

Projeto de Pesquisa e Planejamento de Atividades

Aluno: Júlia Brandão Gontijo		Data início curso: 25/10/2022
Orientador: Gabrielle Maria Romeiro Lombardi		Defesa em: 07/2024
Curso: MBA Data Science e Analytics	Modalidade: Distância	Turma: DSA222

1. Título do projeto (Inicial)

Em português:

Fungos em solos inundáveis e de terra firme Amazônicos: sazonalidade e respostas às mudanças climáticas

Em inglês:

Fungal communities in Amazonian floodplain and upland forest soils: seasonal dynamics and climate change feedbacks

Este trabalho será elaborado em língua inglesa e submetido para publicação científica em revista de alto impacto.

2. Introdução

A Bacia Amazônica apresenta as maiores florestas tropicais do planeta, que representam uns dos maiores reservatórios de biodiversidade existentes (Fearnside, 2021). Os dois principais tipos de florestas encontrados na Amazônia Brasileira são as florestas de terra firme e as florestas inundáveis (Myster, 2016). Essa região desempenha um papel essencial nos processos ecológicos globais, mantendo os maiores rios de água doce do mundo, controlando a temperatura atmosférica e precipitação, e balanceando o fluxo de gases atmosféricos (Fleischmann et al., 2022).

A elevada precipitação anual na região Amazônica é distribuída de forma irregular entre as estações chuvosa e seca, o que causa oscilações na vazão dos rios, resultando em extensas áreas sazonalmente inundadas (Wittmann et al., 2022). A bacia Amazônica cobre uma grande porção dos trópicos úmidos, e a rede de drenagem possui mais de 800.000 Km² de extensão (Hess et al., 2015), desempenhando um papel significativo no *budget* regional e global do ciclo do carbono (C) (Pangala et al., 2017; Gedney et al., 2019). A sazonalidade de chuvas presente na Floresta Amazônica também contribui diferencialmente na produção de biomassa vegetal, com consequente influência na dinâmica dos ciclos da água e nutrientes (Myneni et al., 2007). Além disso, a maior parte da entrada de C do solo é proveniente da decomposição biológica de materiais vegetais (Purahong et al., 2016). Neste contexto, comunidades microbianas do solo, especialmente fungos, são cruciais para o ciclo biogeoquímico do C, pela atuação na modulação dos estoques e liberações de C do solo (Rodríguez-Ramos et al., 2021).

Essas informações evidenciam a importância da continuação de estudos direcionados a essa temática na Amazônia, especialmente em relação ao impacto do aumento de temperatura previstas num cenário futuro de aquecimento global. Para a região Amazônica, estima-se um aumento da temperatura atmosférica entre 1,8 e 5,1 °C, com média de 3,3 °C (Malhi et al., 2008), além de impactos na duração e magnitude do regime das chuvas, resultando tanto em períodos chuvosos como de estiagem mais acentuados

(IPCC, 2022). O aumento da temperatura e a alteração nos padrões de precipitação podem influenciar a biodiversidade microbiana do solo, e também levar ao desequilíbrio entre a decomposição e a estabilização do C (Morrissey et al., 2023; Alisson, 2023).

Em outros ambientes, já foi demonstrado que alterações nas médias de temperatura e condições de inundação causam impactos nas comunidades microbianas, porém o tipo e magnitude do impacto pode variar de acordo com o ambiente estudado (Peltoniemi et al., 2015; Hernández et al., 2019; Zhou et al., 2023). Apesar desses avanços, pouco se conhece sobre os reais efeitos das diferentes estações e aumento de temperatura nas dinâmicas das comunidades fúngicas em solos Amazônicos (como revisado por Venturini et al., 2023), principalmente pela dificuldade de realizar experimentos em campo para estudo das variáveis ambientais.

Como alternativa, experimentos em microcosmos podem ser realizados em laboratório a fim de simular alterações das condições ambientais (He et al., 2015; Han et al., 2016; Venturini et al., 2022), possibilitando o estudo das comunidades microbianas por abordagens taxonômicas e funcionais a partir de técnicas moleculares, tal como o sequenciamento gene marcador filogenético ITS (do inglês *Internal Transcribed Spacer*). O gene ITS refere-se a uma região do DNA presente no RNA ribossomal de organismos eucarióticos. Como a região ITS sofre menos pressão seletiva do que as regiões codificadoras de proteínas, ela pode acumular variações genéticas que são úteis para estudos filogenéticos de fungos (Naranjo-Ortiz; Gabaldón, 2019). Além disso, técnicas complementares como caracterização física e química do solo podem ser integradas às interpretações da ocupação de nicho das comunidades microbianas. Neste contexto, a aplicação de técnicas de machine learning pode oferecer uma abordagem poderosa para a classificação, identificação e predição de espécies fúngicas com base em dados moleculares do ambiente de estudo (Morera et al., 2021).

Este trabalho buscará compreender a dinâmica das comunidades fúngicas e suas potenciais funções em áreas de florestas inundáveis e de terra firme da Amazônia, investigando a importância dos fatores ambientais (estações e temperatura). Para isso, faremos a integração de duas abordagens, sendo i) o estudo das comunidades fúngicas nas estações de cheia e seca e ii) por meio de um experimento em microcosmo onde serão investigados os efeitos das alterações na temperatura (objetivando simular o cenário mediano de aquecimento global) e inundação (buscando simular as estações de cheia e seca) sobre as comunidades fúngicas nos solos das áreas de estudo. O uso de diferentes tipos de solos e de análises baseadas em machine learning possibilitará a geração de dados para futuras modelagens tanto para compreender respostas das comunidades fúngicas as oscilações naturais de inundação ao longo do ano, quanto para gerar previsões frente a cenários de alterações climáticas futuras para a região Amazônica.

3. Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- (i) avaliar a dinâmica das comunidades fúngicas nas estações de seca e cheia em solos de florestas inundáveis e de terra firme da Amazônia;
- (ii) investigar o efeito das mudanças climáticas nas comunidades fúngicas nas mesmas áreas de estudo;
- iii) identificar os táxons-chave nas áreas de estudo.

4. Material e Métodos

4.1. Áreas de estudo

As áreas de estudo estão localizadas na região centro-oeste do Pará, nos municípios de Santarém e Belterra. O clima regional é classificado como Am (Köppen), tropical úmido com diferença de temperatura anual inferior a 5 °C e regime pluviométrico com estação seca, mas com precipitação total acima de 2.500 mm anuais (Alvares et al., 2013), onde 70% da precipitação anual é concentrada no período de Dezembro a Junho.

4.2. Coleta e processamento dos solos para avaliação das estações

As campanhas de coleta de solo para avaliação da sazonalidade serão realizadas no período de cheia (com presença de inundação) e seca (sem presença de coluna d'água nas áreas inundáveis). A amostragem será realizada em duas áreas inundáveis da Amazônia com características químicas e físicas contrastantes devido a influência dos rios em que são sazonalmente inundadas, sendo uma localizada no encontro dos rios Amazonas e Tapajós (S2 22.747 W54 44.352) e outra localizada no rio Tapajós (S2 49.077 W55 02.077). Além disso, também será utilizada uma área de floresta de terra firme (S2 51.326 W54 57.501), ou seja, uma área de floresta que não é sazonalmente inundável.

Em cada área será delimitado um transecto de 100 metros, onde serão coletadas amostras de solo em cinco pontos igualmente espaçados. A camada de serapilheira será retirada e serão coletados cerca 500 g de solo na camada entre 0 e 10 cm de profundidade. Cerca de 50g serão imediatamente congeladas e mantidas a -80 °C para as análises moleculares.

4.3. Coleta e processamento dos solos para experimento em microcosmos

A coleta dos solos para execução do experimento será realizada nas mesmas áreas descritas no item 4.2, na estação seca. Neste caso, a camada de serapilheira será retirada e serão coletados cerca de 5 kg de solo na camada entre 0 e 10 cm de profundidade. Este volume de solo será devidamente armazenado com um respiro na abertura do saco para que ocorram trocas gasosas. O material será transportado para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (LBCM - CENA/USP) e acondicionado a 16 °C no escuro até a execução do experimento. O solo de cada ponto será peneirado em malha de 8 mm para retirar restos de serapilheira, pedras e membros da fauna edáfica.

4.4. Análises químicas e físicas das amostras de solo

Aproximadamente 450 g das amostras de solo serão enviadas para Pirasolo Laboratório Agrotécnico Piracicaba LTDA (Piracicaba, Brasil) para a análise das suas propriedades químicas e físicas.

No laboratório, será realizada a análise química para fins de avaliação da fertilidade do solo, que consiste na determinação do pH em cloreto de cálcio; fósforo, potássio, cálcio e magnésio, pela extração em resina trocadora de íons; enxofre por turbidimetria e extração com fosfato de cálcio 0,01 mol L⁻¹; alumínio pela extração de cloreto de potássio 1 mol/L; matéria orgânica e carbono orgânico pelo método de dicromato/titulométrico; nitrogênio total pelo método de digestão sulfúrica/Kjeldahl; amônio e nitrato pelo método MgO-Liga de devarda/Kjeldahl; boro pela extração com água quente; cobre, ferro, manganês e zinco extraídos pelo extrator DTPA-TEA (pH 7,3); e dos cálculos SB, CTC, V% e m%. Será realizada a análise física das amostras a partir determinação do conteúdo de areia, por

pesagem e silte e argila, pelo uso do densímetro. As comparações entre as características químicas e físicas dos solos entre os tratamentos serão realizadas através do teste de Kruskal-Wallis para comparações múltiplas, seguido do teste de Dunn ($p < 0.05$).

4.5. Experimento em microcosmos

O experimento em microcosmos será realizado em frascos de vidro com capacidade para 1,5 L. Serão individualmente acondicionados 400 g de solo de cada ponto das áreas de estudo. Os microcosmos serão pré-incubados por uma semana em BOD durante uma semana a 27 °C no escuro a fim de aclimatar a comunidade microbiana dos solos. O experimento consistirá em um ensaio fatorial 3x2x2 (três diferentes áreas, duas condições de inundação e duas temperaturas). O delineamento utilizado será o de blocos ao acaso com quatro repetições, totalizando 48 frascos.

No dia 0, será realizada a amostragem de solo em todos os frascos, e em seguida será realizada a alteração da temperatura (para 30 °C) e condição de inundação das unidades experimentais correspondentes, que consistirá na adição de 300 ml de água deionizada autoclavada para obtenção de uma coluna d'água. Os frascos que representarem a condição seca serão mantidos com 30% de umidade, valor correspondente a umidade do solo de floresta observada anteriormente. O experimento será mantido por 30 dias e a condição de inundação do solo contido nos frascos será controlada durante todo esse período com água deionizada autoclavada. As temperaturas foram escolhidas com base nas variações observadas previamente em campo nas épocas cheia e seca, além do aumento de 3 °C previsto no cenário mediano de alterações climáticas para a região Amazônica. Os frascos serão mantidos com Parafilm durante todo o período, permitindo assim as trocas gasosas e melhor controle da umidade.

4.6. Extração do DNA do campo e experimento

As amostras de solo do campo e as amostras correspondentes aos dias 0 e 30 do experimento serão utilizadas para as análises moleculares. As amostras serão coletadas assepticamente e congeladas a -80 °C e posteriormente utilizados para extração do DNA total do solo.

O DNA genômico do solo de cada amostra será extraído com o PowerLyzer PowerSoil DNA Extraction Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, com as alterações necessárias para obtenção de DNA em maior quantidade e melhor qualidade. A qualidade e quantidade das amostras também serão analisadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) com densidade ótica de 230, 260, 280 e 320 nm. O DNA genômico extraído será armazenado a -80 °C.

4.7. Sequenciamento dos genes ITS

O sequenciamento em larga escala do gene ITS será realizado a partir de amostras de DNA. As amplificações por PCR serão realizadas com o conjunto de *primers* ITS5-1737F/ITS2-2043R (Degnan; Ochman, 2012) que amplificam a região ITS1-5. O sequenciamento será realizado na plataforma Illumina Novaseq na facility Novogene (Sacramento, USA), no modo *paired-end* 250pb, seguindo o protocolo padrão da empresa.

4.8. Análise dos dados

Todas as análises serão realizadas no software R 4.3.1 (RStudio Team, 2023). As sequências obtidas serão analisadas a partir da abordagem de variantes da sequência do amplicon (ASVs) usando o pacote Dada2 1.28.0 (Callahan et al. 2018). A remoção dos

primers será realizada com o cutadapt (Martin, 2011). As sequências brutas serão filtradas considerando o controle de qualidade phred score > 30. Em seguida, serão corrigidas em relação aos erros de sequenciamento, derreplicadas, unidas (paired-end merge) e as quimeras serão removidas. A taxonomia será atribuída usando o banco de dados UNITE 7 (Nilson et al., 2019). Também será realizada a predição funcional dos grupos de fungos através do banco FUNGuild (Nguyen et al., 2016). Análises estatísticas e visualização gráfica serão realizadas usando os pacotes vegan 2.5-1 (Oksanen et al., 2018), microeco (Liu et al., 2021), Hmisc 4.1- 1 (Harrel, 2018), ggplot2 3.1.0 (Wickham, 2016) e corrplot 0.84 (Wei; Simko, 2017). As análises Escala Multidimensional Não-Métrica (NMDS) e Análise de Variância Multivariada com permutações (PERMANOVA) serão usadas para avaliar as similaridades entre as amostras e a composição das comunidades a partir da distância de Bray-Curtis. A ocupação de nicho, ou seja, a porcentagem de generalistas e especialistas nos dados do campo e do experimento, será verificada pelo método de classificação multinomial de espécies. A análise de Random Forest será utilizada para identificar os táxons-chave nas comunidades fúngicas das áreas de estudo. Por fim, será avaliada a correlação entre os dados biológicos, químicos e físicos por meio da correlação de Spearman ($p < 0.05$).

5. Resultados Esperados

A partir da análise dos dados baseadas em machine learning e integração com os parâmetros físicos e químicos dos solos, nós esperamos ser capazes de responder às seguintes questões:

1. Qual a influência das estações na composição das comunidades fúngicas nas áreas de estudo?
2. As comunidades fúngicas são sensíveis aos efeitos das mudanças climáticas em florestas inundáveis e de terra firme na região Amazônica?
3. Quais são os táxons-chave nas áreas de estudo considerando as diferentes estações e mudanças climáticas previstas para a região?

6. Cronograma de Atividades

[illegible]

Projeto de Pesquisa; Resultados Preliminares; Entrega do Trabalho de Conclusão de Curso; Entrega da Apresentação da Defesa

7. Referências Bibliográficas

- Allison, S. D. (2023). Microbial drought resistance may destabilize soil carbon. *Trends in Microbiology*, 31(8), 780-787.
- Alvares, C. A., et al. (2013). Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift, Stuttgart*, v. 22, n. 6, p. 711-728.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583.
- Degnan, P. H., & Ochman, H. (2012). Illumina-based analysis of microbial community diversity. *The ISME journal*, 6(1), 183-194.
- Fearnside, P. M. (2021). The intrinsic value of Amazon biodiversity. *Biodiversity and Conservation*, 30(4), 1199-1202.
- Fleischmann, A. S., Papa, F., Fassoni-Andrade, A., Melack, J. M., Wongchuig, S., Paiva, R. C. D., ... & Collischonn, W. (2022). How much inundation occurs in the Amazon River basin?. *Remote Sensing of Environment*, 278, 113099.
- Gedney, N., Huntingford, C., Comyn-Platt, E., & Wiltshire, A. (2019). Significant feedbacks of wetland methane release on climate change and the causes of their uncertainty. *Environmental Research Letters*, 14(8).
- Han, X., et al. (2016). Mitigating methane emission from paddy soil with rice-straw biochar amendment under projected climate change. *Scientific reports*, v. 6.
- Harrell, F. E. (2019). Hmisc: Harrell Miscellaneous. R package version 4.1-1.
- He, S., et al. (2015). Patterns in wetland microbial community composition and functional gene repertoire associated with methane emissions. *MBio*, Washington, DC, v. 6, n. 3, p. e00066-15.
- Hernández, M., et al. (2019). Structure, function and resilience to desiccation of methanogenic microbial communities in temporarily inundated soils of the Amazon rainforest (Cunia Reserve, Rondonia). *Environmental microbiology*, v. 21, n. 5, p. 1702-1717.
- Hess, L. L., Melack, J. M., Affonso, A. G., Barbosa, C., Gastil-Buhl, M., & Novo, E. M. L. M. (2015). Wetlands of the Lowland Amazon Basin: Extent, Vegetative Cover, and Dual-season Inundated Area as Mapped with JERS-1 Synthetic Aperture Radar. *Wetlands*, 35(4), 745–756.
- IPCC 2022. Pörtner, H. O., Roberts, D. C., Poloczanska, E. S., Mintenbeck, K., Tignor, M., Alegría, A., ... & Okem, A. (2022). IPCC, 2022: Summary for policymakers.
- Liu, C., Cui, Y., Li, X., & Yao, M. (2021). microeco: an R package for data mining in microbial community ecology. *FEMS microbiology ecology*, 97(2), fiae255.
- Malhi, Y., et al. (2008). Climate change, deforestation, and the fate of the Amazon. *Science*, v. 319, n. 5860, p. 169-172.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17(1), 10-12.
- Morera, A., Martínez de Aragón, J., Bonet, J. A., Liang, J., & De-Miguel, S. (2021). Performance of statistical and machine learning-based methods for predicting biogeographical patterns of fungal productivity in forest ecosystems. *Forest Ecosystems*, 8, 1-14.
- Morrissey, E. M., Kane, J., Tripathi, B. M., Rion, M. S. I., Hungate, B. A., Franklin, R., ... & Brzostek, E. (2023). Carbon acquisition ecological strategies to connect soil microbial biodiversity and carbon cycling. *Soil Biology and Biochemistry*, 177, 108893.
- Myneni, R. B., et al. (2007). Large seasonal swings in leaf area of Amazon rainforests. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 12, p. 4820-4823.

- Myster, R. W. (2016). The physical structure of forests in the Amazon Basin: a review. *The Botanical Review*, 82, 407-427.
- Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101-2137.
- Nguyen, N. H., Song, Z., Bates, S. T., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., ... & Kennedy, P. G. (2016). FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, 20, 241-248.
- Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., ... & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic acids research*, 47(D1), D259-D264.
- Oksanen, J., Guillaume Blanchet, F., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., ... & Stevens, M. H. H. (2018). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-1.
- Pangala, S. R., Enrich-Prast, A., Basso, L. S., Peixoto, R. B., Bastviken, D., Hornibrook, E. R. C., ... Gauci, V. (2017). Large emissions from floodplain trees close the Amazon methane budget. *Nature*, 552(7684), 230–234.
- Peltoniemi, K., et al. (2015). Microbial ecology in a future climate: effects of temperature and moisture on microbial communities of two boreal fens. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 91, n. 7.
- Purahong, W., Wubet, T., Lentendu, G., Schlöter, M., Pecyna, M. J., Kapturska, D., ... & Buscot, F. (2016). Life in leaf litter: novel insights into community dynamics of bacteria and fungi during litter decomposition. *Molecular ecology*, 25(16), 4059-4074.
- Rodriguez-Ramos, J. C., Cale, J. A., Cahill Jr, J. F., Simard, S. W., Karst, J., & Erbilgin, N. (2021). Changes in soil fungal community composition depend on functional group and forest disturbance type. *New Phytologist*, 229(2), 1105-1117.
- RStudio Team. (2023). *RStudio: Integrated development for R*. Retrieved from <http://www.rstudio.com/>
- Venturini, A. M., Dias, N. M., Gontijo, J. B., Yoshiura, C. A., Paula, F. S., Meyer, K. M., ... & Tsai, S. M. (2022). Increased soil moisture intensifies the impacts of forest-to-pasture conversion on methane emissions and methane-cycling communities in the Eastern Amazon. *Environmental research*, 212, 113139.
- Venturini, A. M., Gontijo, J. B., Mandro, J. A., Berenguer, E., Peay, K. G., Tsai, S. M., & Bohannan, B. J. (2023). Soil microbes under threat in the Amazon Rainforest. *Trends in Ecology & Evolution*, 38(8), 693-696.
- Wei, T., & Simko, V. (2017). *corrplot*. R Package, v. 0.84.
- Wickham, H., & Chang, W. (2016). *ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics*. R package version 3.1.0.
- Wittmann, F., Householder, J. E., Piedade, M. T. F., Schöngart, J., Demarchi, L. O., Quaresma, A. C., & Junk, W. J. (2022). A Review of the Ecological and Biogeographic Differences of Amazonian Floodplain Forests. *Water*, 14(21), 3360.
- Zhou, S. Y. D., Lie, Z., Liu, X., Zhu, Y. G., Penuelas, J., Neilson, R., ... & Liu, J. (2023). Distinct patterns of soil bacterial and fungal community assemblages in subtropical forest ecosystems under warming. *Global Change Biology*, 29(6), 1501-1513.