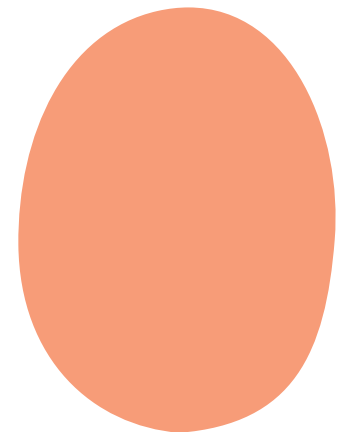




Fragmentação do habitat em Orchidaceae



Índice

01 Fragmentação
do habitat

03 Workflow

05 Conclusão

02 Espécies em
estudo

04 Resultados

Fragmentação do habitat

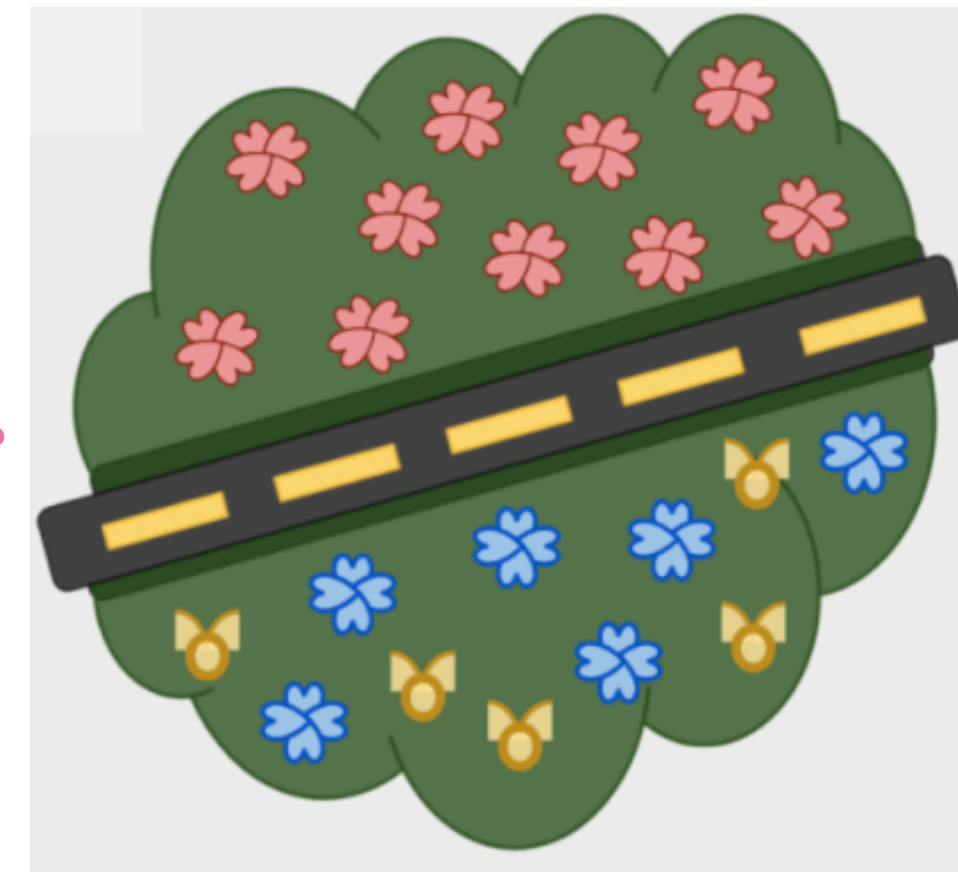
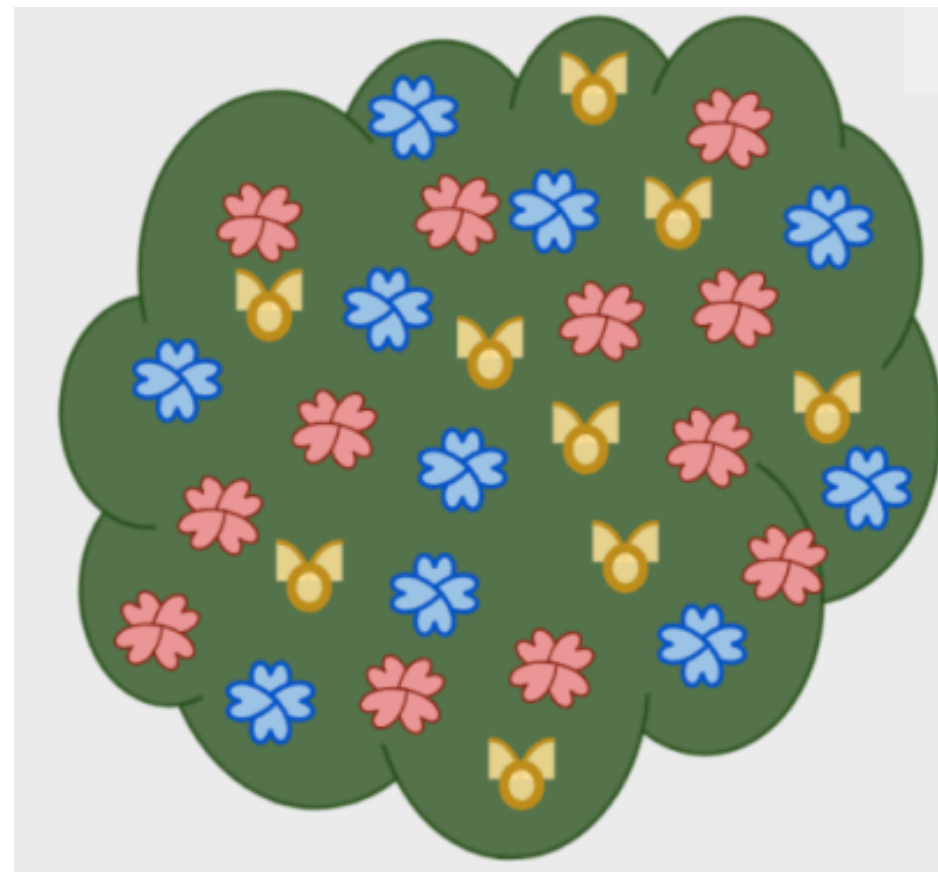
Divisão do habitat inicial em várias frações



Perda de habitat



Alteração do habitat



Espécies em estudo

Phaius australis



Phaius flavus



Cypripedium forrestii

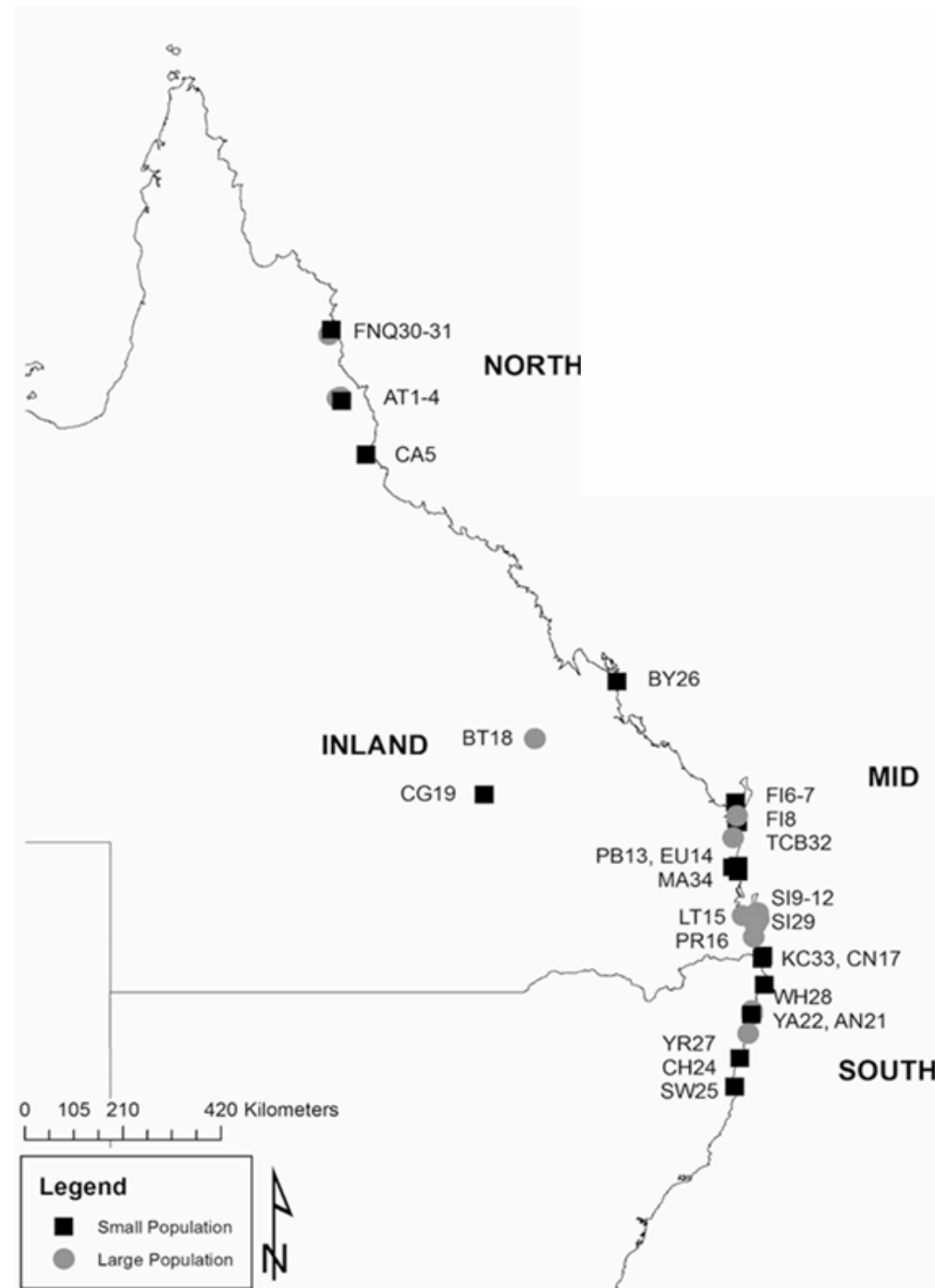


Espécies em estudo

Phaius australis



Phaius flavus



Cypripedium forrestii

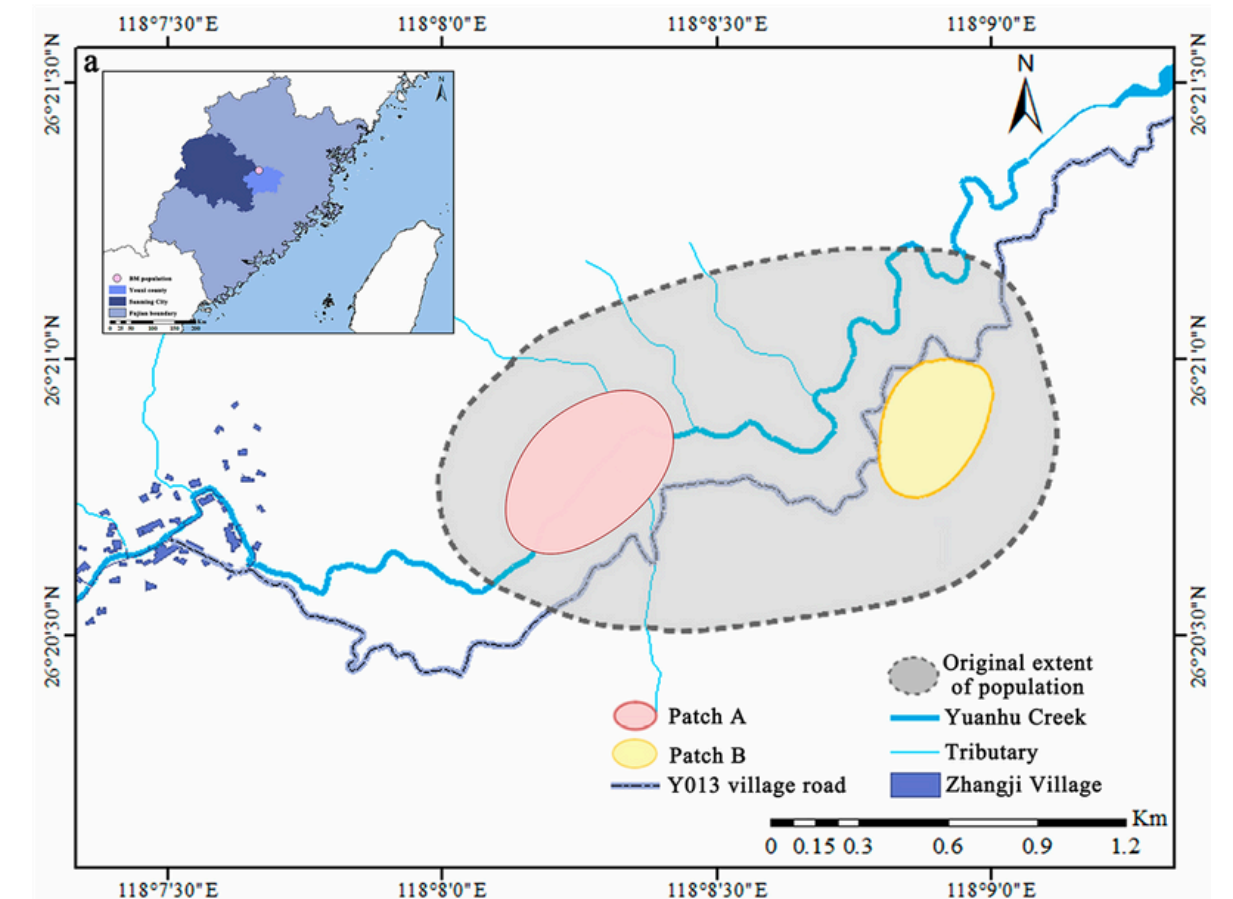
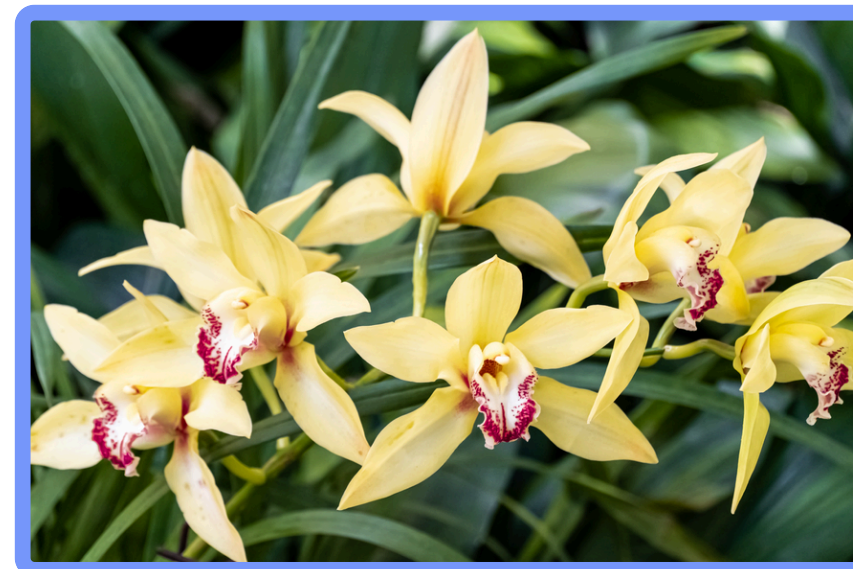


Espécies em estudo

Phaius australis

Phaius flavus

Cypripedium forrestii

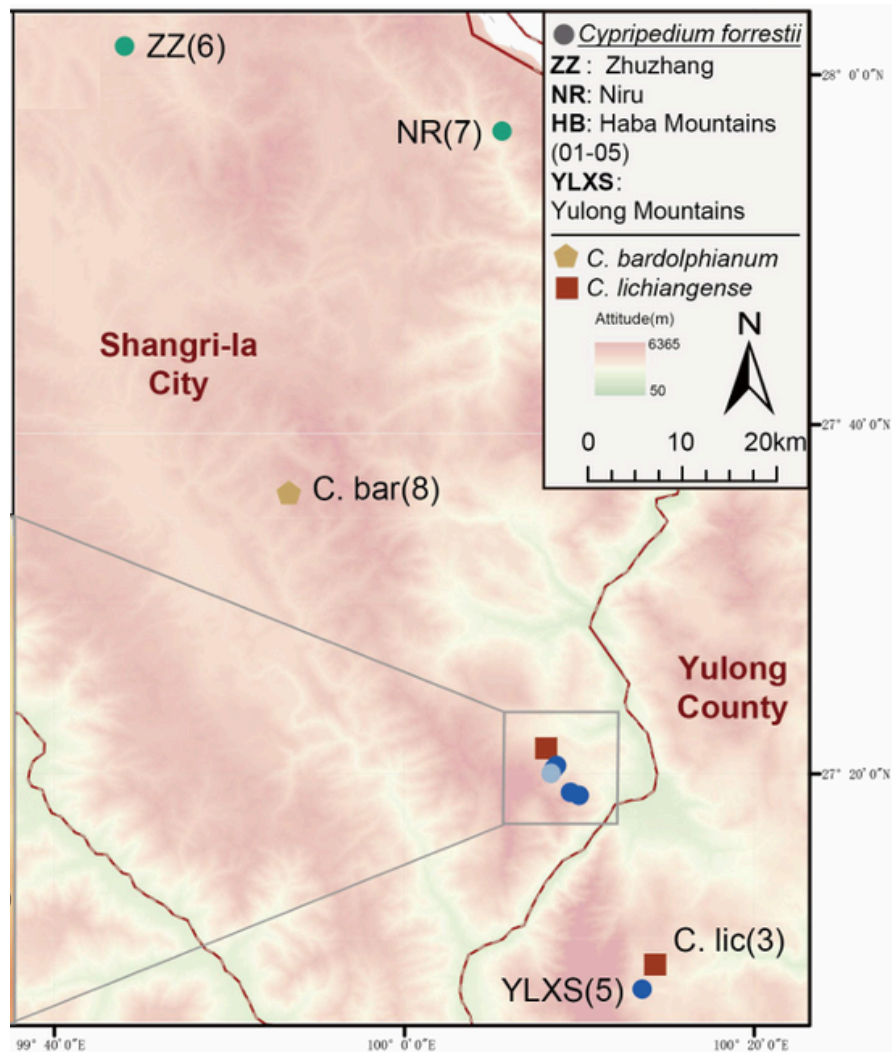


Espécies em estudo

Phaius australis

Phaius flavus

Cypripedium forrestii



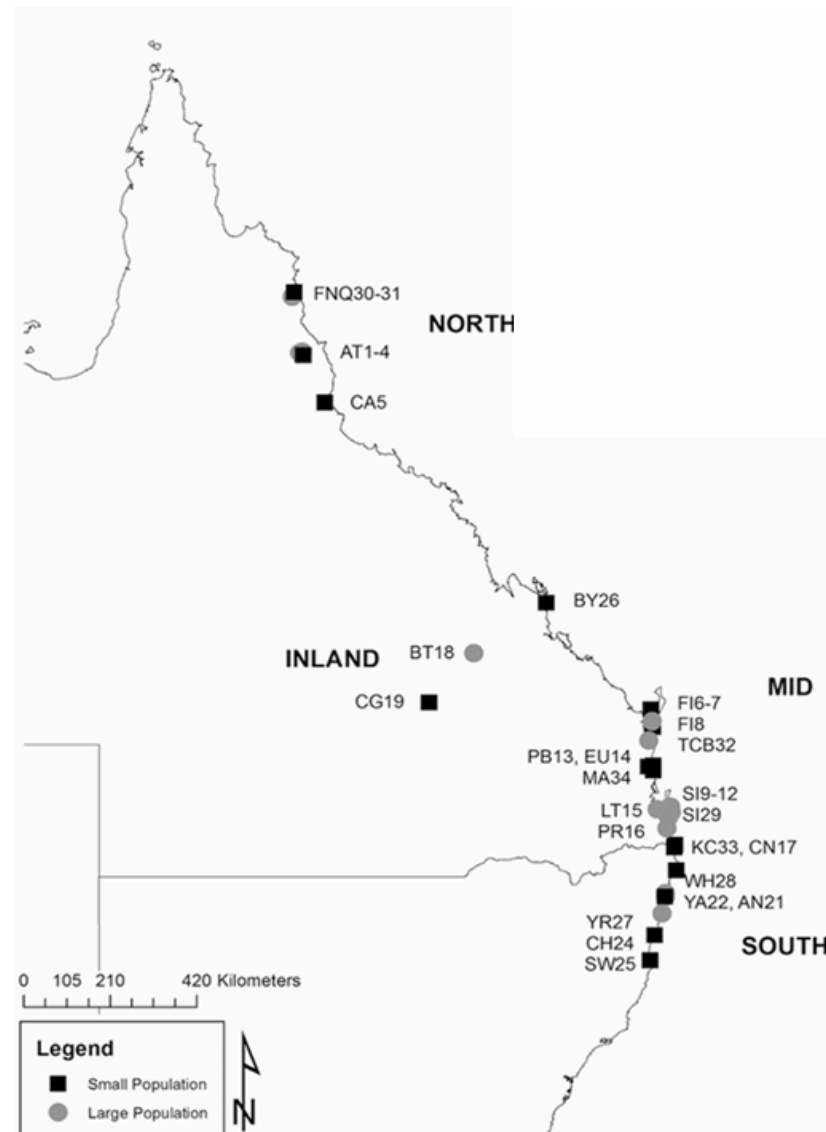
Workflow

RRS - Reduced Representation Sequencing

Transcriptômica

Target sequencing

Recolha de amostras



Extração de DNA de 30 indivíduos de cada pop

- 17 pops. com $n \geq 50$ e
- 16 pops. com $n < 50$

Pirosequenciação de 13 STR's em gDNA

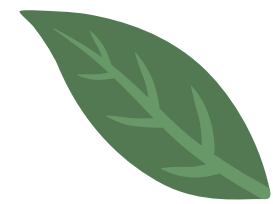
Illustrina HiSeq

Workflow

Target sequencing

RRS - Reduced Representation Sequencing

Transcriptômica



Recolha de amostras

Extração de DNA de 30 indivíduos de cada pop

Pirosequenciação de 13 STR's em gDNA

GENEMAPPER
MICROCHECKER

Aferir qualidade das reads

GenAlEx
Calcular medidas genéticas (freq. alélicas, H_o , H_e , F_{st} ...)

AMOVA

Calcular diferenças genéticas entre pops.

Correlação de Spearman

Relação da variação genética com N e isolamento

Teste de Mantel

Identificar IBD

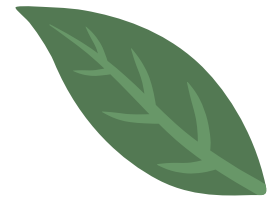
Workflow

RRS - Reduced Representation Sequencing

Target sequencing

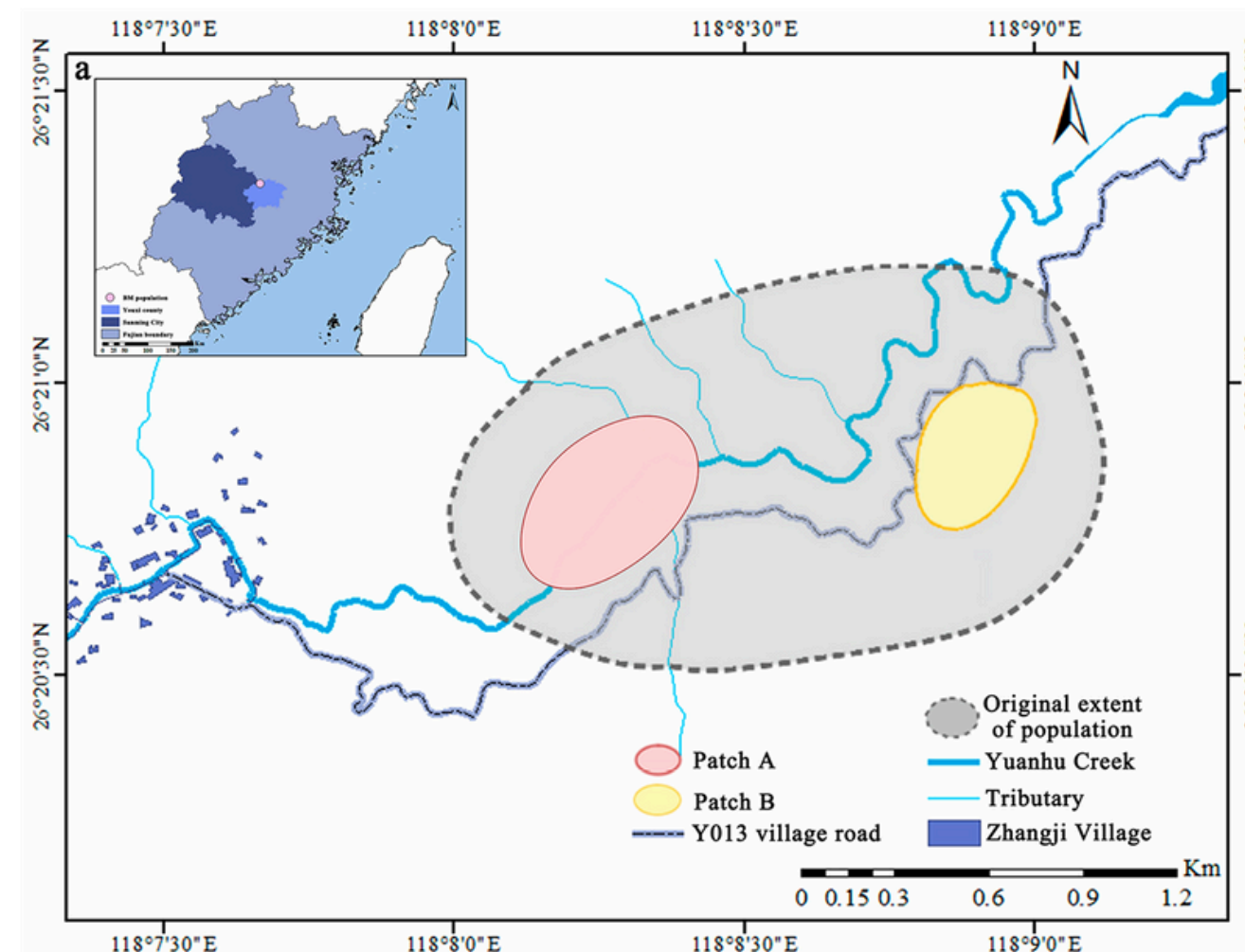
Transcriptômica

Recolha de amostras



Extração de DNA de 20 indivíduos da pop. A e 14 da pop. B

Análise de SNP's por RAD-seq

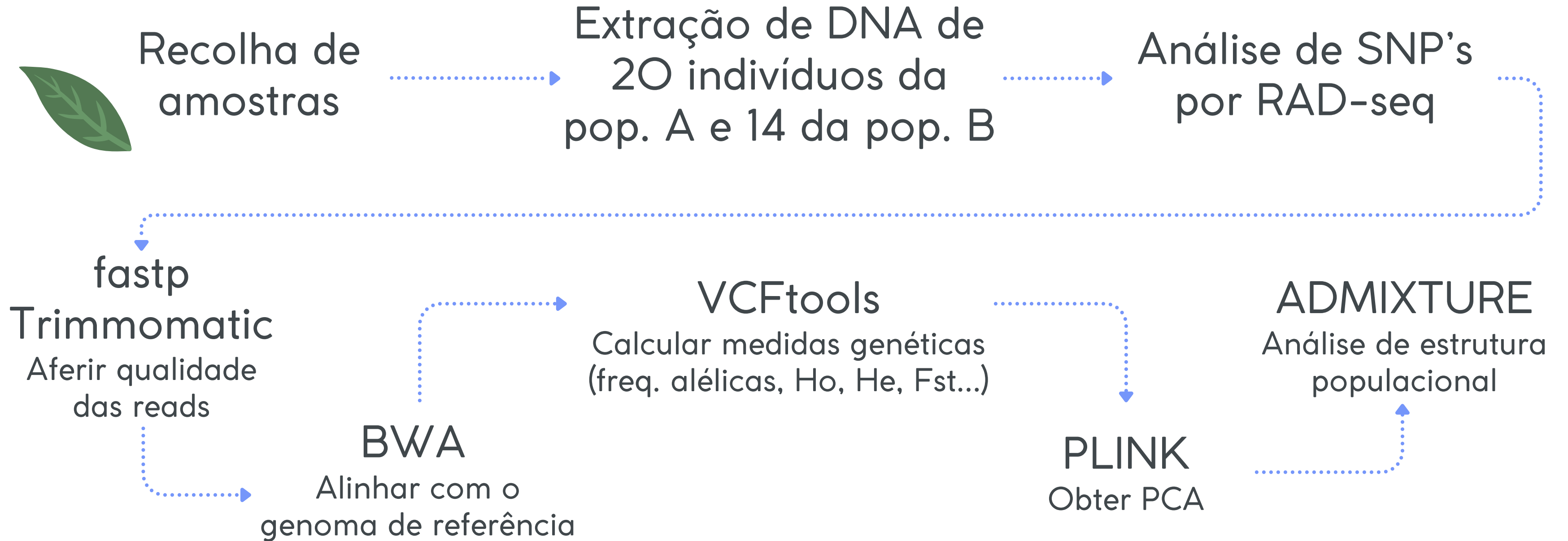


Workflow

RRS - Reduced Representation Sequencing

Target sequencing

Transcriptômica



Workflow

RRS - Reduced Representation Sequencing

Target sequencing

Transcriptômica

Recolha de amostras



Extração de RNA de 52 indivíduos

Análise de SNP's por RNA-seq

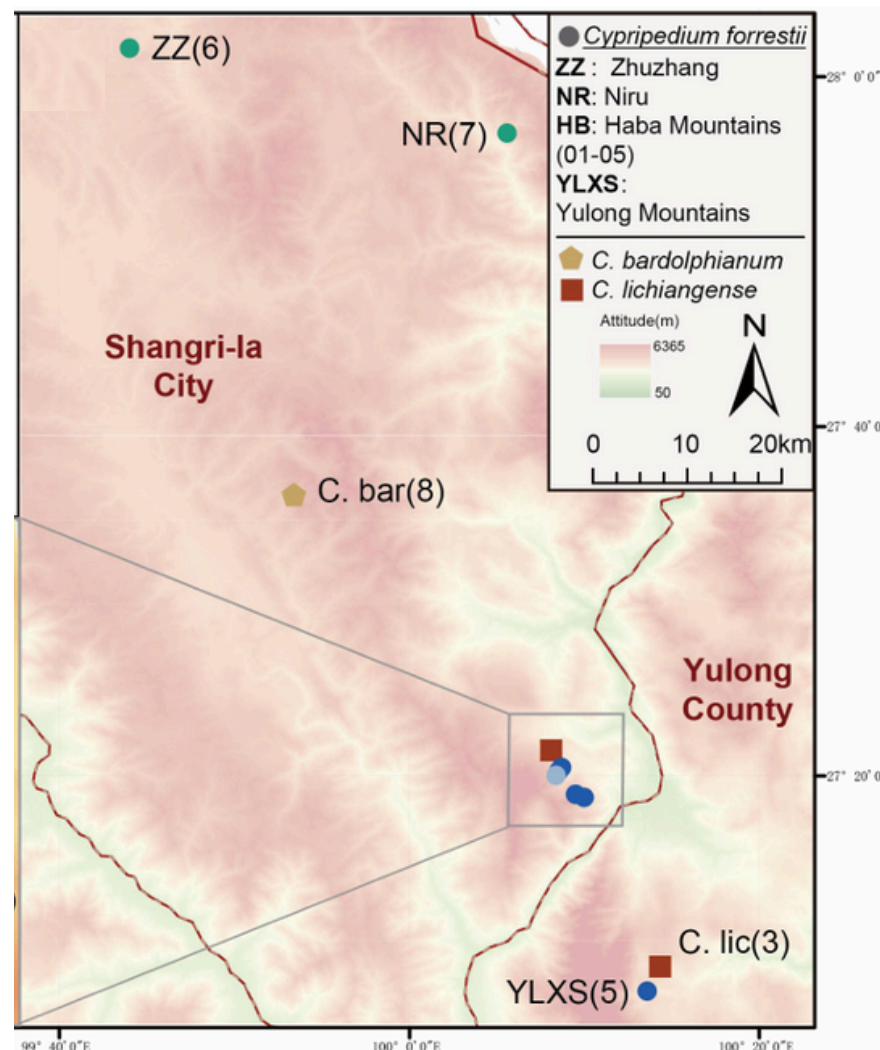


Illustration of three green circles of increasing size leading to a rounded rectangle containing the text "Illumina HiSeq".

Illumina HiSeq

Workflow

Target sequencing

RRS - Reduced
Representation Sequencing

Transcriptômica

Recolha de
amostras

Extração de RNA
de 52 indivíduos

Análise de SNP's
por RNA-seq

Trimmomatic

Aferir qualidade
das reads

DecontaMiner

Remover rRNA e RNA
de microrganismos

GATK

Identificar SNP's

VCFtools

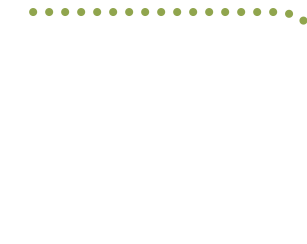
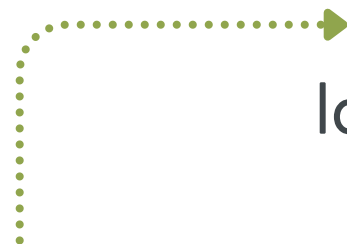
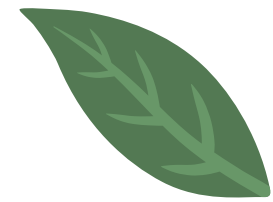
Calcular medidas genéticas
(freq. alélicas, H_o , H_e , F_{st} ...)

PLINK

Obter PCA

ADMIXTURE

Análise de estrutura
populacional



Resultados

P. australis

Tabela 1 - Diversidade genética de *P. australis* nas 33 populações agrupadas por região geográfica. n - nº de amostras; P - percentagem de alelos polimórficos; A - nº médio de alelos por locus, Ap - nº médio de alelos por locus polimórfico; Ae - nº médio de alelos efetivos; He - heterozigotia esperada

Region	Population	n	P	A	Ap	Ae	He
North	FNQ31	29	30.77	1.227	1.455	1.340	0.156
	AT1	28	76.92	1.500	2.000	1.667	0.349
	AT2	28	69.23	1.500	2.000	1.555	0.320
	AT3	27	61.54	1.545	2.091	1.339	0.179
	AT4	5	30.77	1.182	1.364	1.291	0.154
	CA5	4	30.77	1.182	1.364	1.327	0.172
Mean			50.00	1.42	1.71	1.422	0.222
Mid	BY26	3	53.85	1.364	1.727	1.466	0.253
	FI6	34	53.85	1.364	1.727	1.339	0.193
	FI7	2	23.08	1.091	1.273	1.273	0.136
	FI8	4	30.77	1.227	1.455	1.410	0.185
	TCB32	29	53.85	1.364	1.727	1.313	0.186
	PB13	4	23.08	1.136	1.273	1.262	0.134
	EU14	4	23.08	1.182	1.364	1.333	0.148
	MA34	9	30.77	1.182	1.364	1.303	0.163
	LT15	31	38.45	1.273	1.545	1.405	0.194
	SI9	32	46.15	1.273	1.545	1.358	0.193
	SI10	31	46.15	1.318	1.636	1.258	0.154
	SI11	30	38.46	1.273	1.545	1.357	0.192
	SI12	31	46.15	1.273	1.545	1.287	0.167
	SI29	32	30.77	1.227	1.455	1.323	0.149
	PR16	33	38.46	1.227	1.455	1.293	0.159
Mean			38.46	1.25	1.51	1.33	0.174
South	KC33	4	23.08	1.136	1.273	1.273	0.136
	CNR17	12	23.08	1.182	1.364	1.289	0.140
	BA20	6	23.08	1.136	1.273	1.268	0.135
	WH28	31	38.46	1.273	1.545	1.290	0.157
	AN21	37	38.46	1.227	1.455	1.294	0.157
	YA22	4	23.08	1.136	1.273	1.273	0.136
	YR27	33	30.77	1.227	1.455	1.299	0.147
	CH24	3	23.08	1.136	1.273	1.273	0.136
	SW25	9	23.08	1.182	1.364	1.250	0.127
Mean			27.35	1.18	1.36	1.27	0.141
Inland	BT18	30	46.15	1.318	1.636	1.263	0.150
	CG19	27	30.77	1.182	1.364	1.224	0.125
Mean			38.46	1.250	1.50	1.24	0.137
Total/mean		626	37.50	1.264	1.506	1.328	0.171
H			7.899*	9.209*	6.994	13.489*	12.862*

Region	Population	n	P	A	Ap	Ae	He
North							
Mean			50.00	1.42	1.71	1.422	0.222
Mid							
Mean			38.46	1.25	1.51	1.33	0.174
South							
Mean			27.35	1.18	1.36	1.27	0.141
Inland							
Mean			38.46	1.250	1.50	1.24	0.137
Total/mean		626	37.50	1.264	1.506	1.328	0.171
H			7.899*	9.209*	6.994	13.489*	12.862*

↓ Diversidade genética

Sem formação de clusters distintos

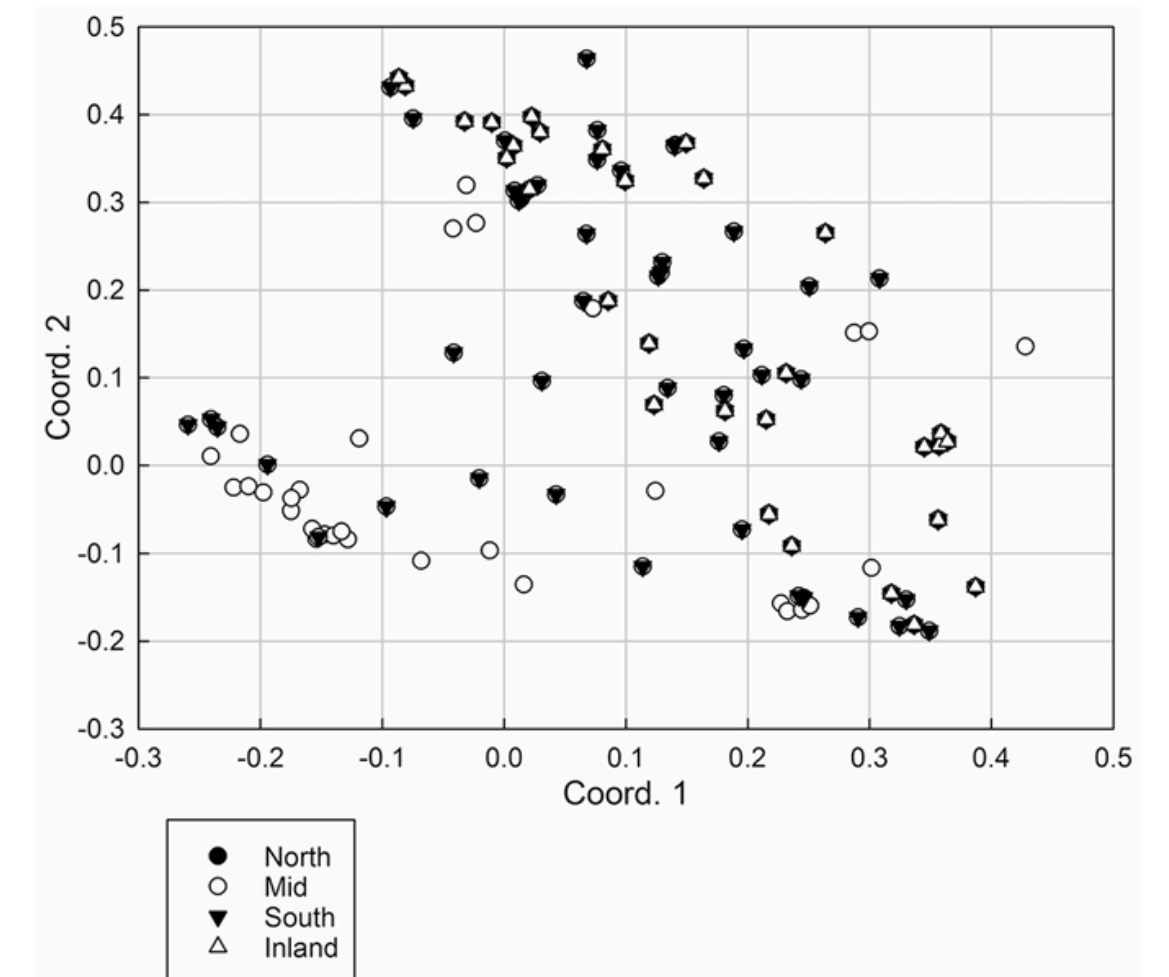


Fig. 1 - Análise de coordenadas principais de todos os indivíduos, indicando a relação genética das populações de *P. australis* por regiões. Os dois eixos combinados compreendem 38.14% dos dados.

Resultados

P. australis

Tabela 2 - Variação genética nos 13 STR's das 33 populações de *P. australis*.

F-Statistics	Value	P
F_{RT}	0.072	0.001
F_{SR}	0.278	0.001
F_{ST}	0.329	0.001
F_{IS}	-0.039	0.997
F_{IT}	0.303	0.001
Nm	0.509	

Phi-statistic	Value	P
Φ_{RT}	0.110	0.000
Φ_{PR}	0.444	0.000
Φ_{PT}	0.506	0.000

AMOVA	Est. var.	%
Among regions	0.528	11
Among pops	1.899	40
Within pops	2.374	49
Total	4.801	100

Tabela 3 - Correlação de Spearman para *P. australis*. Lat - latitude; N - tamanho populacional; D - Densidade; pNN - distância à população mais próxima; IR - ranking de isolamento; P - percentagem de alelos polimórficos; A - nº médio de alelos por locus, Ap - nº médio de alelos por locus polimórfico; Ae - nº médio de alelos efetivos; He - heterozigotia esperada

	Lat		D		N		pNN		IR	
	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p
<i>P</i>	0.806	0.000**	-0.169	0.355	0.644	0.000**	-0.202	0.268	0.407	0.021*
<i>A</i>	0.928	0.000**	-0.117	0.523	0.691	0.000**	-0.176	0.336	0.417	0.018*
<i>Ap</i>	0.928	0.000**	-0.139	0.449	0.686	0.000**	-0.174	0.340	0.413	0.019*
<i>Ae</i>	0.402	0.123	-0.220	0.230	0.297	0.099	-0.192	0.292	0.091	0.576
<i>He</i>	0.584	0.001*	-0.294	0.102	0.342	0.055	-0.246	0.174	0.212	0.249
<i>PA</i>	0.295	0.267	0.116	0.527	0.116	0.528	0.006	0.976	0.277	0.124

↑ variação entre populações

↑ variação regional

↑ isolamento

↓ variabilidade genética

Resultados

P. flavus

Tabela 4 - Diversidade genética de *P. flavus*. N - tamanho da amostra; Pi - variação nucleotídica; Ho - heterozigotia observada; He - heterozigotia esperada; Fi - coeficiente de inbreeding

Population Numbers	N	Pi	Ho	He	Fi
Beikengding Mount	34	1.439×10^{-4}	0.788	0.707	0.224
Patch A	20	1.429×10^{-4}	0.824	0.714	0.373
Patch B	14	2.794×10^{-4}	0.754	0.700	0.477

Variabilidade genética intermédia

Inbreeding presente em cada pop.

Pops. independentes mas com gene flow

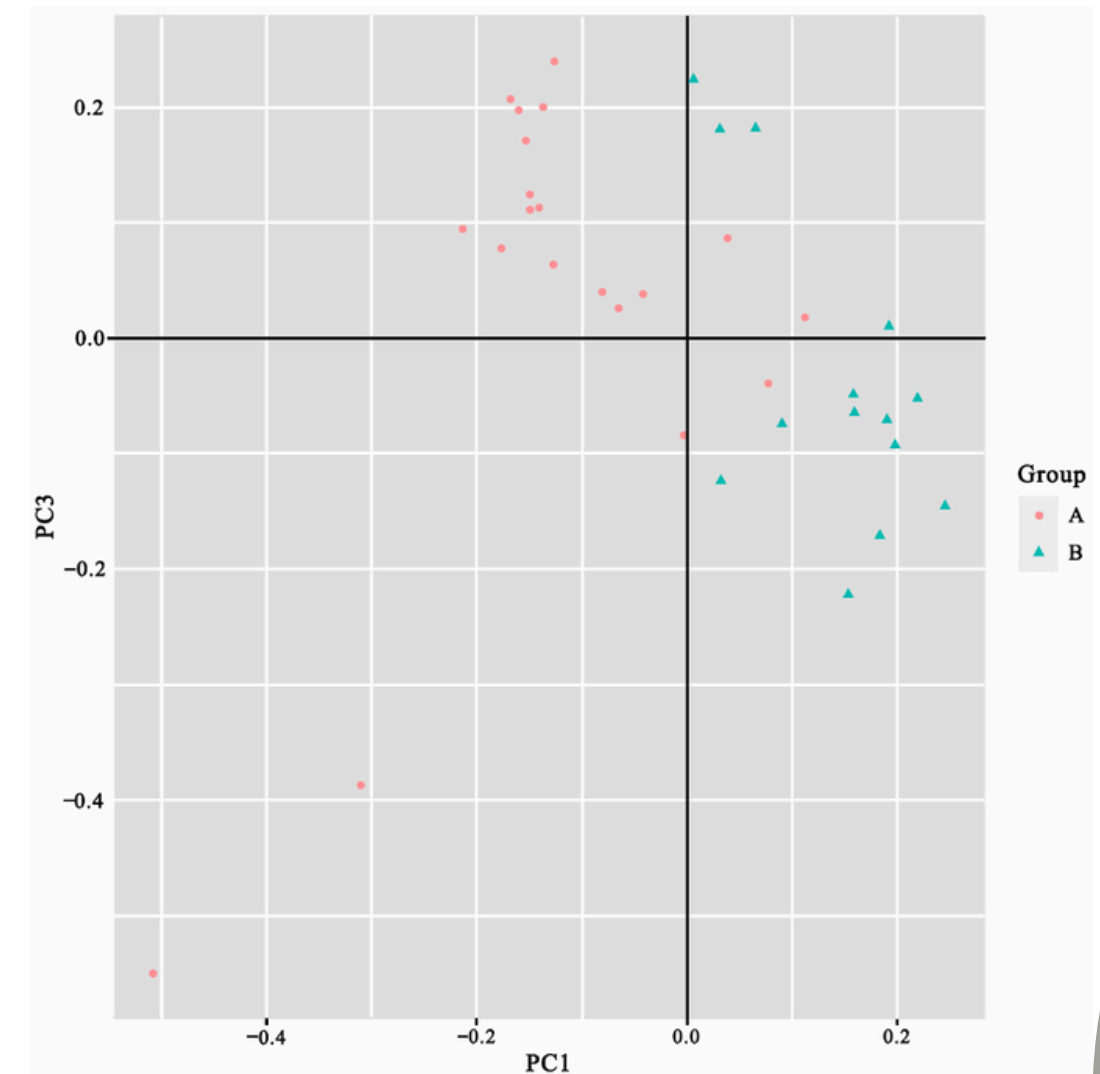


Fig. 2 - Análise de componentes principais das populações A e B de *P. flavus*.

Resultados

P. flavus

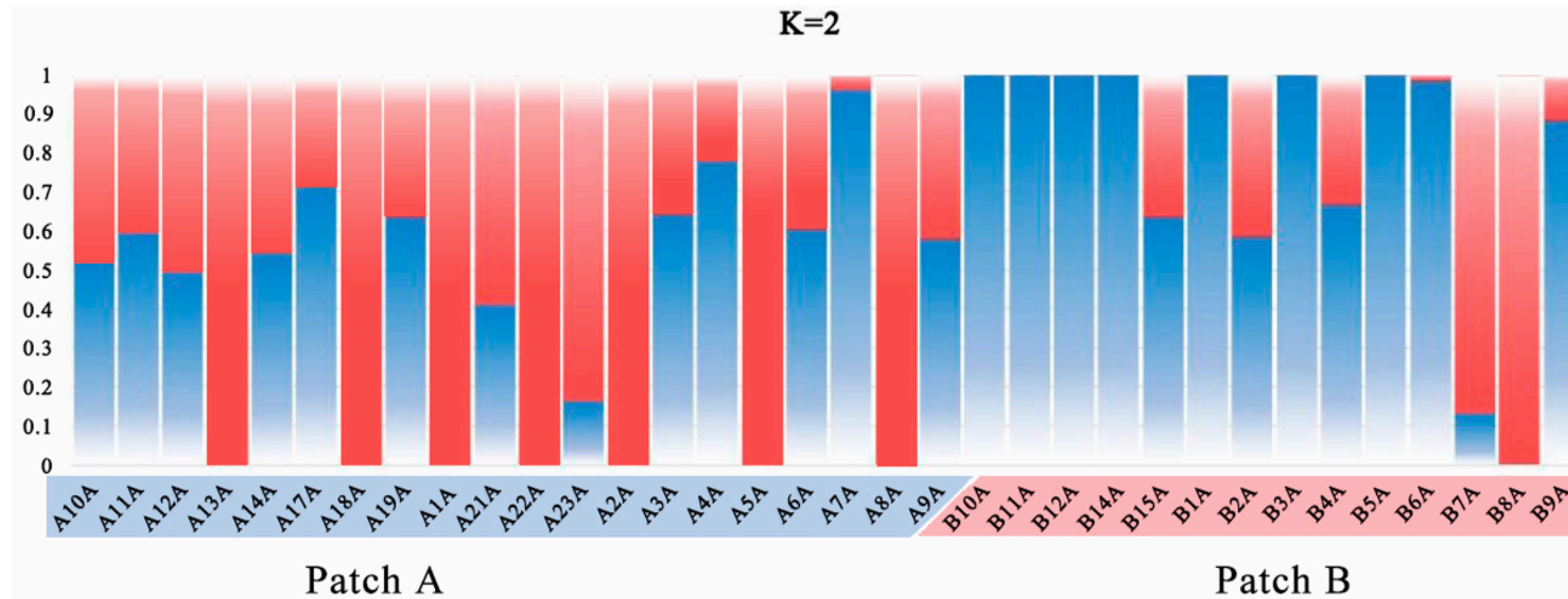


Fig. 3 - Estrutura populacional de *P. flavus* para K=2. O eixo do x mostra os indivíduos de cada população; eixo do y mostra a proporção da variação genética de cada indivíduo.

Diferenciação populacional

mas...

Gene flow ainda persiste



Resultados

C. forrestii

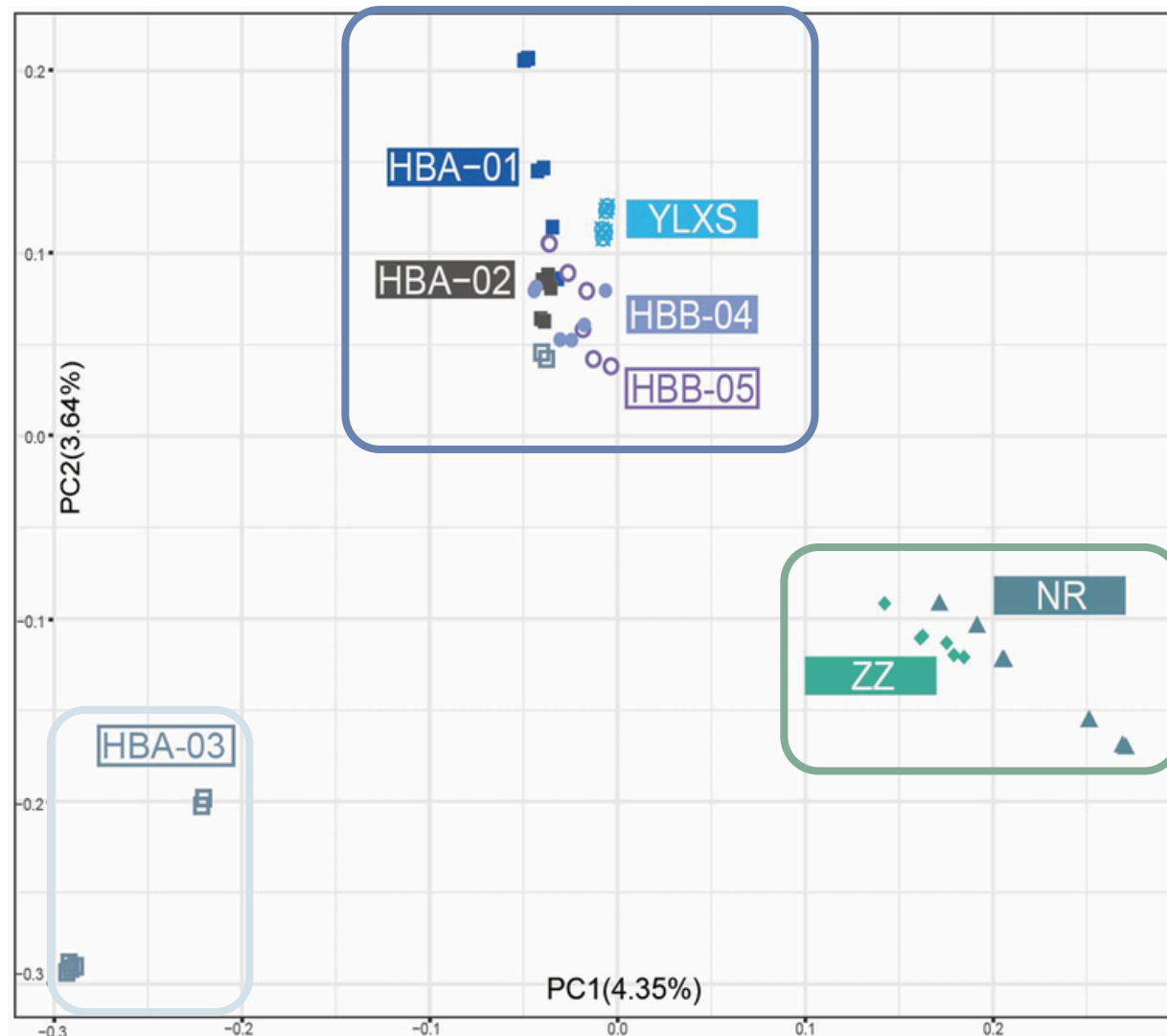


Fig. 4 - Análise de componentes principais (PCA) de todos os indivíduos de *C. forrestii*, indicando a relação genética das populações.

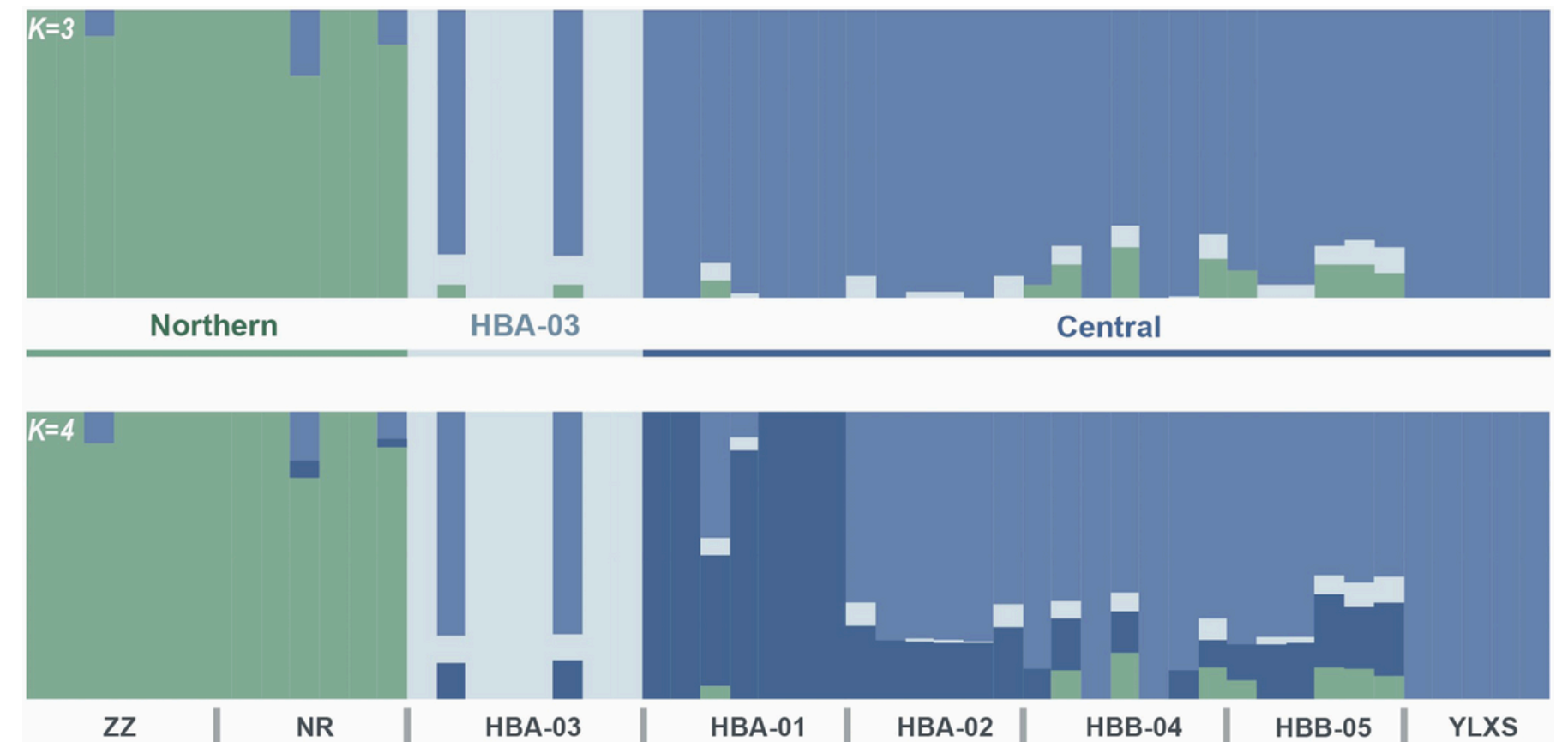


Fig. 5 - Estrutura populacional de *C. forrestii* para K=3 e K=4. O eixo do x mostra os indivíduos de cada população; eixo do y mostra a proporção da variação genética de cada indivíduo.

Formação de 3 clusters distintos

Resultados

C. forrestii

Maior diferença entre as pops. mais distantes

Pops. centrais fragmentadas

Tabela 5 - Pairwise Fst dos 8 locais de amostragem de *C. forrestii*.

	ZZ	NR	HBA-03	HBA-01	HBA-02	HBB-04	HBB-05	YLXS
ZZ	-							
NR	0.122	-						
HBA-03	0.172	0.171	-					
HBA-01	0.157	0.142	0.145	-				
HBA-02	0.137	0.124	0.115	0.086	-			
HBB-04	0.122	0.118	0.116	0.096	0.062	-		
HBB-05	0.110	0.105	0.097	0.065	0.039	0.029	-	
YLXS	0.183	0.173	0.182	0.157	0.127	0.120	0.103	-

Tabela 6 - Informação genética dos 3 clusters de *C. forrestii*.

Genetic groups	Sampling locations	Number of ramets	Altitude (m)	Number of samples (NGS)	$\pi \times 10^4$	TajimaD	Ho	He	Fis	Ne (LD)	Ne (HE)	No (CO)
Northern				13	1.80	0.77	0.41	0.37	-0.11	4.3	12.2	3.8
	ZZ	50	3526	6	1.91	0.58	0.48	0.41	-0.17	27.8	4.9	5.3
	NR	50	3465	7	1.91	0.67	0.48	0.40	-0.18	3.1	4.6	4.5
Central				31	1.72	0.86	0.37	0.33	-0.12	15.5	10.8	5.7
	YLXS	50	2997	5	2.03	0.69	0.56	0.44	-0.28	Infinite	2.8	4.4
	HBA-01	200	3401	7	1.89	0.66	0.50	0.40	-0.26	2.2	3.1	4.0
	HBA-02	50	3576	6	2.02	0.73	0.50	0.42	-0.20	1.8	3.6	3.4
	HBB-04	200	3664	7	1.90	0.48	0.45	0.38	-0.17	Infinite	4.7	4.5
	HBB-05	200	3792	6	1.93	0.40	0.44	0.39	-0.12	Infinite	7.2	4.2
HBA-03	HBA-03	200	3835	8	1.89	0.79	0.53	0.40	-0.32	1.1	2.5	2.4
Overall		1000	-	52	1.71	1.05	0.35	0.32	-0.08 (Fit)	16.5	78	2.5

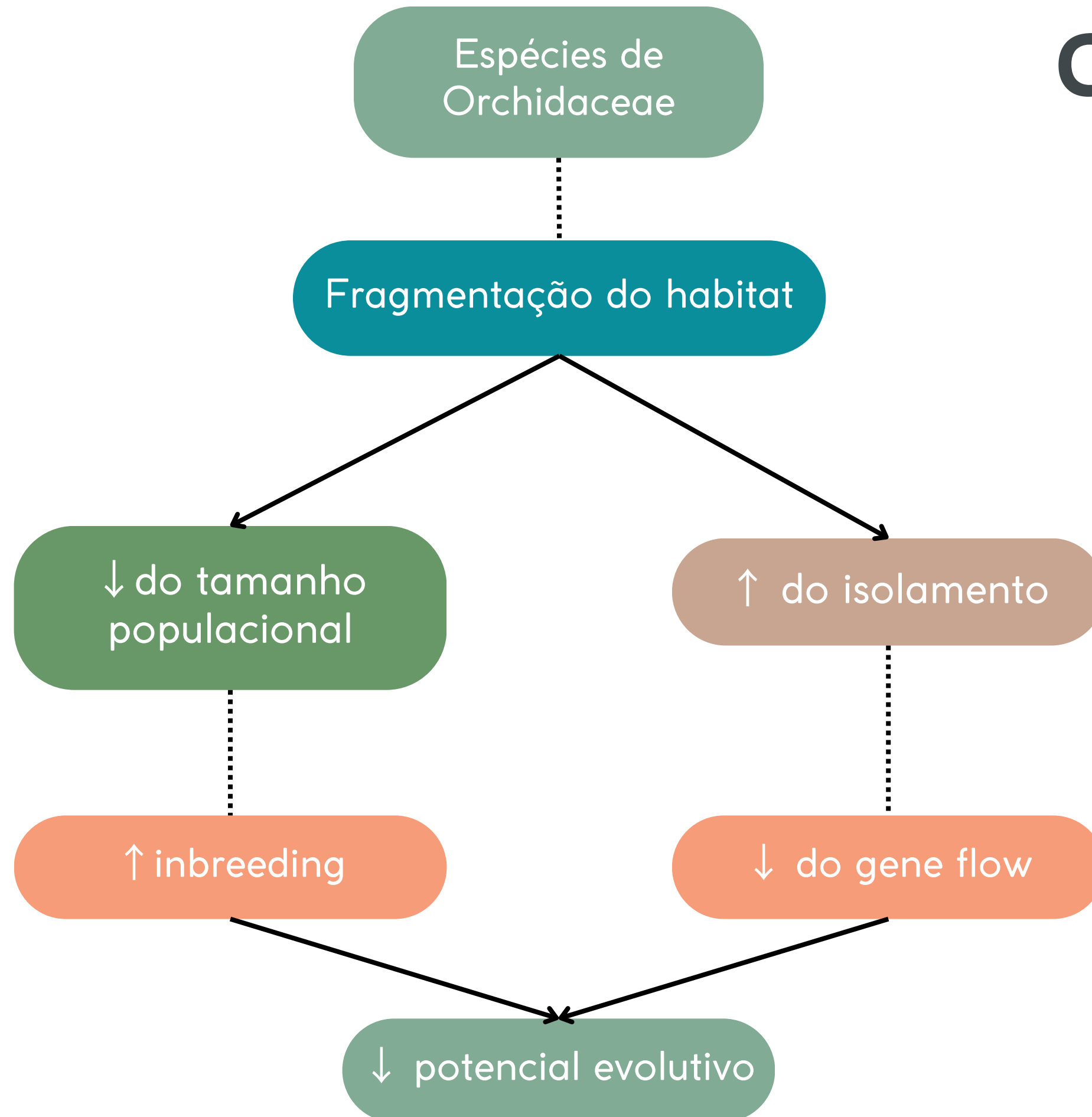
↓ Fis

Vantagem de heterozigóticos?

Possível bottleneck



Conclusão



Referências principais

1. Simmons, L., Mathieson, M. T., Lamont, R. W., & Shapcott, A. (2017). Genetic diversity of endangered orchid *Phaius australis* across a fragmented Australian landscape. *Conservation Genetics*, 19(2), 451–465. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-1022-y>
2. Liang, C., Li, J., Li, S., Zhang, H., Zheng, J., Miao, J., Hao, S., Wu, S., Liu, Z., & Zhai, J. (2024). Human Activity Changed the Genetic Pattern of the Orchid *Phaius flavus* Population. *Diversity*, 16(11), 685. <https://doi.org/10.3390/d16110685>
3. Lin, L., Cai, L., Huang, H., Ming, S., & Sun, W. (2024). Transcriptome data reveals the conservation genetics of *Cypripedium forrestii*, a plant species with extremely small populations endemic to Yunnan, China. *Frontiers in Plant Science*, 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1303625>

Referências secundárias

1. Jackson, H. B., & Fahrig, L. (2013). Habitat loss and fragmentation. In Elsevier eBooks (pp. 50–58). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384719-5.00399-3>
2. What was the 454 method of DNA sequencing? How does it work? (n.d.). <https://www.yourgenome.org/theme/what-was-the-454-method-of-dna-sequencing/>, visitado a 13/12/2024

Referências de imagens

- Goel, V. a. P. B. A. (2023, November 22). What is Habitat Fragmentation?: Impact on Biodiversity and Solutions. Decoding Biosphere. <https://decodingbiosphere.com/2023/11/22/habitat-fragmentation-impact-on-biodiversity-and-solutions/>, consultado a 15/12/2024
- Phaius australis. (n.d.). BioDiversity4All. <https://www.biodiversity4all.org/taxa/802831-Phaius-australis>, consultado a 15/12/2024
- Phaius Flavus -- Earthpedia plant. (n.d.). Earthpedia. <https://earthpedia.earth.com/plant-encyclopedia/angiosperms/orchidaceae/phaius-flavus/>, consultado a 15/12/2024
- Phaius flavus (Blume) Lindl. | Plants of the World Online | Kew Science. (n.d.). Plants of the World Online. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:650398-1>, consultado a 15/12/2024
- Chinese Academy of Sciences. (n.d.). https://english.cas.cn/print_2019/index.shtml?docurl=https://english.cas.cn/newsroom/news/201908/t20190806_213931.shtml, consultado a 15/12/2024
- Redação. (2021, April 16). Entenda a classificação da Lista Vermelha da IUCN. ((O))Eco. <https://oeco.org.br/dicionario-ambiental/27904-entenda-a-classificacao-da-lista-vermelha-da-iucn/>, consultado a 15/12/2024