tratadas no passado, por fitopatologistas como efeitos fisiológicos e/ou de variação de virulência de isolados de *A. psidii* (CASTRO et al., 1983; XAVIER, 2002 e a literatura citada por eles). O que confere na verdade uma questão não evolutiva, mais sim co-evolutiva entre patógeno e hospedeiro.

Analisando criteriosamente os agrupamentos formados ratifica-se todo o raciocínio feito. As amostras de *A. psidii* coletadas das espécies *P. guajava* e *P. guineense* ficaram agrupadas na mesma subpopulação, ambos os hospedeiros são do mesmo gênero botânico, além de serem árvores nativas do América do Sul e com ampla faixa de dispersão natural, tendo semelhanças fisiológicas, anatômicas e morfológicas, além dos aspectos ecológicos e exigências climáticas. *Eugenia uniflora* e *Myrciaria cauliflora* apesar de não serem do mesmo gênero, ambas têm relações filogenéticas próximas na família myrtaceae, com o mesmo local de origem e condições edafoclimáticas, além de ocorrerem principalmente na mata atlântica.

O tamanho efetivo populacional (N_e) estimado nas subpopulações foram de 119,26 na SOPO1, 110,78 na SPOP2, 189,25 na SPOP3 e de 1315,08 para SPOP4 (Tabela 4). Devido ao tamanho efetivo reduzido, os efeitos causados pela deriva genética podem ser mais acentuados nas SPOP1, SPOP2 e SOPO3 se comparados com SOPO4, como aumento da variância entre populações, diminuição da diversidade dentro de populações, colaborando para fixação ou perda de alelos.

Uma das causas para um N_e elevado na SPOP4, em relação as demais, talvez seja a subpopulação ser formada isolados vindos de espécies hospedeiras de dois gêneros distintos. Entretanto, estudos recentes investigaram a relação entre o tamanho efetivo da população de um patógeno e o número de hospedeiros infectados (ROSENBERG e NORDBORG 2002; KOELLE et al., 2011; DEARLOVE e WILSON, 2013). Não existe uma associação direta entre N_e e número de hospedeiros infectados, devido à complexidade das interações (VOLZ et al., 2017).

O tamanho efetivo populacional é uma medida de representatividade genética, e geralmente vai ser menor que o número de indivíduos da população (censo), principalmente em casos como o da *A. psidii*, devido as particularidades ecológicas, biológicas e ligadas ao sistema de reprodução. É importante fazer esse adendo, pois as mutações apesar de serem aleatórias, é influenciado pelo número de organismos da

população. Grandes populações de patógenos possuem maior número de mutantes do que pequenas populações (MCDONALD e LINDE, 2002).

Possivelmente as subpopulações de *A. psidii* irão ter diferentes comportamentos ecológicos e representar ameaças invasivas distintas, sendo indicado estudos que possam mensurar os riscos invasivos apresentados pelas diferentes subpopulações.

6.2. Diversidade genética e estrutura populacional

A variabilidade entre as quatro subpopulações de *A. psidii* que foram amostradas no Brasil e Uruguai, foram demonstradas pelos resultados apresentados. Em relação a estruturação genética, a análise de variância molecular (AMOVA) utilizando dez *loci* revelou que a maioria da porcentagem da variação encontra-se dentro das populações de uma mesma espécie de hospedeiros.

Maia (2009) estudou isolados *H. vastatrix*, agente causal da ferrugem do cafeeiro, divididos em três populações com base nos hospedeiros, sendo cultivares de *Coffea arabica*, *Coffea canephora* e derivados de Híbrido de Timor (HDT) e Icatu. A AMOVA demonstrou que a maior variância genética (99,56%) se encontra dentro de hospedeiros. Entre os fatores que possam explicar isso, cita-se que mecanismos de variabilidade genética, concomitantemente com dispersões de inóculo, promovem grande variabilidade genética dentro da população, no sentido de promover a homogeneização das frequências alélicas nas populações do patógeno.

Graça et al. (2013), relatam que a estrutura genética de *A. psidii* no Brasil é extremamente influenciada pela espécie de hospedeiro parasitada. Entretanto, Ferrarezi et al. (2022) partindo de estudos feitos em genes de acasalamento e *homeodomínios*, levanta a hipótese teórica de populações de *A. psidii* estruturadas por faixa de hospedeiros poderiam cruzar com hospedeiros universais, conseqüentemente gerando implicações para a biossegurança.

Faradilla et al. (2021), estudaram a variabilidade de *A. psidii* com 28 amostras coletadas de três diferentes hospedeiros (*Syzygium polyanthum*, *Syzygium myrtifolium* e *Melaleuca cajuputi*), por meio de sete *loci* SSR em Java, Indonésia obtiveram valores de que variaram entre $He=0,381$ em *S. polyanthum*; $He=0,286$ em *M. cajuputi* e $He=0,268$ para *S. myrtifolium*. Esses valores se assemelham com os resultados médios obtidos, exceto para a SPOP4, que teve valores acima dos observados nesse trabalho.

Um dos fatores que possa estar ligado a isso, é que a *A. psidii* tem como centro de origem a América do Sul, e apenas em uma escala cronológica relativamente recente foi introduzida na Indonésia, podendo se especular ainda que tenha ocorrido efeito fundador, onde a colonização do habitat é iniciada por alguns poucos membros da população de origem podendo haver uma variação genética reduzida em relação a população original (FUTUYMA, 1992).

Em três das subpopulações consideradas nesse estudo, a diversidade genética ou heterozigosidade média esperada foi maior que a heterozigosidade observada, exceto na SPOP4.

As frequências proporcionalmente altas de alelos privados associados com isolados coletados em uma determinada espécie de hospedeiro podem ser indicativos de ausência de fluxo gênico. Uma possibilidade é que ocorra o sistema de cruzamento tetrapolar (também chamado de bifatorial), impedindo que ocorra o intercruzamento entre as populações não compatíveis (NIEUWENHUIS et al., 2013; FERRAREZI et al., 2022).

Stewart et al. (2018) estudando nove grupos genéticos distintos de *A. psidii* por meio de seis *loci* SSR e com amostras oriundas da Costa Rica, Jamaica, México, Porto Rico e EUA-Havaí, EUA-Califórnia; Brasil, Jamaica e Uruguai obteve valores de H_e que variaram entre 0,17 a 0,51. Em relação ao nível de diferenciação entre os grupos considerados, obteve um valor médio de $F_{ST} = 0,471$, sendo que os valores pareados de F_{ST} variaram de 0,06 (entre Jamaica, México, Porto Rico, Hawaii amostra C1 e Estados Unidos Flórida – amostra C4) a 0,46 (entre isolados oriundos Brasil).

Esses valores obtidos corroboram com a hipótese ausência de fluxo entre as subpopulações que ocorrem geograficamente próximas, de modo que isso colabora para uma maior heterogeneidade entre os grupos analisados.

7. CONCLUSÃO

A inferência de parâmetros relativos ao tamanho efetivo, fluxo gênico e diversidade foi fundamental para uma melhor compreensão da genética populacional da *A. psidii*.

Não ocorreu fluxo gênico entre as subpopulações em valores acima de uma unidade, mesmo em locais geograficamente próximos, entretanto, foi possível fazer inferências e propor cenários em relação as histórias evolutivas e demográficas, bem como os fatores associados a evolução da *A. psidii*.

As informações obtidas podem servir de base e auxiliar no sentido do manejo integrado da doença e planejamento, sendo importante a manutenção melhoramento genético.

As subpopulações de *A. psidii* poderão ter diferentes comportamentos ecológicos e representar ameaças invasivas distintas, sendo indicado estudos que possam mensurar os riscos invasivos apresentados pelas diferentes subpopulações. Ficando evidente a importância da conservação genética de maneira adequada em espécies comerciais, visando garantir a existência genótipos de plantas resistentes para serem usados em programas de melhoramento, considerando que a resistência será suplantada ou reduzida pelo surgimento de novas raças de *A. psidii* capazes de se adaptarem às defesas presente nos genótipos atualmente cultivados.

8. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2005.
- AINSWORTH, G. C. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. Cabi, 2008. 771 p.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2 Edição. Viçosa, MG. Editora UFV. 2009. 500 p.
- ALMEIDA, R.F.; MACHADO, P.S.; DAMACENA, M.B.; SANTOS, S.A., GUIMARÃES, L.M.S.; KLOPFENSTEIN, N.B.; ALFENAS, A.C. A new highly aggressive race of *Austropuccinia psidii* infects a widely planted, myrtle rust-resistant, eucalypt genotype in Brazil. **Forest Pathology**, v. 51, n. 2, p. e12679, 2021.
- APARECIDO, C. C.; FIGUEIREDO, M. B.; FURTADO, E. L. Groups of physiological variability in *Puccinia psidii* populations. **Summa Phytopathologica**, v. 29, n.3, p. 234-238, 2003.
- AUER, C. G.; DOS SANTOS, A. F.; BORA, K. C. **A ferrugem do eucalipto na região Sul do Brasil**. 5 p, 2010.
- BAHLO M, GRIFFITHS R. C. **Genetree**. Program and documentation distributed by the authors. Department of Mathematics, Monash University, Sydney, Australia., 1998.
- BAHLO, M.; GRIFFITHS, R. Inference from gene trees in a subdivided population. **Theoretical population biology**, v. 57, p. 79-95, 2000.
- BARBIERI, R.; CARVALHO, F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 7, n. 2, 2001.
- BEENKEN, L. *Austropuccinia*: a new genus name for the myrtle rust *Puccinia psidii* placed within the redefined family Sphaerophragmiaceae (Pucciniales). **Phytotaxa**. v. 297, p. 53–61, 2017.
- BEERLI, P. "MIGRATE–Population Genetics Inference Using the Coalescent." 2008.
- BEERLI, P. Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. **Bioinformatics**, v. 22, n. 3, p. 341-345, 2006.

BEERLI, P. Effect of unsampled populations on the estimation of population sizes and migration rates between sampled populations. **Molecular Ecology**, v.13, p. 827-836, 2004.

BEERLI, P. Estimation of migration rates and population sizes in geographically structured populations. In **Advances in Molecular Ecology**, edited by G. Carvalho, of NATO Science Series A: Life Sciences. Amsterdam: IOS Press. v. 306, p. 39-53, 1998.

BEERLI, P. How to use MIGRATE or why are Markov chain Monte Carlo programs difficult to use? **Population genetics for animal conservation**. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, p.39-77, 2009.

BEERLI, P. **MIGRATE documentation** (version 3.6). Technical Report. 2013 Disponível em: <http://popgen.sc.fsu.edu/Migrate/Migrate-n.html>. Acesso em: 14 de junho de 2018.

BEERLI, P.; PALCZEWSKI, M. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. **Genetics**, v.185, p. 313-326, 2010.

BEERLI, P., FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. n.98, p. 4563-4568, 2001.

BEERLI, P., FELSENSTEIN, J. Maximum likelihood estimation of migration rates and population numbers of two populations using a coalescent approach. **Genetics** v. 152, p.763-773, 1999.

BERTONCINI, G.H; TAMBARUSSI, E.V; SEBBENN, A.M; DE MORAES, C.B; TEIXEIRA, L.G; FURTADO, E.L; ZIMBACK, L; MORI, E.S; Rust resistance and mating system in Eucalyptus grandis hill ex maiden progenies. **Scientia Forestalis** V. 45, n. 114, p. 405-413, 2017.

BHARGAVA, A.; FUENTES, F. F. Mutational dynamics of microsatellites. **Molecular biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 250-266, 2010.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 532 p.

- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 7. edição. Viçosa: UFV, 2017.
- BUSO, G. S. C. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 6, p. 46-50, 2003.
- CABALLERO, A. Developments in the prediction of effective population size. **Heredity**, v. 73, p. 657-679, 1994.
- CARNEGIE, A. J.; LIDBETTER, J. R. Rapidly expanding host range for *Puccinia psidii* sensu lato in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 13-29, 2012.
- CARNEGIE, A. J.; LIDBETTER, J. R.; WALKER, J.; HORWOOD, M. A.; TESORIERO, L.; GLEN, M.; PRIEST, M. J. *Uredo rangellii*, a taxon in the guava rust complex, newly recorded on Myrtaceae in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 39, n. 5, p. 463-466, 2010.
- CARNEGIE, A.J.; KATHURIA, A.; PEGG, G.S.; ENTWISTLE, P.; NAGEL, M.; GIBLIN, F. R. Impact of the invasive rust *Puccinia psidii* (myrtle rust) on native Myrtaceae in natural ecosystems in Australia. **Biological Invasions**, v. 18, n. 1, p. 127-144, 2016.
- CASELA, C. R. Variabilidade genética de patógenos e resistência de cultivares. In: **Seminário Nacional de Milho Safrinha**, 8., 2005, Assis. Anais... Campinas: Instituto Agrônomo, 2005. p. 189-194. Artigo em anais de congresso (ALICE), Embrapa Milho e Sorgo.
- CASTRO, H.A.; KRUGNER, T.L. IDERIHA, CH.F./ CAPELLO, MSC.; MARCHI, A.B. Inoculação cruzada de *Eucalyptus*, goiaba (*Psidium guajava*) e jambeiro (*Syzygium jambos*) com *Puccinia psidii*. **Fitopatologia Brasileira**, v.8, p. 491-497, 1983.
- CHARLESWORTH, B. Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 3, p. 195-205, 2009.
- CHOI, Y.; THINES, M. Host jumps and radiation, not co-divergence drives diversification of obligate pathogens. A case study in downy mildews and Asteraceae. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e.0133655, 2015.

COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J.; ALFENAS, A. C.; CROUS, P. W. Eucalyptus rust: a disease with the potential for serious international implications. **Plant disease**, v. 82, n. 7, p. 819-825, 1998.

CROW, J. F. Population genetics history: a personal view. **Annual review of genetics**, v. 21, n. 1, p. 1-22, 1987.

CRUZ C. D.; FERREIRA F. M.; PESSONI L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 620 p, 2011.

DEARLOVE, B.; WILSON, D. J. Coalescent inference for infectious disease: meta-analysis of hepatitis C. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1614, p. 20120314, 2013.

DIANESE, J.C.; MORAES, T.S. de A.; SILVA, A.R. Responses of Eucalyptus species to field infection by *Puccinia psidii*. **Plant Disease**, v.68, p.314-316, 1984.

ELLSTRAND, N. C. Is gene flow the most important evolutionary force in plants? **American Journal of Botany**, v. 101, p. 737-753, 2014.

ENNOS, R. A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, London, v.72, p.250-259, 1994.

EWING, G.; RODRIGO, A. Coalescent-based estimation of population parameters when the number of demes changes over time. **Mol. Biol. Evol.** V.23, p. 988-96, 2006.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, maio 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479–491, 1 jun. 1992.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F.C. **Introduction to Quantitative Genetics**. London, UK: Longman, 464 p, 1983.

FARADILLA, F. A.; PRIHATINI, I.; SURANTO, S.; SUSILOWATI, A. Genetic variation of *Austropuccinia psidii* in some species of Myrtaceae as host plants in Java,

Indonesia based on simple sequence repeats (SSR) markers. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 23, n. 1, 28 dez. 2021.

FERNANDES, R.C.; EVANS, H.C.; BARRETO, R.W. Confirmation of the occurrence of teliospores of *Hemileia vastatrix* in Brazil with observations on their mode of germination. **Tropical plant pathology**. v.34, p. 108-113, 2009. doi.org/10.1590/S1982-56762009000200005

FERRAREZI, J. A.; MCTAGGART, A. R.; TOBIAS, P. A.; HAYASHIBARA, C. A.; DEGNAN, R. M.; SHUEY, L. S.; QUECINE, M. C. *Austropuccinia psidii* uses tetrapolar mating and produces meiotic spores in older infections on *Eucalyptus grandis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 160, p. 103692, 2022.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal. Principias Doenças Florestais no Brasil**. Viçosa, Brasil. Sociedade de Investigações Florestais, 570 p, 1989.

FERREIRA, F. A.; MILANI, D. Diagnose visual e controle de doenças abióticas e bióticas do eucalipto no Brasil. **Mogi Guaçu: International Paper**, 98 p, 2002.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998.

FISHER, R. A. **The Genetical Theory of Natural Selection**. Dover; New York 2ªed. 291 p. 1930.

FU, Y. X; LI, W. H. Coalescing into the 21st century: an overview and prospects of coalescent theory. **Theoretical Population Biology**, v.56, p. 1-10, 1999.

FURTADO, E. L. **Doenças do eucalipto no Brasil**. 74 p, 2009.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 631, 1992.

GALLI, F. **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 2ª ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres Ltda. 706 p, 1980.

GIBLIN, F. **Myrtle rust report: New Caledonia**. University of the Sunshine Coast, Maroochydore, 2013.

GLEN, M.; ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; WINGFIELD, M. J.; MOHAMMED, C. *Puccinia psidii*: a threat to the Australian environment and economy—a review. *Australasian Plant Pathology*, v. 36, n. 1, p. 1-16, 2007.

GRAÇA, R. N.; AUN, C. P.; GUIMARÃES, L. M.; RODRIGUES, B. V.; ZAUZA, E. A.; ALFENAS, A. C. A new race of *Puccinia psidii* defeats rust resistance in eucalypt. ***Australasian Plant Pathology***, v. 40, n. 4, p. 442-447, 2011.

GRAÇA, R. N.; ROSS-DAVIS, A. L.; KLOPFENSTEIN, N. B.; KIM, M. S.; PEEVER, T. L.; CANNON, P. G.; AUN C. P.; MIZUBUTI, E. S. G.; ALFENAS, A. C. Rust disease of eucalypts, caused by *Puccinia psidii*, did not originate via host jump from guava in Brazil. ***Molecular ecology***, v. 22, n. 24, p. 6033-6047, 2013.

GRAÇA, R. N.; ROSS-DAVIS, A. L.; KLOPFENSTEIN, N. B.; KIM, M. S.; PEEVER, T. L.; CANNON, P. G.; AUN C. P.; MIZUBUTI, E. S. G.; ALFENAS, A. C. Data from: Rust disease of eucalypts, caused by *Puccinia psidii*, did not originate via host jump from guava in Brazil, **Dryad**, 2013. Dataset, <https://doi.org/10.5061/dryad.rk7n8>.

GRANADOS, G. M.; MCTAGGART, A. R.; BARNES, I.; RODAS, C. A.; ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. The pandemic biotype of *Austropuccinia psidii* discovered in South America. ***Australasian Plant Pathology***, v. 46, n. 3, p. 267-275, 2017.

GRIFFITHS, A. J. F; S.R. WESSLER; R.C. LEWONTIN; W. M. GELBART, D. T. SUZUKI, J. H. MILLER. **An Introduction to Genetic Analysis**. Editora W. H. Freeman; 8 ed. 2004. 800 p.

GRIFFITHS, R. C.; P. MARJORAM. Ancestral inference from samples of DNA sequences with recombination. ***Journal of Computational Biology*** v. 3 p. 479-502, 1996.

GRIFFITHS, R. C.; TAVARÉ, S. Sampling theory for neutral alleles in a varying environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* v. 344, p. 403-410, 1994.

GROVER, A.; SHARMA. P. C. Development and use of molecular markers: past and presente. ***Critical Reviews in Biotechnology*** v. 36, p. 290-302, 2016.

- HALLIBURTON, R. **Introduction to population genetics**. Pearson Education International, New Jersey.651p, 2004.
- HARDY, G. H. Mendelian proportions in a mixed population. **Science** v.28, p. 49-50. 1908.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de populações**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 660 p. 2010.
- HOLSINGER, K. E.; WEIR, B. S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . **Nature Reviews Genetics**, v.10, p. 639-650, 2009.
- IBÁ. Indústria Brasileira de Árvores: **Relatório Anual de 2020**. FGV IBRE – Instituto Brasileiro de Economia, 2020.
- IORIO, M.; GRIFFITHS, R. C. Importance sampling on coalescent histories. I. **Adv. Appl. Prob.** v.36, p.417-433, 2004.
- JOFFILY, J. Ferrugem do eucalipto. **Bragantia**, v. 4, n. 8, p. 475-487, 1944.
- JONES, A. G.; W. R. ARDREN. Methods of parentage analysis Extension to the more general case of polygamy for in natural populations. **Mol. Ecol.** v.12, p. 2511-2523, 2003.
- JUNGHANS, D. T.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A. Escala de notas para quantificação da ferrugem em Eucalyptus. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.184-188, 2003.
- KIMURA, M. Evolutionary rate at the molecular level. **Nature**, v. 217, p. 624-626, 1968.
- KIMURA, M.; OHTA, T. On some principles governing molecular evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, p. 2848-2852, 1974.
- KINGMAN, J. F. **Exchangeability and the evolution of large populations**. 1982A.
- KINGMAN, J. F. The coalescent. **Stochastic processes and their applications**, v.13, p. 235-248, 1982B.

KINGMAN, J. F., On the genealogy of large populations. **Journal of Applied Probability**. p. 27-43. 1982C.

KLEIN, A.L. **As fronteiras da diversidade: especiação e hibridização**. In: Leonardo Augusto Luvison Araújo (org) *Evolução Biológica: da pesquisa ao ensino*. Porto Alegre: Editora Fi, 2017, p.147-176.

KUHNER, M. K. LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. **Bioinformatics** v. 22, p. 768-770, 2006.

LATTA, R.G.; LINHART, Y.; FLECK, D.; ELLIOT, M. Direct and indirect estimates of seed versus pollen movement within a population of ponderosa pine. **Evolution** v.52, p.61-67, 1998.

LORENZI, H. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 640 p.

MACHADO, P. S.; GLEN, M.; PEREIRA, O.L.; SILVA, A.A.; ALFENAS, A.C. Epitypification of *Puccinia psidii*, causal agent of guava rust. **Tropical Plant Pathology**, v. 40, n. 1, p. 5-12, 2015.

MAIA, T. A. **ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA DA POPULAÇÃO DE *Hemileia vastatrix* COM BASE NO MARCADOR AFLP**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa-UFV, Viçosa-MG, 2009.

MAIA, T. M.; LOPES, S. T.; ALMEIDA, J. M.; ROSA, L. H.; SAMPAIO, J. P.; GONÇALVES, P.; COELHO, M. A. Evolution of mating systems in basidiomycetes and the genetic architecture underlying mating-type determination in the yeast *Leucosporidium scottii*. **Genetics**, v. 201, n. 1, p. 75-89, 2015.

MARJORAM, P.; TAVARÉ, S. Modern computational approaches for analysing molecular genetic variation data. **Nature Reviews Genetics** v. 7, p.759-770, 2006.

MARLATT, R. B.; KIMBROUGH, J. W. Rust (*Puccinia Psidii*) of allspice (*Pimenta dioica*) appears in Florida. In: **Proceedings of the annual meeting of the Florida State Horticultural Society**. 1980.

MASSON, M. V.; MORAES, W. B.; MATOS, W. C.; ALVES, J. M.; FURTADO, E. L. Eficiência e viabilidade econômica do controle químico da ferrugem do eucalipto em condições de campo. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 2, p. 107–112, jun. 2011.

MCDONALD, B.A; LINDE, C. Pathogen population genetics, evolutionary potencial, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v.40, p. 349- 379, 2002.

MCTAGGART, A. R.; DU PLESSIS, E.; ROUX, J.; BARNES, I.; FRASER, S.; GRANADOS, G. M.; DRENTH, A. Sexual reproduction in populations of *Austropuccinia psidii*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 156, n.2, p. 537-545, 2020.

MCTAGGART, A. R.; SHUEY, L. S.; GRANADOS, G. M.; DU PLESSIS, E.; FRASER, S.; BARNES, I.; ROUX, J. Evidence that *Austropuccinia psidii* may complete its sexual life cycle on Myrtaceae. **Plant Pathology**, v. 67, n. 3, p. 729–734, 2018.

MCTAGGART, A. R; SHIVAS, R. G.; VAN DER NEST, M. A.; ROUX, J.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Host jumps shaped the diversity of extant rust fungi (Pucciniales). **New Phytologist**, v. 209, n. 3, p. 1149-1158, 2016.

MORIN, L.; TALBOT, M. J.; GLEN, M. Quest to elucidate the life cycle of *Puccinia psidii* sensu lato. **Fungal biology**, v. 118, n. 2, p. 253-263, 2014.

NATH, H.; GRIFFITHS, R Estimation in an island model using simulation. **Theoretical population biology**. v.50, p.227-253, 1996.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 70, p. 3321-3323, 1973.

NEIGEL, J. E. Is FST obsolete? **Conservation Genetics**, v.3, p. 167-173, 2002.

NEIGEL, J.E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annu Rev Ecol Syst**, v. 28, p. 105-128, 1997

NIEUWENHUIS, B. P.; BILLIARD, S.; VUILLEUMIER, S.; PETIT, E.; HOOD, M. E.; GIRAUD, T. Evolution of uni-and bifactorial sexual compatibility systems in fungi. **Heredity**, v. 111, n. 6, p. 445-455, 2013.

NORDBORG, M. **Coalescent theory**. In: Handbook of Statistical Genetics (eds Balding DJ, Bishop M, Cannings C) John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK, p. 179-212, 2001.

ODONG, T.; VAN HEERWAARDEN, J.; JANSEN, J.; VAN HINTUM, T. J.; VAN EEUWIJK, F. Determination of genetic structure of germplasm collections: are traditional hierarchical clustering methods appropriate for molecular marker data **Theoretical and Applied Genetics**. v. 123, p. 195-205, 2011.

OHTA, T.; GILLESPIE, J. H. Development of neutral and nearly neutral theories. **Theoretical Population Biology**, v. 49, n. 2, p. 128-42, 1996.

PALCZEWSKI, M.; BEERLI, P. A continuous method for gene flow. **Genetics** v.194, p. 687-696, 2013.

PATERSON, A. H., TANKSLEY, S. D.; SORRELLS, M. E. DNA markers in plant improvement. **Advances in Agronomy**, v. 46, p. 39-90, 1991.

PEAKALL, R. O. D.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular ecology notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295. 2006.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 20 jul. 2012.

PÉREZ, C. A.; WINGFIELD, M. J.; ALTIER, N. A.; SIMETO, S.; BLANCHETTE, R. A. *Puccinia psidii* infecting cultivated *Eucalyptus* and native myrtaceae in Uruguay. **Mycological Progress**, v. 10, p. 273-282. 2011.

PIZA, S.M. de T.; RIBEIRO, I.J.A. Influência da luz e da temperatura na germinação de uredosporos de *Puccinia psidii*. **Bragantia**, v. 47, p. 75-8, 1988.

PRIMACK, R. B; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: Planta, 327 p. 2001.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; ROSENBERG, N. A.; Donnelly. P. Association mapping in structured populations. **The American Journal of Human Genetics**. v.67, p.170-181, 2000.

PROVINE, W. B. **The Origins of Theoretical Population Genetics**. [s.l.] University of Chicago Press, 2020.

RANNALA, B.; HARTIGAN, J. A. Estimating gene flow in island populations. **Genetical Research**, v. 67, n.2, p. 147-158, 1996.

RAYACHHETRY, M. B.; VAN, T.K.; CENTER, T.D.; ELLIOTT, M.L. Host range of *Puccinia psidii*, a potential biological control agent of *Melaleuca quinquenervia* in Florida. **Biological Control**, v. 22, n. 1, p. 38-45, 2001.

RIDLEY, M. **Evolução**. Artmed Editora, 752 p, 2009.

ROSA, J. R. B. F. **Análise da estrutura populacional e do desequilíbrio de ligação de um painel de acessos de sorgo: uma abordagem usando teoria da coalescência**. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. p. 75, 2016.

ROUX, J.; GREYLING, I.; COUTINHO, T. A.; VERLEUR, M.; WINGFIELD, M. J. The Myrtle rust pathogen, *Puccinia psidii*, discovered in Africa. **IMA fungus**, v. 4, n. 1, p. 155-159, 2013.

SALAZAR YEPES, M.; CARVALHO JÚNIOR, Anibal Alves de. **Ferrugens: diversidade de uredinales do Parque Nacional do Itatiaia, Brasil**. Rio de Janeiro, BR: Technical Books, 2010.

SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. **Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle**. Embrapa Florestas-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2001.

SCHULZE-LEFERT, P.; PANSTRUGA, R. A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. **Trends in plant science**, v. 16, n. 3, p. 117-125, 2011.

SEBBENN, A. M. SEOANE, C. E. S. Estimativa de tamanho efetivo de endogamia por marcadores genéticos. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.29, n.1, p.1-7, 2005.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, n. 5, p. 615-629, 2006.

SILVA, P. H. M.; SHEPHERD, M; GRATTAPAGLIA, D; SEBBENN, A. M. Use of genetic markers to build a new generation of *Eucalyptus pilularis* breeding population. **Silvae Genetica** v. 64, p. 170-181, 2015.

SILVEIRA, V.D. Elementos de fitopatologia: *Puccinia psidii*, ferrugem das Mirtáceas. **Agronomia, Rio De Janeiro**, v. 10, p. 218-24, 1951.

- SIMPSON, J. A.; THOMAS, K.; GRGURINOVIC, C. A. Uredinales species pathogenic on species of Myrtaceae. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 549-562, 2006.
- SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 16, p. 393-430, 1985.
- SLATKIN, M. Seeing ghosts: the effect of unsampled populations on migration rates estimated for sampled populations. **Molecular Ecology** v.14, p. 67-73, 2005.
- SLATKIN, M.; MADDISON, W. A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. **Genetics** v. 123, p. 603-613, 1989.
- SMOUSE, R. P. P.; PEAKALL, R. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539. 2012.
- SOUZA, E.; SORRELLS, M.E. Relationship among 70 North American oat germplasms: II. Cluster analysis using qualitative characters. **Crop Science**, Madison, v. 31, p. 605-612, 1991.
- SOUZA, S.M.C de. **Doenças de plantas – goiaba**. Inf. Agropec., v. 11, p. 26, 1985.
- STEWART, J. E.; ROSS-DAVIS, A. L.; GRAÇA, R. N.; ALFENAS, A. C., PEEVER, T. L.; HANNA, J. W.; KLOPFENSTEIN, N. B. Genetic diversity of the myrtle rust pathogen (*Austropuccinia psidii*) in the Americas and Hawaii: global implications for invasive threat assessments. **Forest Pathology**, v. 48, n. 1, p. e12378, 2018.
- STUKENBROCK, E. H.; MCDONALD, B. A. The origins of plant pathogens in agroecosystems. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 46, p. 75-100, 2008.
- THINES, M. An evolutionary framework for host shifts—jumping ships for survival. **New Phytologist**, v. 224, n. 2, p. 605-617, 2019.
- TOMMERUP, I. C.; ALFENAS, A. C.; OLD, K. M. Guava rust in Brazil—a threat to *Eucalyptus* and other Myrtaceae. New Zealand **Journal of Forestry Science**, v. 33, n. 3, p. 420-428, 2003.
- TUFTO J.; ENGEN, S.; HINDAR, K. Inferring patterns of migration from gene frequencies under equilibrium conditions. **Genetics** v.144, p.1911-1921, 1996.

- TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017.
- VAN OOSTERHOUT, C.; WEETMAN, D.; HUTCHINSON, W.F. Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. **Mol Ecol Notes**. v.4, p.535-538, 2006.
- VAN VALEN, L. **A New Evolutionary Law (1973)**. In: Foundations of Macroecology. University of Chicago Press, 2014. p. 284-314.
- VENCOVSKY, R.; CROSSA, J. Measurements of representativeness used in genetic resources conservation and plant breeding. **Crop Science**, v. 43, p. 1912-1921, 2003.
- VOLZ, E. M.; ROMERO-SEVERSON, E.; LEITNER, T. Phylodynamic inference across epidemic scales. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 5, p. 1276-1288, 2017.
- WAKELEY, J. **Coalescent Theory. An Introduction**. Greenwood Village Roberts and Company Publishers, p. 326, 2009.
- WAKELEY, J. Segregating sites in Wright's island model. **Theoretical Population Biology** v.53, p. 166-174, 1998.
- WEINBERG, W. Über vererbungsgesetze beim menschen. **Zeitschrift für induktive Abstammungs-und Vererbungslehre**, v. 1, n. 1, p. 377-392, 1908.
- WEIR, B. S. **Genetic Data Analysis II**. Sinauer Associates, Sunder. Land. MA. 1996.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358, nov. 1984.
- WILSON, E. O.; BOSSERT, W. H. **A primer of population biology**. Sinauer, Stamford, Connecticut, USA, 1971.
- WILSON, G. A.; RANNALA, B. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. **Genetics**. v.163, p.1177-1191, 2003.
- WINTER, G. Repertorium. Rabenhorstii fungi europaei et extraeuropaei. Cent XXXI et XXXII. **Hedwigia**, v.23, p.164–172, 1884.

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of populations**. University of Chicago Press, Chicago, 511 p. 1978.

WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. **Genetics**, v.16, p.97-159, 1931.

WRIGHT, S. Size of population and breeding structure in relation to evolution. **Science**, v. 87, n. 2263, p. 430-2264, 1938.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annual of Eugenics**. v. 15, p. 313-354, 1951.

WRIGHT, S. The genetical theory of natural selection: a review. **Journal of Heredity**, v. 21, n. 8, p. 349-356, 1930.

XAVIER, A. A. Histopatologia, da interação *Puccinia psidii* e virulência de isolados do patógeno em espécies de Myrtaceae. 2002. 83f. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia.

ZHONG, S.; YANG, B.; ALFENAS, A. C. Permanent genetic resources: development of microsatellite markers for the guava rust fungus, *Puccinia psidii*. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 2, p. 348-350, 2008.

ZHONG-HU, H. An investigation of the relationship between the F1 potential and the measures of genetic distance among wheat lines. **Euphytica**, v. 58, p. 65-170, 1991.