

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa Interunidades de Pós-graduação em Bioinformática

AYRTON BRENO PIMENTA LISBOA

**REGIME PLUVIAL COMO REGULADOR DE ALGAS CARÓFITAS NO
SOLO: novas evidências sobre a origem dos solos e plantas terrestres**

Belo Horizonte

2024

AYRTON BRENO PIMENTA LISBOA

**REGIME PLUVIAL COMO REGULADOR DE ALGAS CARÓFITAS NO
SOLO: novas evidências sobre a origem dos solos e plantas terrestres**

Tese apresentada ao Programa Interunidades de Pós-graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioinformática.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Vieira Del-Bem

Coorientador: Prof. Dr. Victor Satler Pylro

Belo Horizonte

2024

- 043 Lisboa, Ayrton Breno Pimenta.
Regime pluvial como regulador de algas carófitas no solo: novas evidências sobre a origem dos solos e plantas terrestres [manuscrito] / Ayrton Breno Pimenta Lisboa. – 2024.
101 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Vieira Del-Bem. Coorientador: Prof. Dr. Victor Satler Pylro.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática.
1. Bioinformática. 2. Crosta do solo. 3. Estreptófitas. 4. Evolução Molecular. 5. Código de Barras de DNA Taxonômico. I. Del-Bem, Luiz Eduardo Vieira. II. Pylro, Victor Satler. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 573:004



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FOLHA DE APROVAÇÃO

AYRTON BRENO PIMENTA LISBOA

"Regime pluvial como regulador de algas carófitas no solo: Novas evidências sobre a origem dos solos e plantas terrestres"

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Luiz Eduardo Vieira Del Bem - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Victor Satler Pylro - Coorientador
Universidade Federal de Lavras

Prof. Aristóteles Góes Neto
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Heron Oliveira Hilário
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Profa. Jascieli Carla Bortolini
Universidade Federal de Goiás

Prof. Luis Gustavo Carvalho Pacheco
Universidade Federal da Bahia

Belo Horizonte, 17 de dezembro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Aristoteles Goes Neto, Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2024, às 12:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Eduardo Vieira Del Bem, Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2024, às 12:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jascieli Carla Bortolini, Usuária Externa**, em 20/12/2024, às 13:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Heron Oliveira Hilário, Usuário Externo**, em 23/12/2024, às 14:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luis Gustavo Carvalho Pacheco, Usuário Externo**, em 10/01/2025, às 10:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Victor Satler Pylro, Usuário Externo**, em 13/01/2025, às 17:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3762681** e o código CRC **570148E9**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Maria e Joaquim, que sempre “suaram sangue” para que eu tivesse uma educação de qualidade, mesmo nos momentos mais difíceis. Adicionalmente, agradeço à minha irmã, Beatriz, por estar ao meu lado em todos os momentos desafiadores. Sempre tive minhas escolhas apoiadas e encorajadas, e por isso estou profundamente grato. Um agradecimento especial ao meu pai, que sempre estimulou meu pensamento crítico; se hoje escolhi ser cientista, grande parte disso se deve à forma como minha curiosidade foi incentivada em casa.

Estendo um agradecimento ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Vieira Del-Bem, que me convidou a desenvolver este projeto em conjunto com ele e sempre me ofereceu apoio profissional e pessoal quando precisei. Palavras não conseguem expressar a imensa gratidão que sinto por ele.

Aos meus colegas e companheiros de laboratório, em especial Thiago, Wenderson, Guilherme, Luís Garcia e Ingrid, obrigado pelos momentos de reflexão e pelas valiosas lições que compartilhamos.

Agradeço ao Prof. Dr. Heron Hilário pela introdução às análises desenvolvidas neste trabalho, ao Prof. Dr. Victor Pylro por sua contribuição nas análises e na montagem do projeto e ao M.Sc. Luís Garcia pela montagem e disponibilização do banco de plastomas curados.

Aos colegas do grupo da Profa. Glória, que me deram suporte e estrutura para rodar as análises no servidor Mendel.

Sou grato ao Programa de Pós-Graduação em Bioinformática e aos seus docentes pela alta qualidade de ensino e pelos serviços prestados.

Agradeço à CAPES pelo financiamento pessoal durante meu período de estudos de doutorado.

*“É uma ilusão útil, acharmos que estamos
no controle dos nossos destinos.”*
(Derek Muller, 2020)

RESUMO

As crostas fotossintéticas de solo (CFS) representam análogos modernos importantes para compreender os processos evolutivos e ecológicos envolvidos na terrestrialização das algas carófitas, grupo irmão das plantas terrestres. A transição destas algas para o ambiente terrestre representa um evento evolutivo crucial, cujas bases moleculares estão bem estabelecidas através de estudos filogenômicos e funcionais. No entanto, o papel das interações ecológicas e das dinâmicas temporais de estresse neste processo permanece pouco compreendido. O objetivo do estudo foi analisar como diferentes condições sazonais de pluviosidade afetam a composição e a dinâmica dessas comunidades microbianas, que incluem cianobactérias e algas eucarióticas. A metodologia envolveu a coleta de amostras de CFS em períodos de alta e baixa precipitação, seguida de análises metataxonômicas dos marcadores 16S rRNA, 18S rRNA e ITS por sequenciamento para identificar a composição microbiana e avaliar as interações ecológicas. Os resultados mostraram que, durante a temporada seca, as CFS apresentaram uma dominância de interações microbianas complexas, centradas em consórcios liquênicos, evidenciando estratégias de sobrevivência baseadas em relações simbióticas, essenciais para a resistência à dessecação e à escassez de nutrientes. Na temporada úmida, algas verdes eucarióticas, particularmente da classe Zygnematophyceae, predominaram, formando populações mais autônomas, possivelmente devido a adaptações moleculares, como genes de resistência a estresses que podem ter sido adquiridos por transferência horizontal de bactérias do solo. Apesar de sua regulação pela sazonalidade, estas algas demonstraram capacidade efetiva de colonizar ambientes terrestres distantes de corpos d'água através de uma estratégia de ocupação oportunista mediado pela precipitação e pelo vento, combinando explosões populacionais em condições favoráveis com a formação de estruturas resistentes em períodos desfavoráveis. Essa dicotomia entre estratégias - autonomia em condições favoráveis versus interdependência em condições adversas - reflete diferentes respostas às dinâmicas temporais de estresse ambiental. A variância sazonal representa estratégias de alternância entre estados ativo e quiescente, enquanto o gradiente crescente de aridez enfrentado durante a terrestrialização representou uma pressão seletiva direcional que favoreceu adaptações permanentes. Esta perspectiva sugere que a transição para a vida em terra não envolveu apenas o desenvolvimento de características moleculares e interações simbióticas, mas foi fundamentalmente moldada pela natureza temporal das pressões seletivas envolvidas. A persistente vulnerabilidade à escassez hídrica mesmo em linhagens derivadas de algas carófitas sugere que esta limitação pode ter sido uma pressão seletiva crucial para o desenvolvimento de estruturas mais complexas nas primeiras

embriófitas, representando uma transição fundamental de estratégia: da sobrevivência ao estresse para a capacidade de viver através dele.

Palavras-chave: crostas fotossintéticas de solo; evolução das plantas primitivas; algas carófitas; *metabarcoding*; terrestrialização de estreptófitas.

ABSTRACT

Photosynthetic Soil Crusts (PSCs) represent important modern analogs for understanding the evolutionary and ecological processes involved in the terrestrialization of charophyte algae, the sister group of land plants. The transition of these algae to the terrestrial environment represents a crucial evolutionary event, whose molecular bases are well established through phylogenomic and functional studies. However, the role of ecological interactions and temporal patterns of stress in this process remains poorly understood. The aim of this study was to analyze how different seasonal rainfall conditions affect the composition and dynamics of these microbial communities, which include cyanobacteria and eukaryotic algae. The methodology involved collecting PSC samples from a preserved forest area in southeastern Brazil (19°52'37.2"S, 43°58'12.0"W), characterized by a tropical highland climate during periods of high and low precipitation, followed by metabarcoding analyses of 16S rRNA, 18S rRNA, and ITS markers to identify microbial composition and assess ecological interactions. Results showed that during the dry season, PSCs exhibited a dominance of complex microbial interactions centered on lichenized consortia, suggesting survival strategies based on symbiotic relationships essential for resistance to desiccation and nutrient scarcity. During the wet season, eukaryotic green algae, particularly from the Zygnematophyceae class, predominated, forming more autonomous populations, possibly due to molecular adaptations such as stress resistance genes that may have been acquired through horizontal gene transfer from soil bacteria. Despite their regulation by seasonality, these algae demonstrated effective capability to colonize terrestrial environments far from permanent water bodies through an opportunistic occupation pattern possibly mediated by precipitation and wind, combining population explosions under favorable conditions with the formation of resistant structures during unfavorable periods. This dichotomy between strategies - autonomy under favorable conditions versus interdependence under adverse conditions - reflects different responses to temporal patterns of environmental stress. Seasonality represents a cyclical pattern that favors alternating strategies between active and quiescent states, while the increasing aridity gradient faced during terrestrialization represented a directional selective pressure that favored permanent adaptations. This perspective suggests that the transition to land life involved not only the development of molecular characteristics and symbiotic interactions but was fundamentally shaped by the temporal nature of the selective pressures involved. The persistent vulnerability to water scarcity even in derived lineages of charophytes suggests that this limitation may have been a crucial selective pressure for the

development of more complex structures in early embryophytes, representing a fundamental transition in strategy: from surviving stress to living through it.

Keywords: Photosynthetic soil crusts; Early plant evolution; Charophyte algae; Metabarcoding; Streptophyte terrestrialization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Filogenia simplificada das algas verdes (Chlorophyta e Streptophyta).....	17
Figura 2: Evolução da maquinaria genética relacionada à síntese e modificação do xiloglucano (XyG) em Viridiplantae.....	18
Figura 3: Propriedades estruturais e funcionais de solos demonstrando a vantagem evolutiva do desenvolvimento de raízes.....	20
Figura 4: Modelo evolutivo propondo a origem terrestre das plantas.....	23
Figura 5: Cenário evolutivo das plantas terrestres destacando a importância das interações com a microbiota do substrato e as adaptações aos estresses ambientais.....	25
Figura 6: Caracterização geográfica e meteorológica da área de coleta amostral.....	30
Figura 7: Visão geral do fluxo metodológico em laboratório.....	31
Figura 8: Distribuição dos tamanhos das sequências para os diferentes marcadores (16S, 18S, ITS).....	33
Figura 9: Número de sequências obtidas nas diferentes etapas de processamento para os marcadores moleculares 16S rRNA, 18S rRNA e ITS.....	34
Figura 10: Curvas de rarefação para (a) 16S, (b) 18S e (c) ITS.....	36
Figura 11: Comparação da abundância de diferentes filos de algas entre os marcadores 16S e 18S.....	39
Figura 12: Análise da composição das comunidades microbianas nas estações seca (<i>Dry</i>) e chuvosa (<i>Wet</i>).....	44
Figura 13: Análises de diversidade alfa das comunidades microbianas nas estações seca (<i>Dry</i>) e chuvosa (<i>Wet</i>) para os três marcadores moleculares (16S, 18S e ITS).....	46
Figura 14: Distribuição sazonal dos organismos fotossintetizantes.....	49
Figura 15: Matrizes de coocorrência e redes de correlação microbiana com base no coeficiente de Spearman.....	57
Figura 16: Correlações pareadas entre grupos taxonômicos chave nas crostas biológicas do solo.....	59
Figura 17: Análises de ordenação NMDS e distribuição de diferenças sazonais na comunidade microbiana.....	61
Figura 18: Modelo conceitual da progressão evolutiva rumo à terrestrialização.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolos de amplificação e sequenciamento dos marcadores moleculares utilizados para caracterização taxonômica.....	32
Tabela 2: Classificação taxonômica dos organismos fotossintetizantes identificados nas crostas fotossintéticas de solo, incluindo gênero, ordem e grupo taxonômico principal.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido abscísico
AGP	Proteína Arabinogalactana (<i>ArabinoGalactan-Protein</i>)
ASV	Variantes de Sequências de Amplificação (<i>Amplicon Sequence Variant</i>)
CFS	Crostras Fotossintéticas de Solo (<i>Photosynthetic Soil Crusts</i>)
CGA	Algas Carófitas Verdes (<i>Green Charophycean Algae</i>)
CLR	Razão Logarítmica Centralizada (<i>Centered Log Ratio</i>)
CSS	Escalonamento por Soma Acumulada (<i>Cumulative Sum Scaling</i>)
CZM	Contagem Zero Multiplicativa (<i>Count Zero Multiplicative</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EMP	Projeto Microbioma da Terra (<i>Earth Microbiome Project</i>)
HGT	Transferência Horizontal de Genes (ou Gênica) (<i>Horizontal Gene Transfer</i>)
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
ITS	Espaçador Interno Transcrito (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)
mg	Miligrama
ml	Mililitro
ng	Nanograma
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
SSU rRNA	RNA Ribossomal da Subunidade Menor (<i>Small Subunit Ribosomal RNA</i>)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
XyG	Xiloglucano (<i>Xyloglucan</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
1.1 CONTEXTO EVOLUTIVO DAS PLANTAS TERRESTRES	16
1.2 BASES MOLECULARES DA TERRESTRIALIZAÇÃO.....	17
1.3 DESENVOLVIMENTO DE ÓRGÃOS SUBTERRÂNEOS E A EVOLUÇÃO DO SISTEMA SOLO-PLANTA	19
1.4 SOLO: DEFINIÇÃO E A INTERFACE COM ORGANISMOS	19
1.5 A TEORIA DA ORIGEM TERRESTRE DAS PLANTAS	22
1.6 INTERAÇÕES MICROBIANAS E O CONTEXTO ECOLÓGICO DA TERRESTRIALIZAÇÃO.....	24
1.7 COMUNIDADES MICROBIANAS COMO CHAVE PARA COMPREENDER A EVOLUÇÃO DAS PLANTAS TERRESTRES	25
1.8 HIPÓTESE DO ESTUDO	26
2. OBJETIVOS	27
2.1 GERAL:	27
2.2 ESPECÍFICOS:	27
3. METODOLOGIA	28
3.1 COLETA E ANÁLISE DOS DADOS METEOROLÓGICOS.....	28
3.2 AMOSTRAGEM DAS CROSTAS FOTOSSINTÉTICAS DE SOLO.....	29
3.3 EXTRAÇÃO, DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA METAGENÔMICO	30
3.4 CONSTRUÇÃO E SEQUENCIAMENTO DAS BIBLIOTECAS	31
3.5 PROCESSAMENTO E ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DOS MARCADORES TAXONÔMICOS	32
3.5.1 Importação e demultiplexação	32
3.5.2 Processamento das sequências	33
3.5.3 Análise filogenética e classificação taxonômica.....	34
3.5.4 Filtragem de ruído metodológico e taxonômico	35
3.5.5 Normalização e transformação dos dados.....	36
3.5.6 Análises estatísticas e visualização dos dados.....	37
3.5.7 Padronização da nomenclatura taxonômica.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 EFICIÊNCIA DO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO E QUALIDADE DO DNA METAGENÔMICO .	40
4.2 COMPOSIÇÃO E DIVERSIDADE DAS COMUNIDADES MICROBIANAS	41
4.2.1 Composição bacteriana observada – 16S.....	41
4.2.2 Composição não-fúngica eucariótica observada – 18S.....	43
4.2.3 Composição fúngica eucariótica observada – ITS	44
4.3 AVALIAÇÃO DA COBERTURA DE SEQUENCIAMENTO E ÍNDICES DE DIVERSIDADE.....	44
4.4 DISTRIBUIÇÃO SAZONAL DOS ORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES	47
4.5 RELAÇÕES DE COOCORRÊNCIA E INTERAÇÕES MICROBIANAS.....	50
4.5.1 Estrutura das Redes de Interação	50
4.5.2 Dinâmica de Substituição Sazonal.....	51
4.5.3 Implicações Evolutivas - Parte I: Autonomia e Dependência Microbiana	52

4.5.4	<i>Implicações Evolutivas - Parte II: Padrões Temporais e Estratégias Adaptativas em Ambientes Sazonais</i>	54
4.5.5	<i>Implicações Evolutivas - Parte III: Substituição Sazonal e Funcionalidade Ecosistêmica</i>	55
4.5.6	<i>Implicações Evolutivas - Parte IV: Pressões Seletivas e Adaptação Contínua</i>	56
4.6	ANÁLISES PAREADAS E SEGREGAÇÃO SAZONAL DE GRUPOS FUNCIONAIS	57
4.7	ANÁLISES DE BETA-DIVERSIDADE E DINÂMICAS DE ESTRUTURAÇÃO SAZONAL.....	60
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
	ANEXO A - PRODUÇÃO ACADÊMICA	92
	ANEXO B – REFERÊNCIA ÀS IMAGENS UTILIZADAS	93

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Contexto evolutivo das plantas terrestres

As plantas terrestres (embriófitas) são elementos fundamentais dos ecossistemas modernos, sendo responsáveis pela produção de oxigênio, regulação do ciclo hidrológico e manutenção da biodiversidade global (Cruz et al., 2017). A colonização do ambiente terrestre por estas plantas representa um dos eventos mais significativos na história evolutiva da vida na Terra, tendo provocado profundas alterações na composição atmosférica, nos ciclos biogeoquímicos e na estrutura dos ecossistemas primitivos (Dahl & Arens, 2020).

Durante os primeiros bilhões de anos da história da Terra, a vida estava restrita aos ambientes aquáticos, enquanto os continentes permaneciam praticamente estéreis (Gueneli et al., 2018; Knoll et al., 2016). Embora o ambiente continental estivesse disponível logo após o surgimento da vida, a colonização efetiva do meio terrestre por organismos fotossintetizantes complexos ocorreu relativamente tarde na história evolutiva. As primeiras plantas terrestres são reconhecidas a partir do registro fóssil do período ordoviciano (cerca de 470 milhões de anos atrás) (Rubinstein et al., 2010; Servais et al., 2019; Strother et al., 1996; Wellman et al., 2003). No entanto, evidências moleculares baseadas em análises de relógio molecular e estudos filogenômicos sugerem que as plantas terrestres poderiam ter evoluído muito mais cedo (entre 520 e 580 milhões de anos atrás) (Donoghue et al., 2021; Morris et al., 2018).

Independentemente do momento preciso de sua origem, estudos filogenéticos e morfológicos estabeleceram que as embriófitas formam um grupo monofilético (Delwiche & Cooper, 2015; Ligrone et al., 2012; Mishler & Churchill, 1985), caracterizado pela presença de um embrião multicelular nutritivamente dependente do gametófito materno e mecanismos moleculares de proteção contra a dessecação. Este grupo provavelmente evoluiu de um ancestral em comum com as atuais CGA (algas carófitas verdes), constituindo juntas o clado Estreptófito (Streptophyta) (Fig. 1) (Delwiche & Cooper, 2015; Leliaert et al., 2012; Mikkelsen et al., 2014; Servais et al., 2019). Esta hipótese é fortemente suportada por múltiplas linhas de evidência, incluindo similaridades na composição da parede celular, presença de estruturas multicelulares complexas, compartilhamento de vias metabólicas específicas e perda de genes de motilidade relacionados com meio de vida aquático.

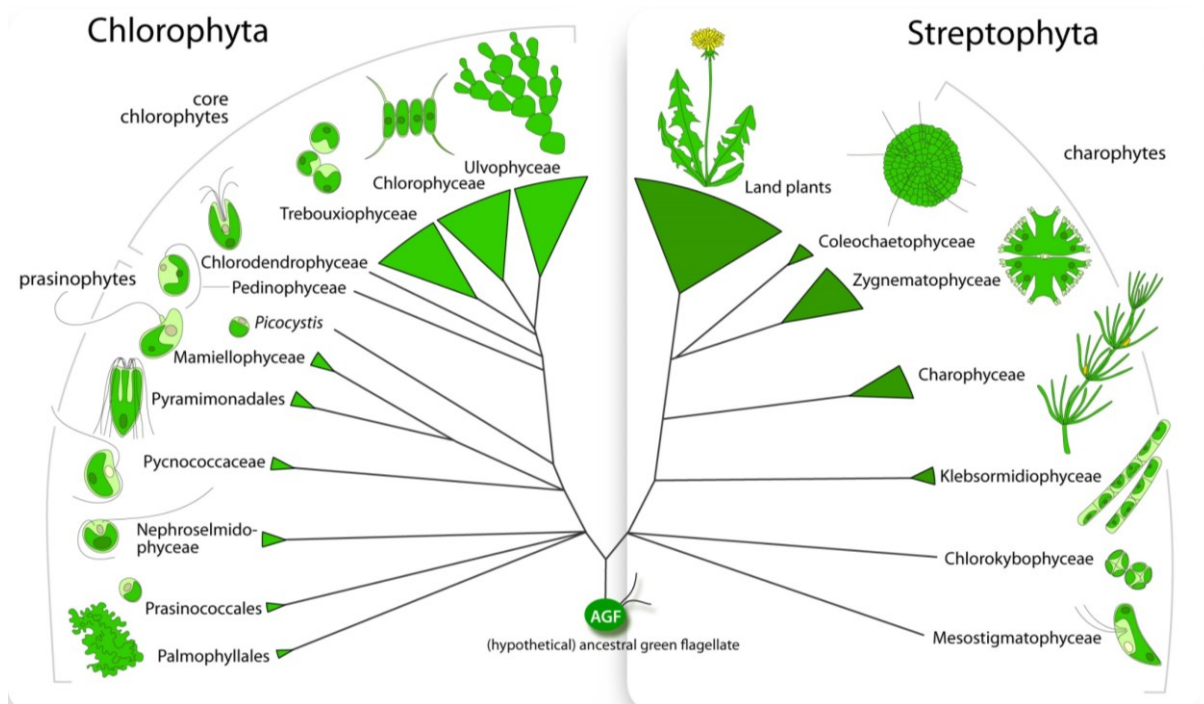


Figura 1: Filogenia simplificada das algas verdes (Chlorophyta e Streptophyta). O clado Streptophyta inclui as plantas terrestres (*land plants*) e as algas carófitas (charophytes), enquanto Chlorophyta compreende as demais linhagens de algas verdes. Adaptado de LELIAERT et al., 2012.

1.2 Bases moleculares da terrestrialização

A parede celular é uma estrutura fundamental para as plantas terrestres, fornecendo suporte mecânico, proteção contra patógenos e regulação das relações hídricas (Houston et al., 2016). Sua composição e arquitetura são determinantes para a sobrevivência no ambiente terrestre, onde os organismos enfrentam desafios como a dessecação e a necessidade de suporte estrutural (Kolkas et al., 2023; Nishiyama et al., 2018). O processo de biogênese da parede celular está intimamente ligado à divisão celular; embriófitas e algumas CGA apresentam um mecanismo especializado de citocinese mediado pelo fragmoplasto (Nishiyama et al., 2018), uma estrutura do citoesqueleto essencial para a formação da nova parede celular entre células-filhas (Panteris et al., 2021; Smith, 1999).

Esta semelhança na maquinaria de síntese da parede celular é acompanhada por similaridades em sua composição. Estudos revelaram que os principais polissacarídeos que compõem a parede celular das plantas terrestres já estavam presentes nas CGA (Del-Bem, 2018; Mikkelsen et al., 2014; Nishiyama et al., 2018; Pfeifer et al., 2022; Sørensen et al., 2012): a celulose, que fornece resistência mecânica; o xilano, importante componente estrutural das paredes secundárias; proteínas arabinogalactanas (AGPs), que atuam na adesão celular e resposta ao estresse; e o xiloglucano (XyG), que desempenha papéis tanto estruturais quanto regulatórios. O XyG, em particular, demonstrou ser um potente agregador de partículas do solo, sendo liberado por células das raízes e rizoides de todas as plantas terrestres, modificando o

ambiente rizosférico e contribuindo para a estabilização do solo, facilitando a absorção de nutrientes (Galloway et al., 2018, 2020). Embora inicialmente considerado uma adaptação específica de plantas terrestres, Del-Bem (2018) mostrou, através do estudo da evolução das famílias gênicas envolvidas na síntese de XyG, que a maquinaria completa necessária para sua síntese já estava presente em CGA (Fig. 2).

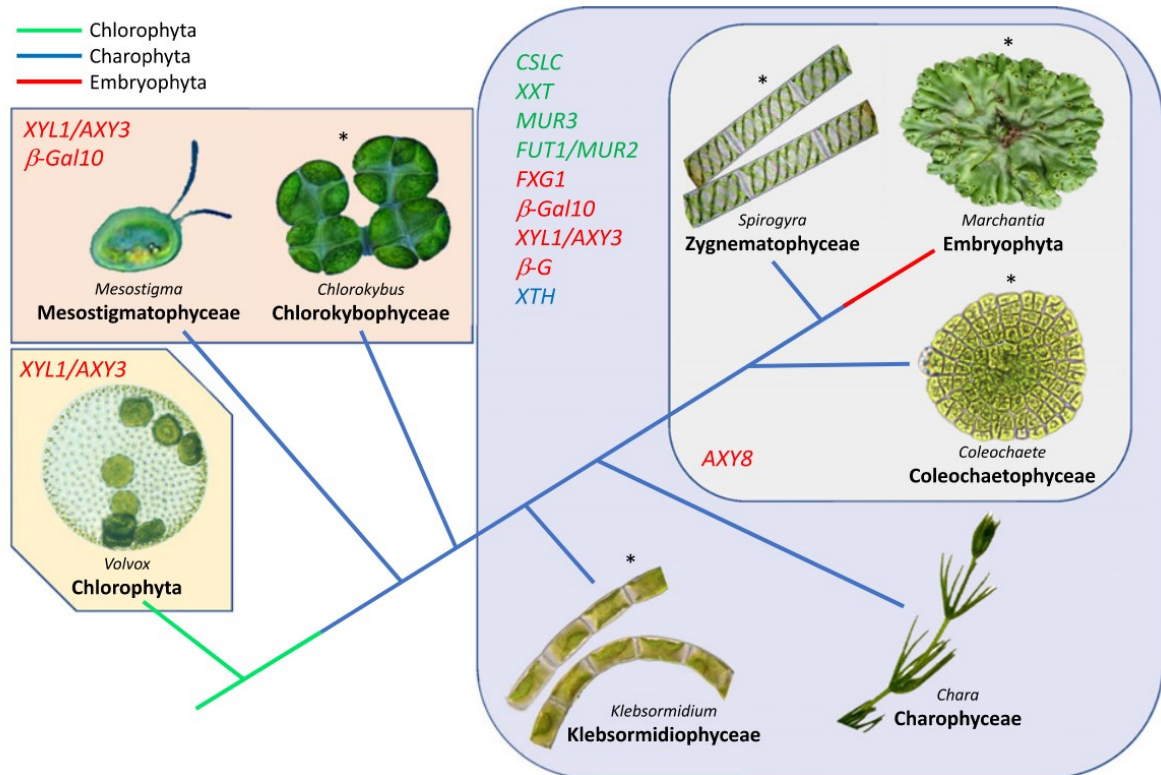


Figura 2: Evolução da maquinaria genética relacionada à síntese e modificação do xiloglucano (XyG) em Viridiplantae. As caixas delimitam os principais grupos com base na presença de genes específicos. Asteriscos (*) indicam grupos com espécies terrestres ou facultativamente terrestres. As cores das enzimas indicam suas funções: verde (síntese), vermelho (degradação) e azul (modificação do XyG). Adaptado de DEL-BEM, 2018.

A transição para o ambiente terrestre envolveu não apenas a aquisição de novas características moleculares, mas também a perda seletiva de genes associados ao meio aquático. Uma das mais significativas foi a redução progressiva do aparato flagelar ao longo da linhagem Streptophyta, onde organismos não-flagelados perderam componentes essenciais como proteínas de raios radiais, do par central e dos braços de dineína. Esta simplificação estrutural, culminando na completa perda de estágios flagelados em alguns grupos, possivelmente redirecionou recursos energéticos e moleculares para o desenvolvimento de características mais relevantes ao ambiente terrestre (Bierenbroodspot et al., 2024; Simon et al., 2006; S. Wang et al., 2019).

Estas evidências moleculares indicam que o conjunto completo de genes relacionados à síntese destes polissacarídeos, assim como outras adaptações celulares complexas encontradas nas primeiras plantas terrestres, já existiam previamente nas algas carófitas, sugerindo que a infraestrutura molecular necessária para a transição à vida terrestre já estava presente nestes organismos aquáticos (de Vries & Archibald, 2018). Esta descoberta tem importantes implicações para nossa compreensão do processo de terrestrialização, sugerindo que muitas das adaptações moleculares necessárias para a vida em terra emergiram antes da colonização efetiva do ambiente terrestre (Delwiche & Cooper, 2015; Harholt et al., 2016; Monard et al., 2016).

1.3 Desenvolvimento de órgãos subterrâneos e a evolução do sistema solo-planta

Enquanto as plantas herdaram as adaptações moleculares das CGA (Fig. 2), a perda progressiva de estruturas de motilidade aquática foi acompanhada pelo desenvolvimento de inovações morfológicas para lidar com pressões seletivas impostas pelo ambiente terrestre. Entre estas inovações, destaca-se a presença de órgãos subterrâneos especializados, como os rizoides de briófitas e raízes de traqueófitas, estruturas multicelulares complexas que desempenham funções cruciais na ancoragem, absorção de água e nutrientes, e estabelecimento de interações com microrganismos do solo (Khan et al., 2016; Raven & Edwards, 2001; Verma et al., 2021). É possível reconhecer órgãos subterrâneos bem desenvolvidos nas plantas terrestres presentes no mais antigo ecossistema terrestre *in situ* preservado (Hetherington & Dolan, 2018). Isso sugere que quando o último ancestral comum das embriófitas emergiu, havia solo nutritivo e provavelmente era uma vantagem evolutiva fundamental desenvolver órgãos subterrâneos para obter nutrientes e interagir com fungos e bactérias de forma similar ao que as plantas terrestres existentes fazem.

Além disso, evidências genéticas sugerem que a CGA ancestral de plantas terrestres, possivelmente, foi capaz de algum grau de interação simbiótica com fungos terrestres (Chang et al., 2015; Delaux et al., 2015). Estas interações primitivas possivelmente estabeleceram as bases para o desenvolvimento das complexas simbioses observadas nas plantas atuais, como as micorrizas arbusculares e os nódulos fixadores de nitrogênio (F. Martin et al., 2017; Provorov et al., 2002). Este cenário evolutivo levanta questões cruciais sobre a relação temporal entre pedogênese e colonização terrestre: teriam os processos de formação do solo precedido o estabelecimento das primeiras plantas terrestres?

1.4 Solo: Definição e a interface com organismos

Para abordar esta questão, é importante compreender que o solo é geralmente definido como o material sólido na superfície da Terra que resulta da interação do intemperismo e da

atividade biológica nas rochas ou no material de origem (Bockheim & Gennadiyev, 2000; Hartemink & Bockheim, 2013). Este sistema complexo é composto por partículas minerais de diferentes tamanhos, matéria orgânica, água, ar e organismos vivos, organizados em uma estrutura dinâmica que suporta a vida (Jonge et al., 2012).

Uma das principais propriedades dos solos é a agregação de suas partículas, geralmente mediada por moléculas orgânicas, o que sugere que a formação e as propriedades do solo são, pelo menos parcialmente, dependentes da atividade biológica (Fig. 3) (Lucas et al., 2019; Nannipieri et al., 2003; Schulz et al., 2013). A agregação biológica dos solos e o sequestro de carbono são atribuídos às plantas terrestres e aos micorrizos (fungos associados simbioticamente com as raízes das plantas terrestres) (Andrade et al., 1998; Rillig et al., 2017) e supõe-se que este processo tenha começado com a origem das embriófitas no período ordoviciano (R. Mitchell et al., 2016; Parnell & Foster, 2012; Rubinstein et al., 2010; Wellman et al., 2003).

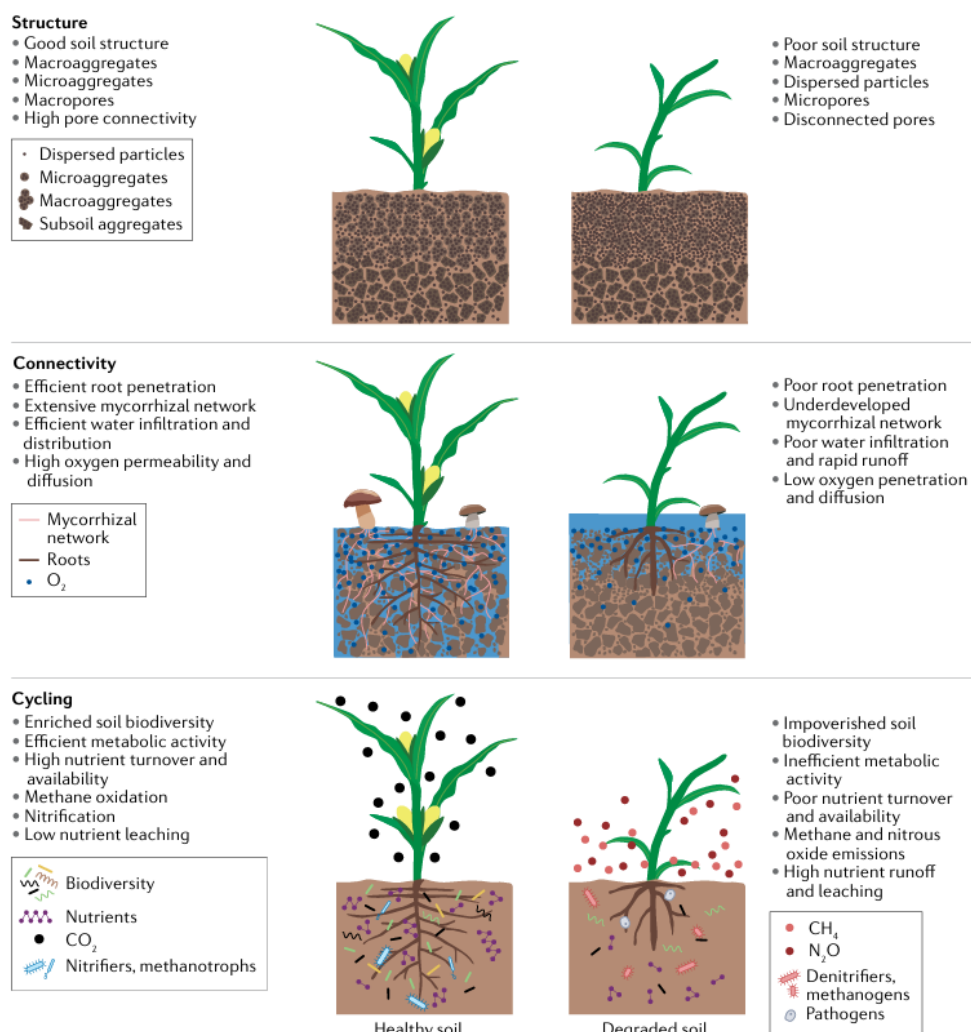


Figura 3: Propriedades estruturais e funcionais de solos demonstrando a vantagem evolutiva do desenvolvimento de raízes. Solos estruturalmente desenvolvidos (esquerda) favorecem o estabelecimento de redes de raízes e microrganismos, promovendo melhor conectividade, ciclagem de

nutrientes e biodiversidade quando comparados a solos degradados (direita). Esta estruturação do solo precede o surgimento das raízes, evidenciando que as plantas terrestres evoluíram em um ambiente edáfico já estabelecido. Adaptado de HARTMANN & SIX, 2022.

No entanto, evidências geológicas e geoquímicas sugerem que antes do estabelecimento das primeiras plantas terrestres, os 'proto-solos' já apresentavam características fundamentais, sendo formados principalmente por intemperismo físico e químico e influenciados por atividade microbiana, possivelmente facilitando a transição das algas carófitas para o ambiente terrestre e posterior avanço das embriófitas primordiais (Cheng et al., 2019; Kaviya et al., 2019; R. L. Mitchell et al., 2019). Neste cenário de transição, possivelmente a interface entre os ambientes aquático e terrestre era caracterizada por uma complexa dinâmica espaço-temporal. Além dos gradientes espaciais de umidade que funcionavam como "zonas de transição", diferentes áreas apresentavam distintas dinâmicas de variação ambiental e temporal (de Vries & Archibald, 2018; Harholt et al., 2016; Kunz et al., 2024). Enquanto algumas áreas experimentavam ciclos previsíveis de hidratação e dessecação, outras apresentavam um gradiente progressivo de aridez conforme se distanciavam dos corpos d'água (Delwiche & Cooper, 2015; Hetherington & Dolan, 2018; Leliaert et al., 2012). Estes diferentes padrões de variação temporal podem ter sido cruciais na seleção de diferentes estratégias adaptativas.

A sobrevivência nestes ambientes de transição dependia fundamentalmente das características físico-químicas locais. Estas zonas de transição apresentavam propriedades particulares como: (1) Capacidade de retenção de água variável, dependendo da granulometria do substrato e da presença de biofilmes microbianos, que podiam atuar como retentores naturais de umidade (Guo et al., 2018); (2) Disponibilidade de nutrientes minerais resultantes do intemperismo das rochas, com processos microbianos aumentando a disponibilidade de nutrientes através do intemperismo químico e aumento da capacidade de troca catiônica, potencialmente mais concentrados que no ambiente aquático devido à evaporação (Borin et al., 2010); e (3) Presença de comunidades microbianas já estabelecidas realizando processos biogeoquímicos importantes como a ciclagem de nutrientes, incluindo nitrogênio e fósforo (Ewens et al., 2020; Raymond et al., 2004).

Estas características dos "proto-solos" e suas interações entre organismos fotossintéticos e comunidades microbianas no solo primitivo podem ser observadas hoje nas Crostas Fotossintéticas de Solo (CFS): agregações superficiais compostas principalmente por cianobactérias e algas eucarióticas. As CFS representam um análogo moderno de como os primeiros organismos fotossintéticos podem ter se estabelecido e interagido no ambiente terrestre, fornecendo evidências sobre os processos iniciais de colonização do solo.

O estudo destas comunidades modernas, junto com as evidências geológicas e moleculares discutidas, sugere que o desenvolvimento dos solos não foi apenas uma consequência da colonização terrestre pelas plantas, mas um processo gradual que começou com a atividade microbiana e o intemperismo físico-químico, criando condições que possivelmente facilitaram a terrestrialização de outros organismos e a colonização do ambiente continental pelas embriófitas (R. Mitchell et al., 2016). A presença de adaptações moleculares nas CGA ancestrais das plantas terrestres, como a capacidade de produzir polissacarídeos complexos, pode ter permitido que estes organismos interagissem de forma efetiva com os substratos primitivos, estabelecendo as bases para a futura colonização terrestre (Galloway et al., 2018).

1.5 A teoria da origem terrestre das plantas

A descoberta de genes relacionados à agregação do solo em CGA e a suposição que estes genes haviam contribuído para a formação dos solos levantou uma questão evolutiva: Por que organismos tradicionalmente considerados aquáticos precisariam de genes para produzir um agregador de solo potente? Essa aparente contradição levou a uma reavaliação fundamental das teorias sobre a origem das plantas terrestres. A resposta mais provável é que elas têm ancestrais terrestres que desenvolveram o maquinário para a produção de XyG para modelar as propriedades iniciais do solo em resposta a pressões seletivas associadas à vida terrestre (Del-Bem, 2018; Mikkelsen et al., 2021). Isso forneceu uma nova evidência independente de que as plantas terrestres evoluíram a partir das CGA terrestres que desenvolveram adaptações na parede celular que foram posteriormente herdadas tanto pelas embriófitas quanto pelas carófitas que retornaram secundariamente ao ambiente aquático (Fig. 2, Fig. 4) (Harholt et al., 2016). Esta perspectiva desafia a teoria hegemônica de que as plantas terrestres evoluíram a partir das CGA aquáticas complexas (morfologicamente semelhantes aos gêneros *Chara* e *Nitella* da classe Charophyceae) na zona de transição entre água doce e terra (Becker & Marin, 2009; Willis & McElwain, 2014). A presença de maquinaria molecular para agregação do solo em CGA (Fig. 2) e a compreensão da estrutura e formação dos solos (Fig. 3) fornecem suporte adicional para esta hipótese.

Independentemente de sua origem ter sido aquática ou terrestre, estas linhagens precisaram se adaptar à zona de transição entre água doce e terra, um ambiente caracterizado por ciclos de hidratação e dessecação (Gray et al., 2007; Terlova et al., 2021). Esta interface representava um desafio adaptativo significativo, onde a sobrevivência dependia de múltiplos mecanismos de tolerância ao estresse, incluindo a produção de mucilagem, paredes celulares

flexíveis, agregação celular e acúmulo de compostos osmoticamente ativos (Fig. 4) (Holzinger & Pichrtová, 2016; Terlova et al., 2021).

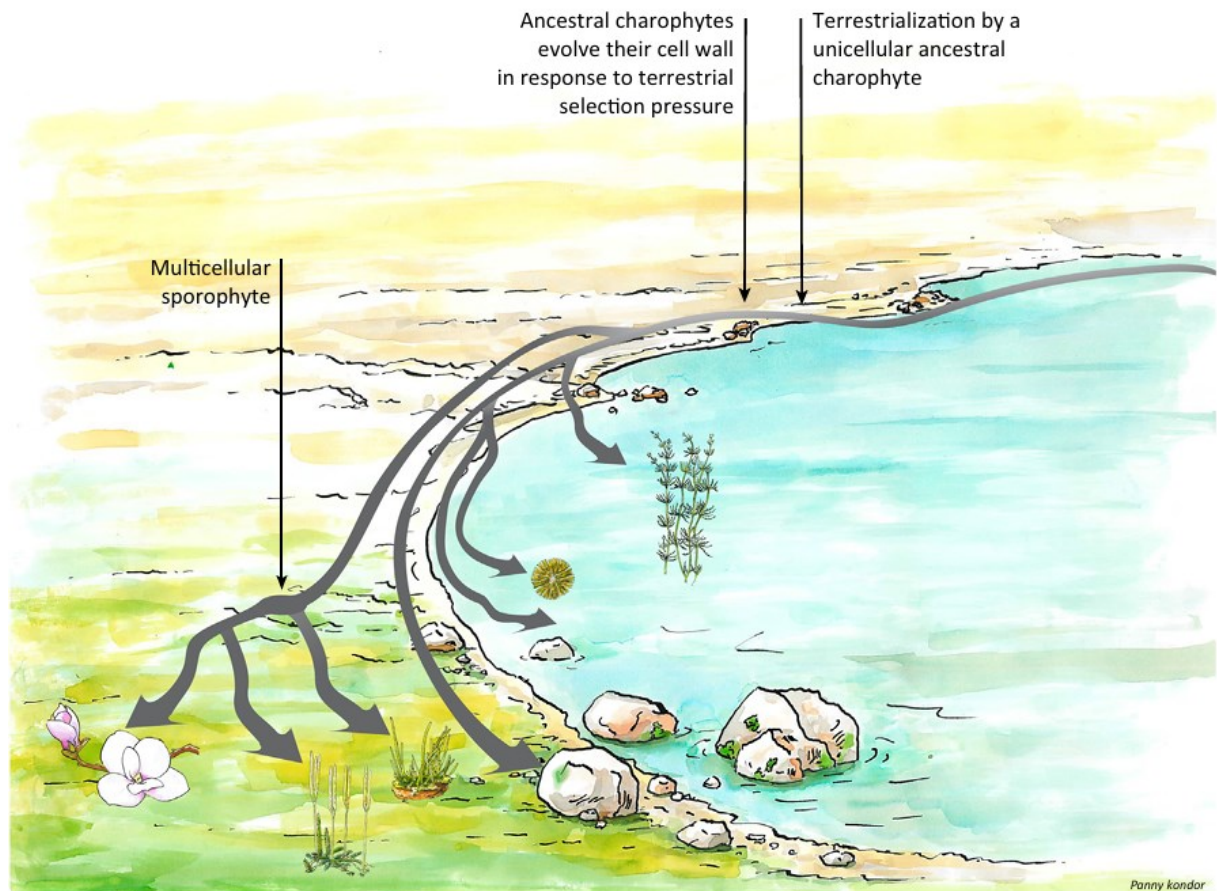


Figura 4: Modelo evolutivo propondo a origem terrestre das plantas. O esquema ilustra eventos-chave: a terrestreização inicial por uma carófito unicelular ancestral e o desenvolvimento subsequente da parede celular em resposta a pressões seletivas terrestres. Algumas linhagens permaneceram como carófitos terrestres, outras retornaram secundariamente ao ambiente aquático, enquanto outras desenvolveram o esporófito multicelular, levando às plantas vasculares modernas. Adaptado de HARHOLT; MOESTRUP; ULVSKOV, 2016.

Enquanto algumas classes de água doce desenvolveram esporos quiescentes como estratégia de sobrevivência, grupos verdadeiramente terrestres apresentam tolerância ao estresse em seu estado vegetativo (Holzinger & Pichrtová, 2016). Esta distinção fundamental nas estratégias de sobrevivência reflete diferentes trajetórias evolutivas na adaptação ao ambiente terrestre. A tolerância vegetativa envolve complexos mecanismos moleculares e fisiológicos, incluindo a produção de osmólitos compatíveis, proteínas de proteção contra dessecação e reorganização da parede celular (Artur & Kajala, 2021; Oliver et al., 2000). A capacidade de sobreviver a estas flutuações de umidade continuam sendo observada em CGA modernas que habitam ambientes terrestres úmidos ou periodicamente inundados, sugerindo que estas adaptações foram cruciais na história evolutiva destes organismos (Domozych & Bagdan, 2022; Rey-Boissezon & Auderset Joye, 2015; Romanov et al., 2023). Notavelmente, análises moleculares revelam que genes associados à tolerância ao estresse hídrico em plantas

terrestres modernas já estavam presentes em seus ancestrais, indicando que o aparato molecular básico para a vida terrestre precedeu a diversificação morfológica (Cheng et al., 2019, 2019; Joshi et al., 2016; Nishiyama et al., 2018). No entanto, estas adaptações moleculares individuais representam apenas uma parte da história evolutiva das plantas terrestres. Igualmente crucial foi o desenvolvimento de interações ecológicas complexas que podem ter facilitado a sobrevivência em ambientes terrestres.

1.6 Interações microbianas e o contexto ecológico da terrestrialização

Além das adaptações individuais, evidências sugerem que a formação de comunidades microbianas complexas, como as CFS, podem ter sido fundamentais no processo de transição entre água-doce e terra (Monard et al., 2016). Nestas comunidades, as algas frequentemente coexistem com outros microrganismos em uma matriz extracelular compartilhada, proporcionando proteção contra dessecação e outros estresses ambientais (Blanco et al., 2019; Domozych & LoRicco, 2023). A matriz extracelular, composta principalmente por polissacarídeos, não apenas fornece proteção física, mas também atua como um reservatório de água e nutrientes, criando um microambiente tamponado contra variações ambientais (Ghassemi et al., 2022).

Este tipo de associação poderia ter facilitado a colonização de ambientes terrestres, criando microambientes mais favoráveis através de interações sinérgicas entre diferentes grupos de organismos (Fig. 5). Por exemplo, as interações sinérgicas com bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos nestas comunidades primitivas expandiam o acesso a nutrientes essenciais, enquanto cianobactérias contribuíram com a estabilização do substrato e retenção de umidade (Andrade et al., 1998; Bowles et al., 2018; Chamizo et al., 2018). Essa dinâmica é particularmente relevante quando consideramos que as Streptophyta foram o único grupo de eucariotos fotossintéticos que deu origem à flora terrestre macroscópica, embora outros grupos de algas tenham colonizado o ambiente terrestre independentemente ao longo da evolução. As CFS, formadas por algas terrestres de várias afiliações taxonômicas, fornecendo um modelo natural para compreender como as primeiras comunidades fotossintéticas podem ter se estabelecido e persistido no ambiente terrestre (Fürst-Jansen et al., 2020).

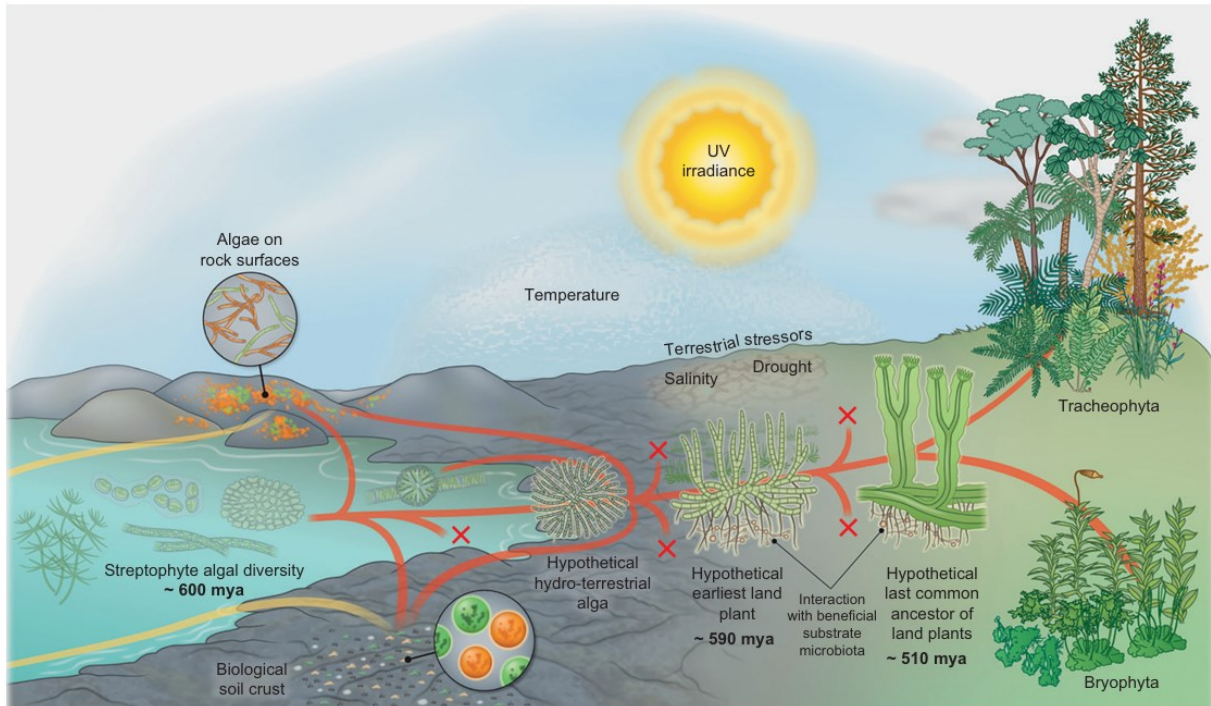


Figura 5: Cenário evolutivo das plantas terrestres destacando a importância das interações com a microbiota do substrato e as adaptações aos estresses ambientais. As linhagens de Streptophyta (linhas vermelhas) que deram origem às plantas terrestres desenvolveram adaptações cruciais em ambientes hidro-terrestres de transição, incluindo associações com microrganismos benéficos do solo, antes da diversificação dos principais grupos modernos (~510 Milhões de anos). Adaptado de FÜRST-JANSEN; DE VRIES; DE VRIES (2020).

1.7 Comunidades microbianas como chave para compreender a evolução das plantas terrestres

A compreensão da origem e evolução das plantas terrestres tem tradicionalmente focado nos aspectos moleculares conservados entre algas carófitas e embriófitas. Esta abordagem, embora fundamental, tende a subestimar o papel das interações ecológicas multiespécie. Com o avanço das técnicas moleculares, especialmente as análises metataxonômicas (ou de *metabarcoding*), tornou-se possível caracterizar de forma abrangente a complexidade destas comunidades. O metabarcoding, através do sequenciamento massivo de regiões específicas do DNA (marcadores moleculares como 16S rRNA, 18S rRNA e ITS), permite identificar simultaneamente múltiplos organismos em uma amostra ambiental, revelando não apenas a composição taxonômica, mas também padrões de coocorrência e potenciais interações entre diferentes grupos. Esta abordagem é particularmente valiosa no estudo de comunidades microbianas complexas como as CFS, onde muitos organismos são difíceis ou impossíveis de cultivar em laboratório. As análises metataxonômicas nos permitem não apenas investigar a composição e dinâmica destas comunidades em diferentes condições ambientais (Francioli et al., 2021; Rippin et al., 2018), mas também reconstruir redes de interação e identificar padrões de coocorrência entre diferentes grupos de organismos.

Embora a conservação de mecanismos moleculares entre algas carófitas e plantas terrestres seja bem estabelecida, as evidências crescentes destacam o papel fundamental das interações bióticas e da formação de comunidades complexas no sucesso evolutivo destes organismos (Fig. 5) (Fürst-Jansen et al., 2020). Esta perspectiva sugere que a evolução das plantas terrestres não pode ser completamente compreendida através do estudo de linhagens isoladas, mas requer uma abordagem que considere as comunidades como unidades evolutivas (Delaux & Schornack, 2021; Delwiche & Cooper, 2015). O estudo de como estas comunidades respondem a variações sazonais de umidade hoje oferece uma janela única para compreender as condições e interações que podem ter sido fundamentais na história evolutiva das plantas terrestres. Esta abordagem centrada na comunidade tem implicações importantes para nossa compreensão não apenas da terrestrialização inicial, mas também dos processos evolutivos que levaram à origem das plantas terrestres e ao estabelecimento dos primeiros ecossistemas terrestres complexos.

1.8 Hipótese do estudo

A hipótese deste trabalho é que as comunidades microbianas das crostas fotossintéticas de solo, particularmente as algas carófitas e seus organismos associados, apresentam variações em sua composição e estrutura entre as estações seca e chuvosa, mesmo em ambientes distantes de corpos d'água permanentes. Neste contexto, as crostas fotossintéticas de solo modernas, com sua rica diversidade de algas carófitas e microrganismos associados, representam um modelo natural excepcional para investigar como as comunidades ancestrais podem ter respondido às variações ambientais durante o processo de terrestrialização. A persistência destas comunidades em ambientes sazonais nos permite examinar em tempo real as estratégias adaptativas e interações que podem ter sido cruciais durante a colonização inicial do ambiente terrestre.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Investigar a composição e diversidade taxonômica de comunidades microbianas em Crostas Fotossintéticas de Solo sob diferentes condições de precipitação.

2.2 Específicos:

- Avaliar como diferentes regimes de precipitação influenciam a composição e estrutura das comunidades microbianas nestas crostas.
- Investigar relações de coocorrência entre grupos microbianos que possam fornecer evidências sobre interações primitivas que facilitaram a colonização terrestre pelo ancestral comum das embriófitas.

3. METODOLOGIA

3.1 Coleta e análise dos dados meteorológicos

Os períodos de amostragem foram planejados com base na sazonalidade bem definida na cidade brasileira de Belo Horizonte, que permite um contraste bem definido entre as estações do ano. Na cidade situada no estado de Minas Gerais, a temporada de chuvas geralmente ocorre entre os meses de novembro e março, com a coleta referente ao período chuvoso (*Wet*) realizada no dia 25 de janeiro de 2020. Por outro lado, a temporada seca (*Dry*) se estende de maio a setembro, com a coleta referente a este período realizada no dia 26 de setembro de 2019. Para delimitar essas temporadas, realizamos uma análise detalhada dos dados meteorológicos coletados na região. Os dados da estação meteorológica “Belo Horizonte (PAMPULHA) A521” foram obtidas na tabela de dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) através do endereço eletrônico <https://tempo.inmet.gov.br/>. Os dados meteorológicos coletados incluíram informações sobre precipitação, temperatura e radiação solar nos 30 dias anteriores às datas de coleta. Entre esses parâmetros, a precipitação foi o fator de maior relevância e variação entre as estações, desempenhando um papel central no delineamento experimental.

Durante a estação chuvosa, observou-se um acúmulo substancial de precipitação, onde a quantidade de chuva acumulada ultrapassou 700 mm em 30 dias (Fig. 6b). Mais importante ainda, a Fig. 6c mostra a média diária de precipitação, revelando que essa alta precipitação acumulada durante o período chuvoso não se deve a poucos eventos de chuva intensa, mas sim a uma distribuição consistente ao longo de todo o período. Isso indica que a estação chuvosa não é caracterizada por picos esporádicos, mas por um padrão contínuo de umidade elevada. Essa distribuição uniforme da precipitação ao longo de diferentes intervalos de tempo (7, 15 e 30 dias) confirma a definição do período chuvoso como uma fase de umidade sustentada, fundamental para a contextualização ambiental do estudo. Em contraste, a estação seca registrou níveis de precipitação muito inferiores. Essas diferenças marcantes foram determinantes para a escolha dos períodos de coleta, uma vez que as condições de umidade influenciam diretamente a composição e a atividade biológica das CFS.

Embora outros parâmetros meteorológicos tenham sido monitorados, incluindo temperatura média diária e radiação solar total (Fig. 6d-f), suas variações foram menos expressivas entre as estações. A precipitação emergiu, portanto, como o principal fator climático diferencial entre os períodos. Assim, a amostragem foi estrategicamente planejada para contrastar períodos de alta (*Wet*) e baixa (*Dry*) precipitação, com mínima interferência de outras variáveis meteorológicas.

3.2 Amostragem das Crostas Fotossintéticas de Solo

Amostras de Crostas Fotossintéticas de Solo (CFS), identificadas pela sua coloração característica esverdeada, foram coletadas na Estação ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), situada na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (19°52'37.2"S, 43°58'12.0"W) (Fig. 6a). A região foi escolhida por: (1) ser uma área de floresta conservada de fácil acesso através da UFMG; (2) permitir a padronização da localização de coleta e do tipo de solo coletado (latossolo), minimizando variações edáficas; e (3) trânsito reduzido de humanos, reduzindo interferências antropogênicas na região.

A amostragem foi realizada em áreas expostas ao sol, onde as CFS se apresentavam como manchas isoladas, destacando-se em contraste com o substrato circundante. As crostas apresentavam uma espessura característica de aproximadamente 0,5 mm, formando uma fina camada esverdeada sobre o solo. De cada mancha, foi coletada toda a área visível da crosta, sem estabelecer um peso específico durante a coleta, priorizando a integridade da comunidade microbiana. Cada local de coleta foi considerado uma amostra única, e sítios distintos foram amostrados em cada estação, refletindo a dinâmica e a variabilidade natural dessas comunidades microbianas. Esta estratégia de amostragem, combinada com a seleção criteriosa dos locais de coleta, visou minimizar variáveis que pudessem influenciar a composição das comunidades microbianas estudadas, ao mesmo tempo em que capturava sua heterogeneidade natural.

Escolhidos os sítios de coleta, fragmentos das crostas foram cuidadosamente coletados utilizando uma pinça de ferro esterilizada e armazenados em tubos de vidro (Fig. 6a). Antes do armazenamento a -80°C, as amostras foram submetidas a uma análise microscópica para caracterização e seleção do material. Esta análise permitiu tanto a identificação de estruturas características de algas das ordens Trentepohliales e Klebsormidiales (Fig. 6), quanto a exclusão de amostras que apresentavam estruturas vegetais como protonemas de musgos, garantindo assim a especificidade do estudo para comunidades microbianas. As Trentepohliales (Fig. 6a painel superior) foram caracterizadas por filamentos não ramificados com intensa coloração avermelhada-alaranjada, particularmente concentrada nas extremidades das células (Lemes-da-Silva et al., 2017; López-Bautista et al., 2006), sendo mais abundantes durante o período seco. Já as Klebsormidiales (Fig. 6a painel inferior) apresentaram filamentos também não ramificados, porém com coloração verde e conteúdo celular mais disperso (Rindi et al., 2008), predominando durante o período chuvoso. A análise microscópica foi realizada imediatamente após a coleta para garantir a preservação das características morfológicas, resultando na seleção final de 15 amostras para cada período de amostragem (seco e chuvoso).

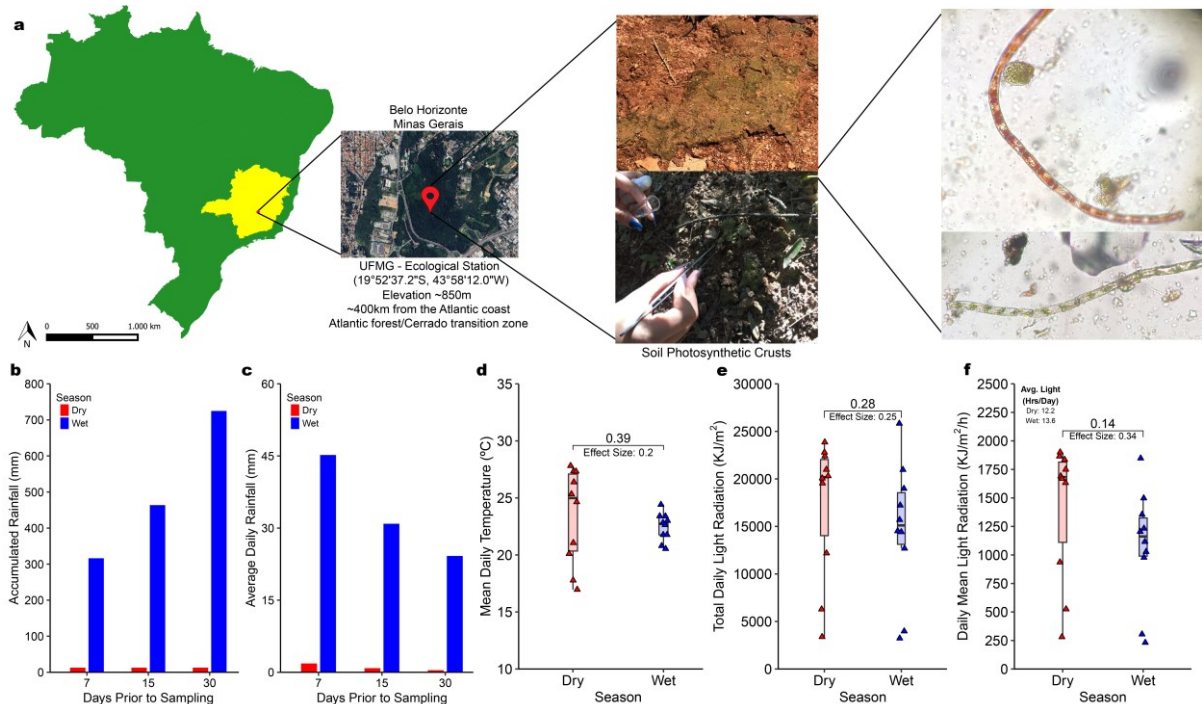


Figura 6: Caracterização geográfica e meteorológica da área de coleta amostral. (a) Localização da Estação Ecológica da UFMG em Belo Horizonte, Brasil (19°52'37.2"S, 43°58'12.0"W), incluindo registro fotográfico das crostas fotossintéticas de solo coletadas e análise microscópica revelando estruturas características de algas de solo. (b) Precipitação acumulada e (c) média diária nos períodos de 7, 15 e 30 dias anteriores à coleta nas estações seca (*Dry*) e chuvosa (*Wet*). (d) Temperatura média diária, (e) radiação solar total diária e (f) radiação média diária nos 10 dias anteriores à coleta em ambas as estações. Valores de significância estatística (*p*) e tamanho do efeito (*Effect Size*) são mostrados nas barras horizontais acima dos gráficos, considerando que as diferenças são significativas quando $p < 0,05$. As horas médias de luz diária foram 12,2h (período seco) e 13,6h (período chuvoso). Os dados indicam que a precipitação foi o principal fator de diferenciação entre as estações, com temperatura e radiação solar apresentando variações menos expressivas.

3.3 Extração, detecção e quantificação do DNA metagenômico

As 30 amostras obtidas durante as coletas foram descongeladas à temperatura ambiente. Aproximadamente 250 miligramas de cada amostra foram pesados e transferidos para tubos específicos do kit de extração de DNA MO BIO PowerSoil DNA Isolation Kit (Qiagen, MD, EUA). Seguindo as instruções do fabricante, amostras com menos de 250 miligramas foram descartadas, resultando em 21 amostras viáveis para extração.

Após a extração, os produtos de DNA foram submetidos a testes de amplificação por reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) utilizando o kit Master Mix 1C (Phoneutria, MG, Brasil). A reação de 25 µl foi composta por: 6,25 µl do Master Mix, 2 µl dos primers Unibac II direcionados ao gene do RNA ribossomal 16S (*forward*: GGACTACHVGGGTWTCTAAT; *reverse*: CACGGTCGKCGGCCATT), 1 µl de DNA extraído e 15,75 µl de água ultrapura. O protocolo de PCR consistiu em desnaturação inicial

(96°C/5min), seguida por 40 ciclos de desnaturação (96°C/1min), anelamento (70°C/1min30s) e extensão (72°C/45s), com extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x. Para visualização, as amostras foram preparadas com 2 µl de tampão de carregamento TAE 6x, 1 µl de água Milli-Q, 1 µl de GelRed e 2 µl de DNA. A análise revelou inibição na amplificação e bandas de arrasto em algumas amostras, sugerindo a presença de ácidos orgânicos não removidos durante a extração. Para solucionar este problema, 1,25 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado à reação, ajustando o volume de água ultrapura para 14,5 µl. Esta modificação resultou em amplificação normal e eliminação das bandas de arrasto na eletroforese.

A quantificação do DNA foi realizada utilizando o Qubit Fluorometer com o kit Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific, EUA). As amostras foram preparadas com 1 µl de DNA e 199 µl de buffer Qubit com reagente Qubit Azul, e os padrões de calibração com 189 µl de buffer Qubit e 1 µl do reagente. As concentrações variaram significativamente, com duas amostras apresentando valores abaixo do limite de detecção (< 0,50 ng/mL), sendo estas removidas das análises subsequentes. Assim, 19 amostras foram selecionadas para as próximas etapas do estudo. O delineamento experimental está resumido na Fig. 7.

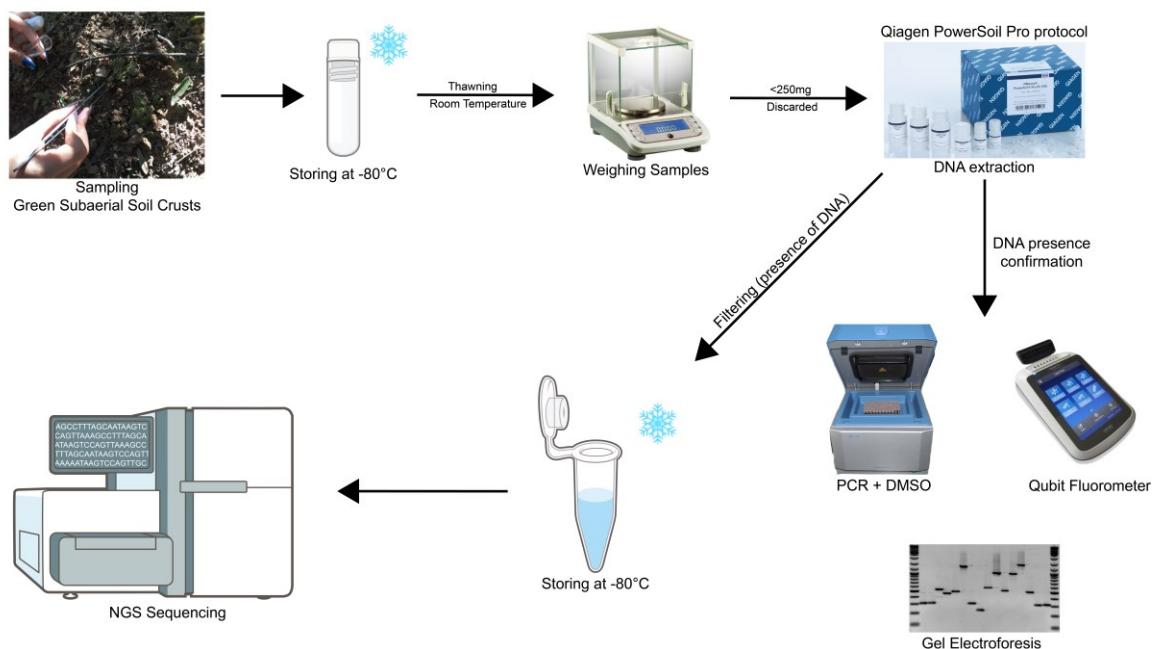


Figura 7: Visão geral do fluxo metodológico em laboratório.

3.4 Construção e sequenciamento das bibliotecas

Três diferentes marcadores moleculares foram utilizados para caracterizar a diversidade taxonômica das amostras: 16S rRNA (região V4) para bactérias, ITS1 para fungos e 18S rRNA (região V9) para eucariotos (Tabela 1). Os protocolos de amplificação foram adaptados do

Earth Microbiome Project para compatibilidade com a plataforma Ion Torrent S5, utilizando *linkers* específicos e sequenciamento *single-end*.

Tabela 1. Protocolos de amplificação e sequenciamento dos marcadores moleculares utilizados para caracterização taxonômica. Os protocolos foram adaptados do *Earth Microbiome Project* para a plataforma Ion Torrent S5.

Gene marcador	16S rRNA	ITS1	18S rRNA
Região alvo	V4	ITS1	V9
Grupo taxonômico	Procariotos (bactérias e arqueias)	Fungos	Eucariotos
Primer Forward	515f: GGACTACHVGGGTWTCTAAT	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	1391f: TATCGCCGTTCCGGTACACACCGCCGTC
Primer Reverse	806R: CACGGTCGKCGGCGCCATT	CACGGTCGKCGGCGCCATT	EukBr: TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC
Plataforma	Ion Torrent S5	Ion Torrent S5	Ion Torrent S5
Tipo de sequenciamento	<i>Single-end (reverse)</i>	<i>Single-end (reverse)</i>	<i>Single-end (reverse)</i>
Linker	CC	CC	CC
Observações	Dados entregues demultiplexados	Dados entregues demultiplexados e sem sequências dos primers	Necessitou demultiplexação posterior
URL do Protocolo (base)	earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/16s/	earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/its/	earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/18s/

3.5 Processamento e análise bioinformática dos marcadores taxonômicos

A análise bioinformática foi conduzida utilizando diferentes versões do pacote QIIME 2 (2020.8 a 2024.5) (Bolyen et al., 2019). O processamento seguiu três etapas principais: importação e demultiplexação, processamento das sequências, e classificação taxonômica. Todos os comandos e scripts utilizados estão disponíveis publicamente no repositório GitHub (https://github.com/brenoliisboa/soil_metabarcoding_scripts).

3.5.1 Importação e demultiplexação

As sequências do 16S e ITS, previamente demultiplexadas, foram importadas diretamente para o formato .qza do QIIME 2. Para o 18S, as sequências multiplexadas foram primeiro importadas e em seguida demultiplexadas usando o plugin Cutadapt (M. Martin, 2011). Os comandos específicos utilizados estão disponíveis no repositório GitHub.

3.5.2 Processamento das sequências

Os utilizados na reação de amplificação das sequências *primers* foram removidos das sequências usando o *plugin* Cutadapt e o *plugin* DADA2 (Callahan et al., 2016) foi utilizado para os passos de: *denoising*, clusterização e processamento final das sequências. Após a remoção dos *primers* e adaptadores (*barcodes*) pelo Cutadapt, as sequências foram truncadas em diferentes posições para cada marcador: 250 bases para o 16S, 227 bases para o ITS e 176 bases para o 18S (Fig. 8). Como resultado, foram geradas Variantes de Sequência de Amplicon (ASVs), que representam sequências únicas inferidas das sequências brutas de tamanho: 138bp – 18S, 227bp – ITS, e 226bp – 16S (Fig. 8, 9).



Figura 8: Distribuição dos tamanhos das sequências para os diferentes marcadores (16S, 18S, ITS). Apresentada em escala logarítmica com as diferentes etapas de corte. Cada rótulo indica a etapa de corte específica para o marcador.

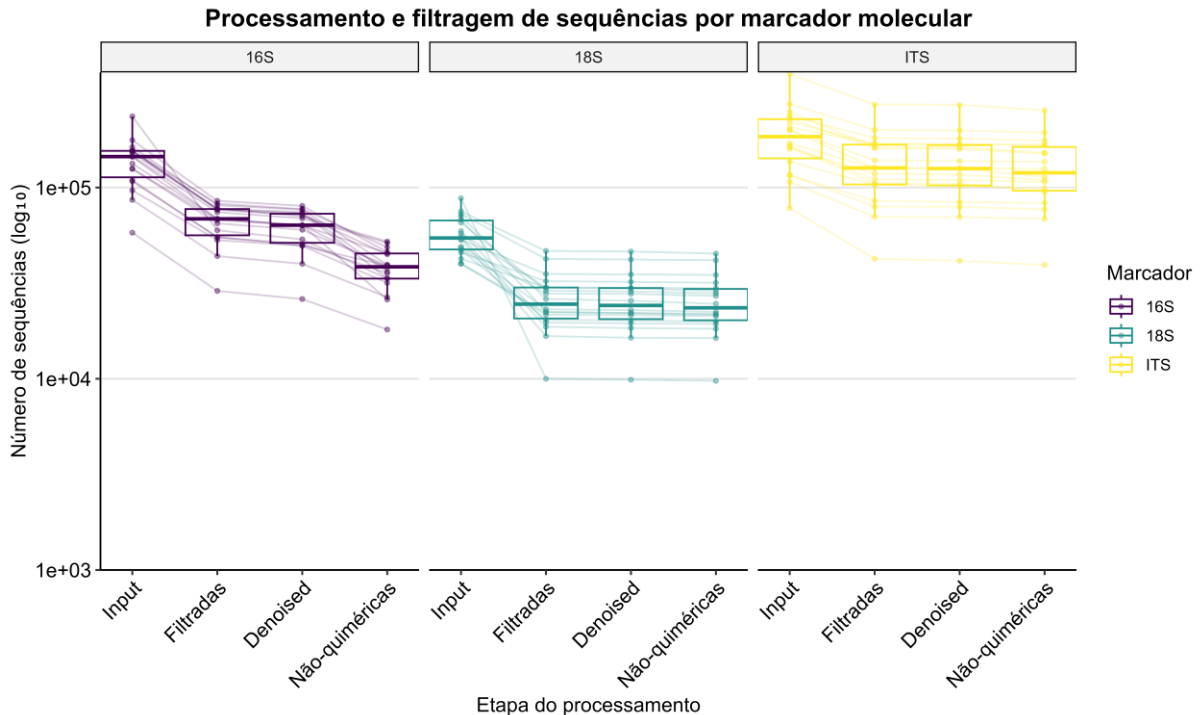


Figura 9: Número de sequências obtidas nas diferentes etapas de processamento para os marcadores moleculares 16S rRNA, 18S rRNA e ITS. As etapas incluem: sequências brutas (*Input*), sequências após filtragem de qualidade (*Filtradas*), após aplicação do algoritmo DADA2 (*Denoised*) e após remoção de quimeras (*Não-quiméricas*). Cada ponto representa uma amostra individual e as linhas conectam as mesmas amostras através das diferentes etapas de processamento. Os *boxplots* mostram a distribuição dos dados, com a linha central representando a mediana. A média final de sequências por amostra foi de aproximadamente 38.000 para 16S (27% das sequências iniciais), 25.000 para 18S (44%) e 120.000 para ITS (67%).

3.5.3 Análise filogenética e classificação taxonômica

As sequências representativas (rep-seqs ou ASVs) geradas pelo DADA2 no passo anterior foram utilizadas para a classificação taxonômica. Foram utilizados os bancos de dados disponíveis nas versões oficiais do QIIME:

- SILVA v132 (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014) para sequências 16S, usando o limiar de 97% de identidade;
- SILVA v132 (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014) para sequências 18S, usando o limiar de 97% de identidade;
- UNITE v10.0 (Abarenkov et al., 2024) para o ITS, usando classificação dinâmica específica para cada táxon.

A classificação foi realizada usando *fit-classifier-naive-bayes* e *classify-sklearn* (Bokulich et al., 2018) para construção do classificador de referência e para a classificação final das sequências, respectivamente.

As ASVs que receberam classificações específicas de interesse foram submetidas a análises adicionais. Para o marcador 16S, as ASVs classificadas como "*chloroplast*" foram extraídas e reclassificadas utilizando dois bancos de dados adicionais: o banco de dados completo de nucleotídeos do NCBI (Sayers et al., 2021) (versão de julho de 2022) e o banco de todos os plastomas completos disponíveis no NCBI em julho de 2022. Os dados de plastomas foi curado, montado e gentilmente cedido pelo M.Sc. Luís Garcia e continha 8.098 plastomas completos. O resultado da classificação está apresentado na Tabela 2.

Para o marcador 18S, as ASVs classificadas como "Viridiplantae" foram extraídas e reclassificadas contra o banco de dados completo de nucleotídeos do NCBI (versão de abril de 2024). Todas as buscas e alinhamentos foram realizadas utilizando o software BLAST (Altschul et al., 1990) com percentual de identidade de 90% (-perc_identity 90) e cobertura de 99% (-qcov_hsp_perc 99). A classificação final foi determinada através de uma análise de consenso entre os diferentes níveis taxonômicos (Ordem, Classe, etc.) convergentes nas diferentes classificações obtidas.

3.5.4 Filtragem de ruído metodológico e taxonômico

O R (v4.4), através do RStudio e seus pacotes foram utilizados para a geração de gráficos, manipulação de dados e análises estatísticas. O pacote qiime2r foi utilizado para importar os dados provenientes do QIIME2 e convertê-los para objetos do R (Jordan, 2018). Os pacotes tidyverse e phyloseq foram os principais pacotes utilizados para a manipulação de dados (McMurdie & Holmes, 2013; Wickham et al., 2019). Inicialmente, foi realizada uma filtragem taxonômica específica para cada marcador: para o ITS, foram removidas todas as ASVs não classificadas como *Kingdom* = "Fungi"; para o 18S, foram removidas ASVs classificadas como *Phylum* = "Embryophyta" ou *Kingdom* = "Fungi"; e para o 16S, os dados foram divididos em dois conjuntos: um contendo apenas sequências eucarióticas (exceto embriófitas) e outro contendo apenas Bacteria e Archaea. O conjunto de dados do 16S com eucariontes foi utilizado para uma classificação taxonômica mais refinada, aproveitando a maior disponibilidade de plastomas completos em comparação com genomas nucleares de algas.

Em seguida, foram aplicados critérios de filtragem baseados em abundância e distribuição das ASVs:

- Para ASVs sem classificação em nível de Filo (*Phylum* = NA): remoção se presentes em 5 ou menos amostras e com abundância média bruta por amostra menor que 10%;

- Para ASVs com classificação válida em nível de Filo: remoção se presentes em 2 ou menos amostras E com abundância média bruta por amostra menor que 1%.

Estes critérios de filtragem permitiram a remoção da maior parte dos *singletons* e *doubletons*, reduzindo o ruído causado pelos zeros inseridos por estas ASVs raras. Após a filtragem, foram retidas 3.928 ASVs para o marcador 16S, 473 ASVs para o 18S e 1.863 ASVs para o ITS.

3.5.5 Normalização e transformação dos dados

Cada conjunto de dados dos diferentes marcadores passou por três processos de normalização/transformação, cada um específico para diferentes tipos de análises:

- Rarefação: normalização por subamostragem implementada através do pacote *vegan* (OKSANEN et al., 2020) para análises que requerem estritamente dados rarefados: para análises de diversidade filogenética (Faith's *Phylogenetic Diversity*), cálculos de riqueza observada (ASVs observadas), curvas de rarefação, métricas de beta-diversidade baseadas em presença/ausência (Jaccard e UniFrac não-ponderado) e estimadores de riqueza (Chao2, Jackknife2 e *Bootstrap*). O ponto de corte foi estabelecido considerando o menor número de sequências entre todas as amostras para cada marcador, permitindo assim a manutenção de todas as amostras nas análises subsequentes (Fig. 10);

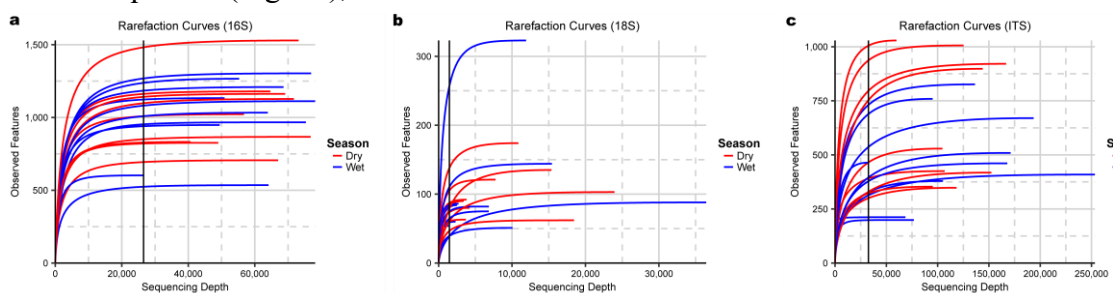


Figura 10: Curvas de rarefação para (a) 16S, (b) 18S e (c) ITS. Linha vertical preta sinaliza ponto de corte da rarefação.

- Normalização por CSS (*Cumulative Sum Scaling*): aplicada através do pacote *metagenomeSeq* (Paulson et al., 2013) para análises que necessitam considerar a composicionalidade dos dados, mantendo as relações proporcionais entre os táxons: índices de diversidade alfa (Shannon e Simpson), análise discriminante linear de tamanho do efeito (LEfSe), métricas de beta-diversidade baseadas em abundância (Bray-Curtis e UniFrac ponderado) e análises de composição taxonômica (abundância relativa);

- Transformação CZM (*Count Zero Multiplicative*) seguida de CLR (*Centered Log-Ratio*): implementadas através dos pacotes *zCompositions* e *compositions* (Palarea-Albaladejo & Martín-Fernández, 2015; Van Den Boogaart & Tolosana-Delgado, 2008), onde o CZM foi utilizado para tratamento dos zeros e a transformação CLR para eliminar a composicionalidade dos dados, permitindo análises que assumem independência entre as variáveis: análises de coocorrência e correlação entre grupos taxonômicos, visualização da distribuição de abundância diferencial entre grupos, análises pareadas entre táxons específicos e matrizes de correlação e redes de interação.

3.5.6 Análises estatísticas e visualização dos dados

Análises de diversidade e ecologia de comunidades foram conduzidas utilizando *phyloseq* e *picante* (Kembel et al., 2010; McMurdie & Holmes, 2013) para diversidade filogenética; *vegan* (Oksanen et al., 2001) para análises de diversidade alfa e beta, ordenações e análises multivariadas; *GUniFrac* (Jun Chen, Xianyang Zhang, Lu Yang, Lujun Zhang, 2012) para cálculo de distâncias e *indicspecies* (De Cáceres et al., 2011) para identificação de espécies indicadoras. Análises estatísticas específicas incluíram o uso de *lefser* (Segata et al., 2011) e *SummarizedExperiment* (Martin Morgan, 2017) para análises diferenciais entre grupos; *randomForest* e *caret* (Breiman et al., 2002; Kuhn, 2007) para análises de aprendizado de máquina; e *effsize* e *rstatix* (Kassambara, 2019; Torchiano, 2013) para cálculos de tamanho de efeito e testes estatísticos. As análises filogenéticas foram realizadas com o pacote *ape* (Paradis et al., 2002).

Para visualização dos dados, foram utilizados *ggplot2*, *ggpubr* e *ggnewscale* (Campitelli, 2019; Kassambara, 2016; Wickham et al., 2007) para criação de gráficos complexos; *network*, *sna* e *ggnetwork* (Briatte, 2016; Butts, 2001, 2005) para análises e visualização de redes de co-ocorrência, e *corrplot* (Wei & Simko, 2010) para visualização de correlações. A manipulação e organização dos dados foi realizada principalmente através dos pacotes do *tidyverse* (como *reshape2*, *dplyr* e *tidyr*). Todas as análises foram integradas para fornecer uma visão abrangente das comunidades microbianas estudadas, incluindo suas diversidades, composições, relações de coocorrência e relações com variáveis ambientais.

3.5.7 Padronização da nomenclatura taxonômica

Para facilitar a interpretação e apresentação dos resultados, algumas classificações taxonômicas foram padronizadas após as análises adicionais de classificação. No caso do marcador 18S, as algas inicialmente classificadas como classe *Klebsormidiophyceae* e ordem

Klebsormidiales foram reclassificadas como "Charophyta*", após análises complementares com o marcador 16S revelarem uma maior diversidade de algas estreptófitas. Devido a esta limitação na resolução taxonômica do 18S para algas carófitas, os dados quantitativos (abundância) foram analisados através do marcador 18S, enquanto os dados qualitativos (classificação taxonômica detalhada) foram derivados das análises com o marcador 16S. A validação desta abordagem é suportada pela análise comparativa entre os marcadores, onde observamos correlações significativas na detecção dos principais filos de algas (Charophyta, Chlorophyta e Ochrophyta) entre 16S e 18S (Fig. 11), confirmando que ambos os marcadores capturam dados similares de abundância destes grupos. Para o marcador 16S, as cianobactérias, que se mostraram presentes apenas na classe Cyanophyceae, foram renomeadas para "Cyanobacteria*" para simplificar a interpretação. Adicionalmente, algas da classe Trebouxiophyceae pertencentes às famílias Coccomyxaceae e Leptosiraceae, que não possuem ordem definida, foram renomeadas da seguinte forma: "TIS (Trebouxiophyceae *Incertae Sedis*) Fam. Coccomyxaceae" ou "TIS Fam. Leptosiraceae", respectivamente.

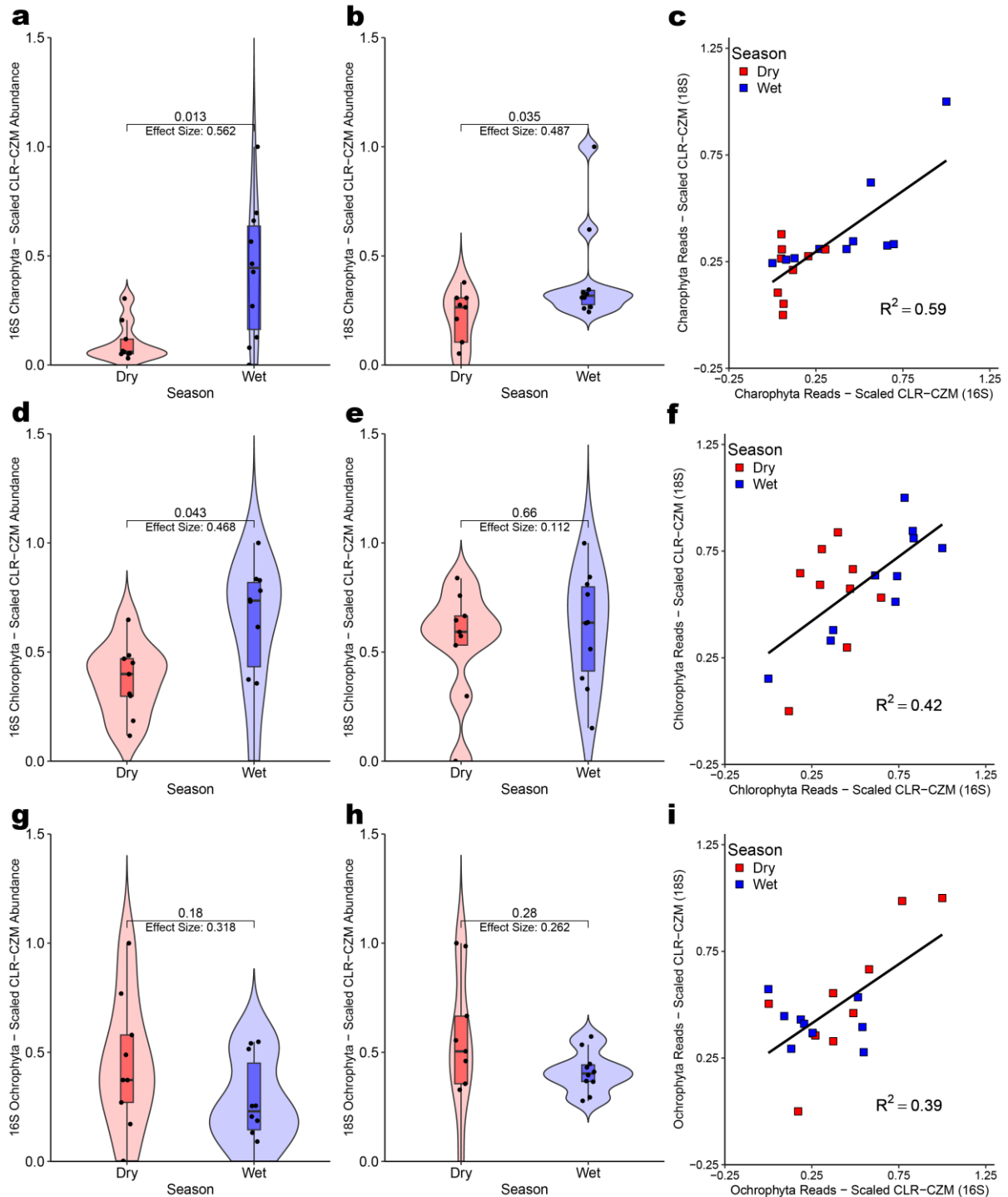


Figura 11: Comparação da abundância de diferentes filamentos de algas entre os marcadores 16S e 18S. (a-b) Abundância do filo Charophyta detectada pelos marcadores 16S e 18S, respectivamente. **(d-e)** Abundância do filo Chlorophyta detectada pelos marcadores 16S e 18S, respectivamente. **(g-h)** Abundância do filo Ochrophyta detectada pelos marcadores 16S e 18S, respectivamente. **(c,f,i)** Correlações entre as detecções dos dois marcadores para cada filo, demonstrando a consistência do sinal obtido com diferentes marcadores moleculares. Dados foram normalizados usando transformação CZM-CLR e escalonados de 0 a 1. Diferenças entre estações foram testadas usando teste de Wilcoxon *rank-sum*, com valores de *p* e tamanho do efeito mostrados acima das comparações.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das comunidades microbianas nas crostas fotossintéticas de solo confirmou nossa hipótese inicial de variação sazonal, revelando dinâmicas complexas de organização e interação que oferecem evidências únicas sobre a evolução da vida no meio terrestre.

4.1 Eficiência do protocolo de extração e qualidade do DNA metagenômico

Das 30 amostras inicialmente coletadas, 21 apresentaram quantidade suficiente de material edáfico ($\geq 250\text{mg}$) para extração de DNA. A presença inicial de inibição da PCR e bandas de arrasto na eletroforese sugeriu a coextração de ácidos orgânicos, um desafio que persistiu mesmo com o uso do kit MO BIO PowerSoil, especificamente desenvolvido para lidar com inibidores de técnicas de biologia molecular em amostras de solo. Durante a temporada seca, estes compostos sejam predominantemente exopolissacarídeos e outros polímeros extracelulares, sintetizados por líquens e cianobactérias como componentes de seu sistema constitutivo de proteção contra dessecação (Gasulla et al., 2021), que inclui também um complexo sistema antioxidante (Beckett et al., 2005). Este mecanismo molecular complexo compreende, além dos polissacarídeos já mencionados, concentrações elevadas de polióis, um sistema antioxidante robusto. Ademais, a presença do ácido abscísico (ABA), fitormônio produzido em quantidades expressivas por fungos e secretado no meio extracelular, potencialmente contribui para o conjunto de compostos interferentes (Hartung, 2010).

Na temporada úmida, a intensificação da atividade metabólica das algas verdes e bactérias associadas resulta em maior produção de ácidos húmicos e outros compostos orgânicos derivados da decomposição de biomassa (Grinhut et al., 2007). Este processo é mediado principalmente por fungos saprofitos, notadamente ascomicetos e basidiomicetos, que empregam um conjunto de enzimas oxidativas não específicas para a degradação e mineralização da matéria orgânica recalcitrante, além de participarem ativamente na modificação e polimerização das substâncias húmicas resultantes (Grinhut et al., 2007; Kögel-Knabner et al., 1988). A complexidade química destas substâncias húmicas, particularmente suas propriedades quelantes e capacidade de interação com ácidos nucleicos, representa um desafio significativo para técnicas de biologia molecular, frequentemente manifestando-se como os inibidores da PCR mencionados e interferentes na qualidade da eletroforese.

A necessidade de otimização do protocolo através da adição de DMSO, mesmo após o uso de um kit específico para solos, demonstra o desafio particular apresentado por estas amostras, possivelmente devido à complexidade e abundância dos compostos de proteção produzidos por estas comunidades microbianas especializadas.

A quantificação por fluorometria revelou variação significativa nas concentrações de DNA entre as amostras, com valores entre 130 e 390 ng/mL. Duas amostras apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção ($< 0,50$ ng/mL) e foram excluídas das análises subsequentes. O conjunto final de 19 amostras apresentou qualidade e quantidade adequadas de DNA para as análises metataxonômicas propostas.

4.2 Composição e diversidade das comunidades microbianas

Como os grupos raros não constituem o foco principal deste estudo, as análises de composição e diversidade das comunidades microbianas foram realizadas considerando um limiar mínimo de 1% de abundância relativa média por amostra. As classes taxonômicas que apresentaram uma abundância relativa média inferior a este limiar foram agrupadas na categoria "*Other/NA*", a fim de facilitar a visualização e a interpretação dos dados.

4.2.1 Composição bacteriana observada – 16S

A análise da abundância relativa de diferentes classes bacterianas (Fig. 12a) revelou observações consistentes na distribuição de grupos taxonômicos principais entre as temporadas seca e úmida. Cyanobacteria*, componente fundamental das CFS, apresentou presença consistente em todas as amostras, com um discreto aumento na abundância relativa durante a temporada seca, particularmente representada pela ordem Nostocales, conhecida por sua capacidade de formar associações líquênicas e se adaptar melhor ao estresse hídrico.

Alphaproteobacteria, Planctomycetacia e Actinobacteria demonstraram proporções similares em todas as amostras, independente da sazonalidade. Alphaproteobacteria, uma das classes mais abundantes, destaca-se por sua versatilidade metabólica (Degli Esposti et al., 2019), com membros que desempenham papéis cruciais em diversos processos biogeoquímicos, incluindo fixação de nitrogênio e degradação de compostos orgânicos complexos (Imam et al., 2015; Yousuf et al., 2014).

A classe Planctomycetacia tem sido cada vez mais reconhecida como componente central da microbiota edáfica (Vitorino et al., 2021; Wagner & Horn, 2006). Seus representantes são conhecidos por sua capacidade de degradar polissacarídeos complexos como polímeros vegetais, quitina e exopolissacarídeos microbianos, destacando seu papel ecológico na decomposição de matéria orgânica em ambientes de solo (Kaboré et al., 2020; Köhler et al., 2008).

Actinobacteria é uma outra classe de presença consistente e que desempenha um papel essencial na decomposição da matéria orgânica e na estruturação do solo, independentemente das variações ambientais. Em solos inundados, sua composição comunitária varia de acordo

com a umidade e o teor de matéria orgânica, evidenciando sua adaptação a condições de acidez e flutuações de oxigênio (Kopecky et al., 2011). Em locais áridos, as actinobactérias também se destacam como um dos principais componentes da microbiota, mostrando resiliência às condições extremas e contribuindo significativamente para a ciclagem de nutrientes e a estabilidade do solo (Skariah et al., 2023). Essa versatilidade reflete sua capacidade de sustentar processos biológicos cruciais, como a decomposição de compostos complexos e a promoção da saúde do solo em diferentes ecossistemas (Bhatti et al., 2017). A estabilidade na abundância relativa dessas classes entre as temporadas sugere que estes grupos bacterianos constituam membros *core* da comunidade microbiana dos solos estudados, possivelmente devido à sua capacidade de adaptação e funções ecológicas essenciais no ecossistema.

Em contraste, outras classes exibiram flutuações notáveis em sua abundância relativa. Bacteroidia e Chloroflexia apresentaram maior predominância durante a temporada seca. Bacteroidia, particularmente representada pela ordem Cytophagales, apresentou maior predominância durante a temporada seca. Este grupo se destaca por possuir sistemas especializados de degradação de carboidratos complexos, organizados em *Loci* de Utilização de Polissacarídeos (PULs). Os PULs permitem a produção regulada de enzimas específicas (CAZymes) apenas quando seus substratos estão disponíveis no ambiente, representando uma estratégia energeticamente eficiente (Larsbrink & McKee, 2020). Além disso, possuem um sistema de secreção específico (T9SS) que, combinado com sua capacidade de motilidade por deslizamento, permite uma busca ativa por nutrientes. Estas características podem explicar sua maior abundância no período seco, onde a eficiência na utilização de recursos e a capacidade de acessar substratos complexos se tornam vantagens adaptativas importantes (Xie et al., 2007).

De forma similar, os resultados indicam que membros da classe Chloroflexia esteja mais presente na temporada seca. Este grupo é conhecido por sua notável diversidade metabólica, incluindo membros capazes de realizar fotossíntese anoxigênica, quimioheterotrofia e a degradação de compostos aromáticos (Fincker et al., 2020; Klatt et al., 2013). Na temporada seca, sua maior abundância pode estar relacionada à capacidade de utilizar múltiplas fontes de energia e carbono, incluindo compostos mais resistentes à decomposição (Kawai et al., 2021). Além disso, muitos membros deste grupo apresentam adaptações a condições de estresse, como a produção de pigmentos fotoprotetores e mecanismos eficientes de reparo de DNA, características que podem conferir vantagens em condições de maior exposição à radiação solar e menor disponibilidade hídrica (Bohnert & Sheveleva, 1998).

Em contraste marcante, a classe Ktedonobacteria, do mesmo filo da classe Chloroflexia (Chloroflexota), apresentou forte associação com a temporada chuvosa. Esta composição diferencial é particularmente interessante, pois Ktedonobacteria, um grupo filogenético descoberto relativamente recentemente, é conhecido por sua capacidade de produzir esporos e degradar diversos compostos orgânicos (Rachmania et al., 2022). Sua predominância em condições úmidas sugere uma possível adaptação a ambientes com maior disponibilidade de água e, potencialmente, maior atividade na decomposição de matéria orgânica sob estas condições (Yabe et al., 2017). Além disso, membros da classe Ktedonobacteria foram observados como abundantemente exclusivos em solos não arados, indicando uma preferência por habitats menos perturbados e com altos níveis de matéria orgânica e umidade (Gangwar et al., 2024).

Estas variações sazonais na estrutura da comunidade microbiana sugerem uma dinâmica complexa de nichos ecológicos, onde diferentes grupos bacterianos podem assumir papéis funcionais predominantes de acordo com as condições ambientais vigentes, complementando assim a estabilidade observada nos grupos *core*.

4.2.2 Composição não-fúngica eucariótica observada – 18S

A análise da composição eucariótica através do sequenciamento do 18S rRNA (Fig. 12b) revelou uma comunidade diversa, com predominância de algas verdes clorófitas representadas principalmente pelas classes Trebouxiophyceae, Chlorophyceae e Ulvophyceae. Trebouxiophyceae, em particular, demonstrou abundância expressiva em ambas as temporadas, uma observação consistente com seu papel descrito na formação de líquens e adaptação a ambientes terrestres (Muggia et al., 2018).

A comunidade também apresentou uma notável diversidade de protozoários, incluindo membros das classes Colpodea, Tubulinea e diversos representantes do grupo Cercozoa (Sarcomonadea, Cercomonadidae, Cercozoa IS). Estes organismos desempenham papéis cruciais como predadores microbianos, potencialmente regulando a estrutura e dinâmica das comunidades bacterianas (Degrune et al., 2019; Flues et al., 2018). A presença de micrometazoários, evidenciada pela detecção de Arachnida e Clitellata, sugere uma complexa rede trófica que inclui organismos envolvidos na bioturbação e estruturação física do solo.

Em termos de variação sazonal, Charophyta* foi o único grupo que apresentou uma associação clara com a temporada chuvosa, sugerindo uma possível preferência por condições de maior disponibilidade hídrica, fator que será explorado nos tópicos subsequentes.

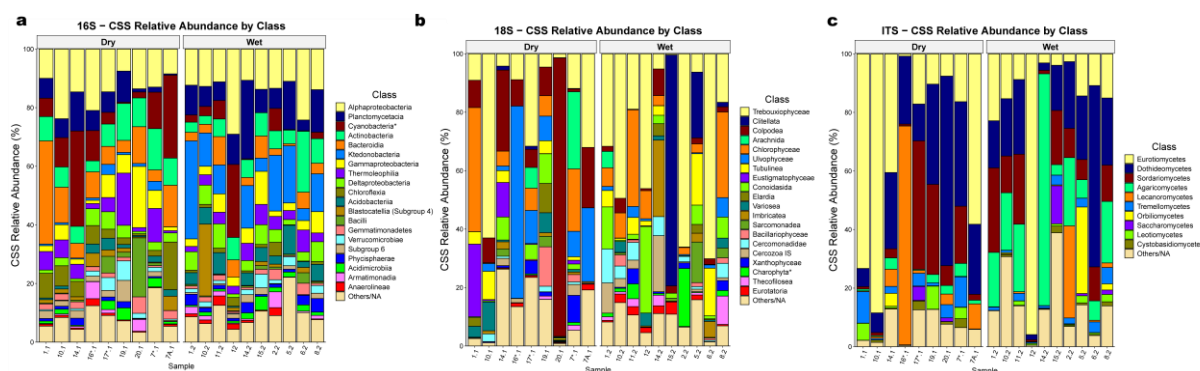


Figura 12: Análise da composição e diversidade das comunidades microbianas nas estações seca (Dry) e chuvosa (Wet). Abundância relativa por classe taxonômica para os marcadores (a) 16S, (b) 18S e (c) ITS.

4.2.3 Composição fúngica eucariótica observada – ITS

A análise da comunidade fúngica através do sequenciamento da região ITS (Fig. 12c) revelou uma predominância das classes Eurotiomycetes, Dothideomycetes e Sordariomycetes, membros do filo Ascomycota. A presença expressiva de Lecanoromycetes, classe que inclui a maioria dos fungos líquênicos, corrobora os dados anteriores sobre a importância das associações líquênicas nas amostras estudadas, principalmente na temporada seca (Miadlikowska et al., 2014).

Representantes do filo Basidiomycota também foram detectados, principalmente através das classes Agaricomycetes e Tremellomycetes, embora em menor abundância relativa. Destaca-se na classe Tremellomycetes a abundância significativa de *Saitozyma podzolica*, espécie frequentemente reportada em estudos de solos brasileiros (especificamente no estado de Minas Gerais) (Moreira et al., 2020; Moreira & Vale, 2018, 2020). A estrutura da comunidade fúngica se manteve relativamente estável entre as temporadas, sem variações sazonais marcantes na abundância relativa das principais classes.

4.3 Avaliação da cobertura de sequenciamento e índices de diversidade

As curvas de rarefação foram geradas após a filtragem taxonômica específica para cada marcador molecular (16S rRNA, 18S rRNA e ITS), utilizando apenas as sequências relevantes para cada conjunto de dados conforme descrito na seção de métodos (3.5.4) (Fig. 10). A análise das curvas demonstrou que a profundidade de sequenciamento foi adequada para capturar a diversidade microbiana presente, com todas as amostras apresentando tendência à estabilização. A consistência na qualidade dos dados entre as amostras, com cobertura satisfatória em pelo menos dois marcadores, permitiu a manutenção de todas as amostras nas análises subsequentes.

Esta robustez amostral é corroborada pelos índices de diversidade (Fig. 13), que se mantiveram majoritariamente consistentes entre as temporadas. A diversidade filogenética

(Faith's PD) apresentou diferença significativa apenas para o marcador ITS ($p = 0.0076$), enquanto os marcadores 16S e 18S não apresentaram variação significativa entre as temporadas ($p = 0.13$ e $p = 0.6$, respectivamente). O índice de Shannon demonstrou estabilidade entre as temporadas para todos os marcadores (16S: $p = 0.9$; 18S: $p = 0.84$; ITS: $p = 0.78$), padrão similar ao observado para o índice de Simpson (16S: $p = 0.66$; 18S: $p = 0.97$; ITS: $p = 0.55$). A estimativa de cobertura de amostragem (Good's coverage), que indica a probabilidade de que uma nova sequência amostrada represente uma ASV já observada, apresentou diferença significativa entre as temporadas para os marcadores 16S e 18S ($p = 0.0057$ e $p = 0.022$, respectivamente), mas não para o ITS ($p = 0.053$). O número de ASVs observadas variou entre os marcadores, com o 16S apresentando um total de 10.576 ASVs (média geométrica: 1007.47 seca, 935.95 úmida, $p = 0.32$), o 18S com 924 ASVs (média geométrica: 88.82 seca, 65.55 úmida, $p = 0.16$), e o ITS com 5.661 ASVs (média geométrica: 361.84 seca, 548.72 úmida, $p = 0.035$), com estimadores de riqueza (Chao2, Jackknife2 e Bootstrap) indicando valores totais esperados entre 13.401-26.727 para 16S, 1.180-2.608 para 18S e 7.124-17.151 para ITS.

Estes resultados revelam aspectos interessantes sobre a estrutura e dinâmica das comunidades microbianas estudadas. A estabilidade dos índices de Shannon e Simpson através das temporadas sugere que, embora a composição taxonômica possa variar, a distribuição de abundância relativa e a equitabilidade das comunidades se mantêm relativamente constantes. A maior diversidade filogenética do ITS na estação úmida indica uma maior variabilidade evolutiva entre as espécies fúngicas neste período, possivelmente refletindo condições mais favoráveis para a coexistência de diferentes linhagens. As diferenças significativas na cobertura de amostragem para 16S e 18S entre as temporadas sugerem uma maior complexidade e diversidade não detectada na comunidade durante a estação seca, particularmente para procariotos e micro-eucariotos não-fúngicos. A variação no número de ASVs entre os marcadores reflete tanto diferenças metodológicas inerentes a cada marcador quanto características biológicas dos grupos taxonômicos: a maior riqueza observada no 16S é consistente com a conhecida diversidade bacteriana em solos, enquanto os números mais baixos para 18S refletem a menor diversidade natural de eucariotos microscópicos. O ITS apresenta valores intermediários, mas com uma tendência significativa de maior riqueza na estação úmida, sugerindo que as condições de maior umidade podem favorecer a diversificação fúngica.

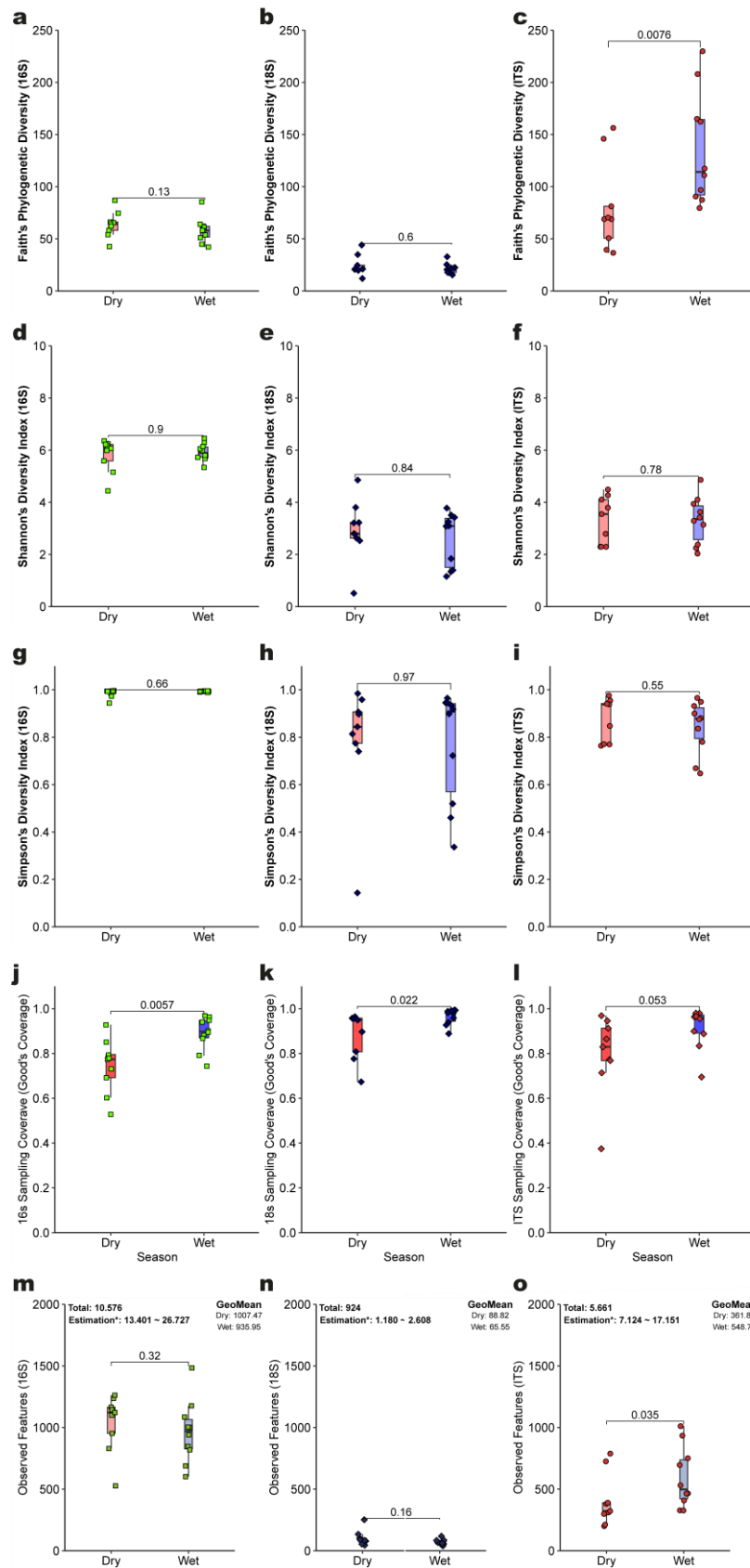


Figura 13: Análises de diversidade alfa das comunidades microbianas nas estações seca (Dry) e chuvosa (Wet) para os três marcadores moleculares (16S, 18S e ITS). (a-c) Diversidade filogenética (Faith's PD); (d-f) Índice de diversidade de Shannon; (g-i) Índice de diversidade de Simpson; (j-l) Cobertura de amostragem de Good; (m-o) Número de ASVs observadas. Valores acima das barras indicam os valores de p obtidos pelo teste de Wilcoxon. Para os gráficos de ASVs observadas (m-o),

são apresentados também o número total de ASVs, estimativas de riqueza total (Estimation*) e médias geométricas (GeoMean) para cada estação. As caixas representam os quartis Q1-Q3, a linha horizontal indica a mediana, e os pontos mostram os valores individuais das amostras.

4.4 Distribuição sazonal dos organismos fotossintetizantes

A análise da distribuição sazonal dos organismos fotossintéticos foi realizada utilizando diferentes abordagens estatísticas e normalizações de dados (Fig. 14). A abundância relativa dos diferentes grupos foi inicialmente avaliada através de *boxplots* utilizando dados transformados por CLR com média centrada em zero (CZM-CLR) para remover o viés composicional (Fig. 14a). Os taxa estão organizados por abundância decrescente dentro de cada marcador molecular, com valores de p ajustados por FDR (*False Discovery Rate*). Entre os grupos procarióticos, a ordem Nostocales apresentou abundância significativamente maior durante a estação seca ($p = 0.020$). Entre os organismos eucarióticos, Eustigmatales, embora à margem da significância estatística ($p = 0.066$), demonstrou um efeito considerável (*Effect size* = 0.42) em sua associação com a temporada seca. Na temporada chuvosa, observou-se um aumento significativo na abundância de três grupos de algas verdes eucarióticas: Charophyta* ($p = 0.037$), Prasiolales ($p = 0.013$) e membros da família Coccomyxaceae ($p = 0.020$).

A análise discriminante linear de tamanho do efeito (LEfSe), realizada com dados normalizados por CSS, corroborou estas observações de distribuição sazonal (Fig. 14b). Esta análise complementar, que requer dados composicionais, não apenas confirmou a significância de Nostocales e Eustigmatales como indicadores da estação seca, mas também revelou *scores* discriminantes robustos, indicando uma forte associação destes grupos com condições mais áridas. Por outro lado, a estação chuvosa apresentou maior abundância de três grupos de algas verdes: Charophyta* (representada por gêneros como *Roya*, *Klebsormidium*, *Cosmarium*, *Closterium* e *Netrium*), Prasiolales (incluindo *Elliptochloris*) e membros da família Coccomyxaceae (*Coccomyxa* e *Paradoxia*).

A utilização de diferentes normalizações (CZM-CLR e CSS) foi especialmente importante para validar estas dinâmicas sazonais. Enquanto a transformação CZM-CLR permite uma comparação direta das abundâncias removendo o viés composicional, a normalização CSS mantém características composicionais necessárias para a análise LEfSe, oferecendo assim perspectivas complementares dos mesmos dados. A consistência dos resultados observados através destas diferentes abordagens metodológicas reforça a robustez das associações sazonais identificadas.

Os resultados observados revelam uma mudança substancial na estrutura da comunidade fotossintética entre as temporadas. A estação seca apresenta maior abundância de cianobactérias

(representadas por Nostocales) e algas marrons (representadas por Eustigmatales), enquanto na estação chuvosa observa-se maior abundância de algas verdes eucarióticas (Charophyta*, Prasiolales e Coccomyxaceae). Esta alternância sazonal entre grupos fotossintéticos procarióticos/algas marrons e algas verdes eucarióticas sugere diferentes estratégias de adaptação às condições ambientais e possivelmente reflete distintas contribuições funcionais para a dinâmica das CFS em cada período.

Ecologicamente, estas dinâmicas sugerem adaptações específicas dos diferentes grupos às condições sazonais. A maior abundância de Nostocales na estação seca pode estar relacionada à sua capacidade de formar bainhas mucilaginosas e heterocistos, estruturas que conferem proteção contra dessecação e permitem fixação de nitrogênio, respectivamente (Kumar et al., 2010). Esta última característica é particularmente relevante em ambientes áridos, onde o nitrogênio é o segundo recurso mais limitante após a água (Giraldo-Silva et al., 2020). A ordem Nostocales nas CFS coletadas é representada por gêneros como *Nostoc*, *Scytonema* e *Calothrix*, que apresentam diferentes níveis de tolerância térmica e capacidade de fixação de nitrogênio. *Scytonema*, por exemplo, demonstra maior termotolerância, enquanto *Nostoc* apresenta melhor desempenho em temperaturas intermediárias (Couradeau et al., 2019). Esta partição de nichos térmicos, que afeta diretamente a capacidade de desenvolvimento de heterocistos e, conseqüentemente, a fixação de nitrogênio, pode explicar a distribuição observada durante a estação seca.

Similarmente, a associação de Eustigmatales com condições mais secas pode refletir adaptações como a produção de carotenóides e lipídeos, que auxiliam na proteção contra estresse oxidativo e dessecação. Em contraste, a maior abundância de algas verdes (Charophyta*, Prasiolales e Coccomyxaceae) durante a estação úmida sugere adaptações específicas a condições de maior disponibilidade hídrica.

Corroborando os resultados anteriores de diversidade alfa (Fig. 13), que não demonstraram variações significativas entre as temporadas, as análises da comunidade fotossintética indicam que as mudanças sazonais se manifestam principalmente através de alterações na estrutura da comunidade, e não em sua diversidade. Esta observação sugere um sistema resiliente onde diferentes grupos fotossintéticos podem assumir papéis funcionais similares sob diferentes condições ambientais.

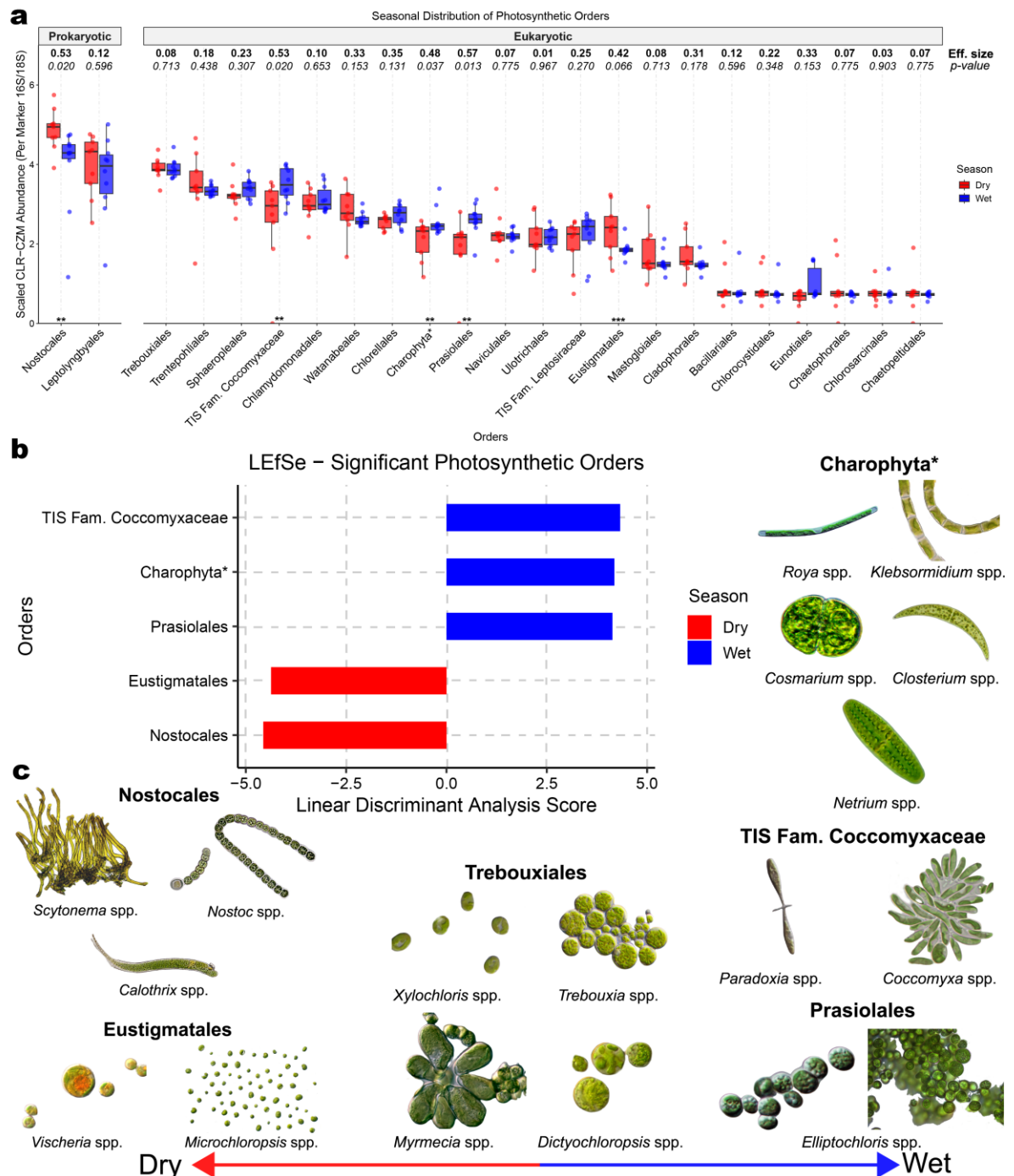


Figura 14: Distribuição sazonal dos organismos fotossintetizantes. (a) Abundância relativa das ordens fotossintéticas usando dados CZM-CLR transformados, organizados por abundância decrescente dentro de cada marcador molecular. Valores acima indicam *effect size* e *p-value* (FDR-ajustado). Significância estatística é indicada por asteriscos duplos: ** $p < 0.05$. Os três asteriscos (***) indicam que Eustigmatales, embora à margem da significância estatística ($p = 0.066$), apresenta resultado significativo na análise LEfSe. (b) Análise discriminante linear de tamanho do efeito (LEfSe) mostrando as ordens com diferenças significativas entre as temporadas, usando dados normalizados por CSS. Barras vermelhas indicam associação com a temporada seca e barras azuis com a temporada úmida. (c) Representação ilustrativa dos principais gêneros encontrados em cada ordem significativa, organizados ao longo de um gradiente sazonal. Embora Ordens de organismos que podem conter espécies fotossintetizantes, como Chloroflexales, tenham sido detectadas, a análise de seus níveis taxonômicos inferiores sugere que os organismos presentes destes grupos não sejam fotossintetizantes.

4.5 Relações de coocorrência e interações microbianas

4.5.1 Estrutura das Redes de Interação

A análise de redes e de matrizes de coocorrência revelou relações complexas de interações entre diferentes grupos taxonômicos nas CFS. As matrizes de coocorrência por componente principal (FPC) (Fig. 15a) e por clusterização (Fig. 15b) mostram associações significativas tanto positivas quanto negativas entre as ordens microbianas, com valores variando de -0,82 a 0,88.

Uma das interações mais proeminentes é a entre Nostocales e Peltigerales (0,84), sugerindo uma forte associação simbiótica característica de líquens (Magain et al., 2018; Yang et al., 1993). Este módulo líquênico também apresentou correlações positivas significativas com Cytophagales, Chloroflexales e Sphingomonadales, indicando uma potencial rede de interações microbianas adaptada às condições mais áridas. Cytophagales, conhecida por sua capacidade de degradar polímeros complexos através de seu sistema secretório especializado (T9SS) (Xie et al., 2007), poderia facilitar a disponibilidade de nutrientes para o consórcio líquênico. Chloroflexales, com sua versatilidade metabólica, pode contribuir para a ciclagem de carbono nestes microhabitats (Fincker et al., 2020), enquanto Sphingomonadales, frequentemente associada à produção de exopolissacarídeos e tolerância ao estresse, poderia auxiliar na retenção de água e proteção contra dessecação (Ashtaputre & Shah, 1995; Le Gall et al., 2021; Li et al., 2017; Meneghini et al., 2017).

Em contraste, na porção inferior da matriz (Fig. 15a), observou-se correlações positivas centrado nos grupos de algas verdes eucarióticas. Charophyta* demonstrou fortes correlações positivas com a família Coccomyxaceae (0,77) e Sphaeropleales (0,68), acompanhadas por associações significativas com grupos bacterianos específicos, particularmente Ktedonobacterales (0,71), Frankiales (0,67) e Isosphaerales (0,77). Este conjunto de coocorrências sugere uma rede de interações característica da temporada úmida. Ktedonobacterales, um grupo filamentoso conhecido por sua capacidade de degradar compostos recalcitrantes e produzir uma variedade de enzimas hidrolíticas (Rachmania et al., 2022), poderia facilitar a disponibilidade de nutrientes para as algas verdes. Frankiales, que inclui actinobactérias fixadoras de nitrogênio, poderia estabelecer uma relação mutualística fornecendo nitrogênio fixado às algas em troca de carbono fotossintetizado (DeAngelis & Pold, 2020; Normand & Fernandez, 2008; Sellstedt & Richau, 2013), além de potencialmente contribuir para a estruturação do solo através de seu crescimento filamentoso. Isosphaerales, membros do filo Planctomycetes, é uma ordem conhecida por sua capacidade de degradar polissacarídeos complexos e participar ativamente nos ciclos do carbono e nitrogênio,

possivelmente auxiliando na disponibilização de nutrientes e contribuindo para a estabilidade do consórcio microbiano durante a temporada úmida (Kulichevskaya et al., 2017; J. Wang et al., 2002; Ward et al., 2006).

Mesmo sendo mais autônomas que seus ancestrais, estas algas mantêm interações específicas com grupos bacterianos que facilitam processos fundamentais como aquisição de nutrientes e estruturação do solo. Estas interações demonstram que mesmo linhagens derivadas de Streptophyta com adaptações moleculares avançadas ainda se beneficiam de associações microbianas funcionalmente direcionadas. Esta observação sugere que a capacidade de estabelecer relações específicas com microrganismos do solo pode ter sido um aspecto importante ao longo da evolução das linhagens verdes terrestres.

Notavelmente, as matrizes de coocorrências revelam uma forte relação de exclusão mútua entre as bactérias associadas aos diferentes períodos sazonais (Fig. 15a,b; Fig. 16e,f). As bactérias "acessórias" que apresentam correlações positivas com o módulo liquênico na estação seca (Cytophagales, Chloroflexales e Sphingomonadales) demonstram fortes correlações negativas (variando de -0,68 a -0,79) com o conjunto bacteriano associado às algas verdes na estação úmida (Ktedonobacterales, Frankiales e Isosphaerales), indicando uma substituição de comunidade sazonal.

4.5.2 Dinâmica de Substituição Sazonal

Esta dinâmica de substituição sazonal é especialmente evidente na visualização das redes de correlação sob diferentes limiares de corte (Fig. 15c,d), revelando duas estruturas comunitárias contrastantes, ambas organizadas ao redor de produtores primários distintos. A comunidade da estação úmida (destacada em azul) apresenta uma organização relativamente mais simples, centrada principalmente em Charophyta* e outras algas verdes eucarióticas, com um número limitado de associações bacterianas. A dominância de organismos eucarióticos fotossintetizantes neste período pode ser explicada por sua capacidade de monopolizar recursos luminosos devido ao seu maior tamanho celular e maquinaria fotossintética mais eficiente em comparação com cianobactérias, especialmente quando as condições hídricas são favoráveis.

Em contraste, a comunidade da estação seca (destacada em vermelho) exibe uma estrutura notavelmente mais complexa e interconectada, organizada ao redor do módulo central Nostocales-Peltigerales. Este núcleo liquênico atua como um *hub* de interações, estabelecendo múltiplas conexões com táxons bacterianos acessórios como Cytophagales, Chloroflexales e Sphingomonadales, sugerindo uma rede de interações microbianas mais intrincada e possivelmente mais resiliente às condições de estresse hídrico. Esta diferença na complexidade

das redes entre as duas estações pode refletir distintas estratégias de sobrevivência: enquanto a comunidade úmida é dominada por organismos eucarióticos fotossintetizantes que competem diretamente por luz e podem eficientemente converter energia luminosa em biomassa quando água não é um fator limitante, a comunidade seca depende de interações mais elaboradas e benefícios mútuos para persistir sob condições adversas, com as cianobactérias do módulo liquênico atuando como um dos produtores primários centrais em uma rede complexa de interações que promove a resistência coletiva ao estresse (Gasulla et al., 2021; Grube et al., 2015; Kranner et al., 2005).

Notavelmente, enquanto fungos desempenham um papel central na rede de interações da estação seca através de associações liquênicas, suas interações não emergem como significativas na rede da estação úmida, apesar da sua presença nestas comunidades. Esta alternância sazonal na significância das interações fúngicas pode refletir diferentes estratégias de alocação de recursos entre os períodos: na estação seca, os fungos contribuem significativamente para a resistência ao estresse hídrico através de associações liquênicas (Beckett et al., 2005; Hartung, 2010; Hell et al., 2019; Yang et al., 1993), enquanto na estação úmida, quando as condições são mais favoráveis, as algas verdes eucarióticas estabelecem populações mais autônomas. Durante a estação úmida, estas algas necessitam apenas de relações específicas e funcionalmente direcionadas, como observado em sua associação com Frankiales para fixação de nitrogênio, ao invés das extensivas redes de suporte físico e metabólico características das associações liquênicas observadas na estação seca.

4.5.3 Implicações Evolutivas - Parte I: Autonomia e Dependência Microbiana

As diferentes estratégias observadas nas CFS modernas – relativa autonomia funcional na estação úmida versus redes complexas de interação na estação seca – possivelmente refletem diferentes estágios do processo de terrestrialização. A comunidade da estação úmida, dominada por algas verdes com adaptações moleculares avançadas, representa o resultado de milhões de anos de evolução, aquisição e perda de genes. Em contraste, a organização mais interdependente observada na estação seca, com sua rede elaborada de interações microbianas, pode representar uma estratégia mais similar àquela empregada pelas CFS ancestrais durante a colonização inicial do ambiente terrestre. Esta alternância sazonal entre diferentes estratégias de organização comunitária pode representar um análogo moderno das pressões seletivas e compromissos adaptativos enfrentados durante o processo de terrestrialização.

A independência observada das algas verdes eucarióticas em relação a comunidades microbianas acessórias é notória do ponto de vista evolutivo do grupo Streptophyta. Os

principais grupos encontrados (*Klebsormidium* e representantes da classe Zygnematophyceae) representam diferentes graus de derivação dentro do clado Streptophyta. *Klebsormidium*, um dos gêneros mais comuns de algas terrestres em ambientes tropicais (como documentado em crostas de solo de floresta estacional em São Paulo (Lemes-Da-Silva et al., 2010; Silva, 2009) e da zona de caatinga (Tralli, 2015)), representa uma linhagem mais basal, enquanto Zygnematophyceae, grupo irmão das plantas terrestres, apresenta diversas adaptações moleculares à vida terrestre, incluindo genes de resistência a estresses bióticos e abióticos, como *GRAS* e *PYR/PYL/RCAR*, que foram possivelmente adquiridos por transferência horizontal de bactérias do solo (Cheng et al., 2019; Nishiyama et al., 2018), além dos genes estruturais previamente citados relacionados à parede celular (Del-Bem, 2018; Mikkelsen et al., 2014, 2021). Esta característica pode explicar sua capacidade de estabelecer populações mais autônomas, sugerindo que a independência de comunidades microbianas complexas pode ser uma característica derivada.

É possível que o estudo de linhagens mais basais de Streptophyta revelasse dinâmicas diferentes, com maior dependência de comunidades microbianas acessórias. Antes da aquisição destes genes por transferência horizontal e do desenvolvimento de outras adaptações moleculares e fisiológicas, estas linhagens ancestrais provavelmente dependiam mais intensamente de interações com comunidades microbianas e de padrões estruturais para suportar sua sobrevivência no ambiente terrestre (Holzinger & Karsten, 2013). Esta transição de um estado de maior dependência de comunidades microbianas acessórias para uma maior autonomia pode representar um aspecto fundamental, porém pouco explorado, do processo de terrestrialização, refletindo a gradual aquisição de capacidades adaptativas que permitiram maior independência às linhagens mais derivadas de Streptophyta (de Vries & Archibald, 2018; Terlova et al., 2021).

No entanto, é notório que mesmo com todas essas adaptações que conferem autossuficiência quando água não é um fator limitante, estas algas não mantêm abundância significativa durante a temporada seca, mesmo em um ambiente apenas sazonalmente árido. Esta limitação pode ter representado uma pressão seletiva crucial sobre a CGA ancestral das embriófitas primordiais, possivelmente direcionando o desenvolvimento de estruturas multicelulares complexas, como estruturas precursoras de raízes, que permitiram explorar recursos hídricos em camadas mais profundas do solo (Elick et al., 1998; Hetherington & Dolan, 2018; Motte et al., 2020; Raven & Edwards, 2001). Esta limitação evidencia uma distinção fundamental entre duas estratégias evolutivas: *sobreviver* ao estresse versus *viver através dele* (Badyaev, 2005; Nevo, 2011). Esta variação nas estratégias sugere que adaptações

moleculares e formas quiescentes resistentes, embora importantes, não foram suficientes para uma conquista do ambiente terrestre independente da sazonalidade.

4.5.4 Implicações Evolutivas - Parte II: Padrões Temporais e Estratégias Adaptativas em Ambientes Sazonais

A distinção entre *sobreviver* ao estresse e viver *através* dele reflete não apenas diferentes estratégias adaptativas, mas também respostas a diferentes padrões temporais de variação ambiental (Wieczynski et al., 2018). A forma como o estresse ambiental se distribui temporalmente pode ser tão ou mais importante que sua intensidade total na determinação das trajetórias evolutivas.

Em ambientes sazonais, temos um padrão cíclico previsível descrito com períodos de autocorrelação positiva (durante cada estação) intercalados por transições graduais (Tsimring, 2014; Williams et al., 2017). A resposta adaptativa das Zygnematophyceae a este padrão é caracterizada pela formação de pré-acinetos - células vegetativas modificadas que, embora não verdadeiramente quiescentes, acumulam lipídios e compostos fenólicos no citoplasma, com vacúolos reduzidos (Holzinger & Pichrtová, 2016; Pichrtová, Arc, et al., 2016; Pichrtová, Hájek, et al., 2016). Esta transformação é favorecida pela progressão gradual da dessecação sazonal, que permite o endurecimento dessas células, um processo que seria impossível em condições de dessecação abrupta (Pichrtová, Kulichová, et al., 2014). Estas células mantêm a capacidade de recuperar rapidamente sua atividade fisiológica em condições favoráveis, embora as células vegetativas resultantes deste crescimento percam a tolerância ao estresse (Pichrtová, Hájek, et al., 2014). Além dos pré-acinetos, as Zygnematophyceae também produzem zigósporos através de conjugação sexual, estruturas altamente resistentes com paredes celulares complexas contendo polissacarídeos pécticos, hemicelulósicos e compostos aromáticos similares aos encontrados em esporos de briófitas (Permann et al., 2023). Embora raros em condições extremas (Pichrtová et al., 2018), os zigósporos representam características importantes para a sobrevivência e dispersão, como quiescência prolongada e proteção do embrião (Permann et al., 2021).

Em contraste, *Klebsormidium* apresenta uma estratégia mais direta: suas células vegetativas respondem à dessecação através do aumento drástico de calose nas paredes celulares transversais onduladas, permitindo um encolhimento e expansão regulados durante os ciclos de dessecação e reidratação (Donner et al., 2017; Karsten et al., 2016). O citoplasma se torna mais denso durante a dessecação, com formação de gotículas lipídicas e aumento no número de plastoglóbulos nos cloroplastos (Holzinger et al., 2011). Esta adaptação das células

vegetativas existentes, embora mais simples que a formação de pré-acinetos e zigósporos em Zygnematophyceae, ainda permite uma recuperação eficiente da atividade fotossintética após reidratação (Herburger & Holzinger, 2015).

Estas diferentes estratégias - uma baseada na formação de tipos celulares especializados (pré-acinetos e zigósporos) e outra na modificação direta das células vegetativas existentes - refletem soluções evolutivas distintas, mas que tem resultado similar, para lidar com a sazonalidade. No entanto, ambas representam apenas mecanismos de sobrevivência ao estresse, não de manutenção da atividade metabólica durante ele (Arc et al., 2020). Esta limitação distingue fundamentalmente estas algas das plantas terrestres que posteriormente evoluíram a capacidade de manter atividade metabólica mesmo sob condições de estresse hídrico (Holzinger & Pichrtová, 2016; Week et al., 2021).

É importante notar que, apesar dessas limitações, as CGA conseguiram efetivamente colonizar ambientes terrestres distantes de corpos d'água doce permanentes (Holzinger et al., 2011; Terlova et al., 2021). Através da combinação entre explosões populacionais em condições favoráveis e a formação de estruturas resistentes durante períodos desfavoráveis, estes organismos estabeleceram uma estratégia de ocupação territorial efetivo, ainda que sazonal, possivelmente mediado pela precipitação e pelo vento. Esta capacidade de colonização oportunista, embora restrita temporalmente, demonstra que mesmo antes do desenvolvimento de adaptações mais complexas para manutenção de atividade metabólica contínua, as algas verdes já haviam encontrado uma estratégia viável para explorar o ambiente terrestre, ainda que de forma intermitente.

4.5.5 Implicações Evolutivas - Parte III: Substituição Sazonal e Funcionalidade Eossistêmica

Estas estratégias resultam na substituição sazonal da comunidade dominante (*community shift*) observado nas CFS, onde diferentes comunidades se alternam na ocupação do mesmo espaço de acordo com as condições ambientais (Shade et al., 2012; Yachi & Loreau, 1999). Esta dinâmica de substituição não representa apenas uma simples troca de organismos, mas reflete um complexo mecanismo de manutenção da funcionalidade do ecossistema através da substituição de organismos com capacidades funcionais similares, porém com características de crescimento ótimo adaptadas a diferentes condições (Hooper et al., 2005; Torsvik & Øvreås, 2002; Walker, 1992). No caso das CFS, enquanto as algas verdes eucarióticas dominam durante a estação úmida devido à sua eficiente maquinaria fotossintética em condições hídricas favoráveis, os líquens predominam na estação seca através de adaptações específicas e

complexas redes de interação que permitem a manutenção de atividade metabólica mesmo sob estresse hídrico.

4.5.6 Implicações Evolutivas - Parte IV: Pressões Seletivas e Adaptação Contínua

Em contraste com a sazonalidade enfrentada pelas algas verdes eucarióticas encontradas nas CFS, o gradiente de disponibilidade hídrica enfrentado pelos ancestrais das embriófitas ao se distanciarem progressivamente de corpos d'água representa uma pressão seletiva com forte autocorrelação temporal positiva ("*red noise*"), onde condições sucessivas são dependentes e tendem a ser similares (Grove et al., 2022; Halley, 1996; Schwager et al., 2006). Esta dinâmica de variação ambiental, caracterizado por mudanças graduais e direcionais, difere fundamentalmente da sazonalidade por não apresentar pontos de retorno às condições iniciais, criando uma pressão seletiva contínua e cumulativa. Nestas circunstâncias, adaptações temporárias ou cíclicas tornam-se insuficientes, favorecendo o desenvolvimento de inovações permanentes e cumulativas que permitam a manutenção da atividade metabólica e a exploração ativa de recursos mesmo sob condições progressivamente mais limitantes (Sørensen et al., 2012; Tsimring, 2014). Isto representa uma transição fundamental na estratégia adaptativa: da alternância entre estados ativos e menos ativos metabolicamente para uma presença contínua e funcional no ambiente, independente das flutuações nas condições ambientais.

Esta capacidade de manter presença física constante no ambiente continental possivelmente representou uma inovação fisiológica e ecológica fundamental, permitindo não apenas a sobrevivência em condições adversas, mas a expansão ativa para novos territórios (Delwiche & Cooper, 2015; Fürst-Jansen et al., 2020). As linhagens que desenvolveram estratégias para buscar e manter água ativamente ganharam uma vantagem competitiva substancial através da ocupação permanente de ambientes previamente inacessíveis (Khan et al., 2016; Raven & Edwards, 2001). A distinção entre estratégias de sobrevivência passiva e adaptação ativa pode ter sido um dos fatores mais cruciais na conquista do ambiente terrestre, permitindo uma estabilidade ecossistêmica e expansão territorial sem precedentes na história evolutiva dos organismos fotossintetizantes. Esta transição na estratégia adaptativa possivelmente explica a atual dominância das plantas terrestres nos ecossistemas globais.

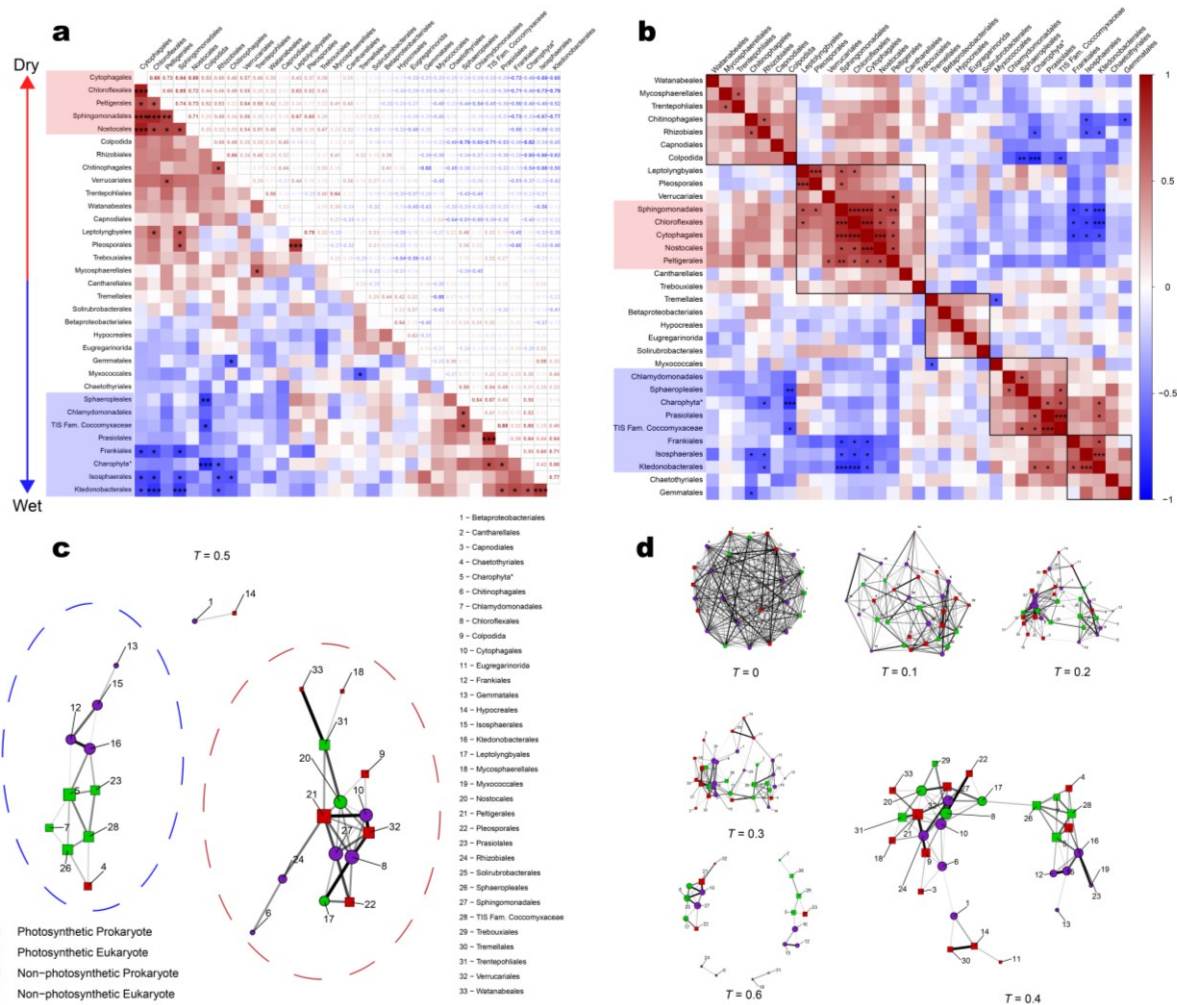


Figura 15: Matrizes de coocorrência e redes de correlação microbiana com base no coeficiente de Spearman. Os valores de p são indicados com níveis de significância: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,005$ (ajustados por FDR). **(a)** Matriz de correlação ordenada pela primeira componente principal (FPC), destacando agrupamentos naturais de coocorrência. **(b)** Matriz de correlação organizada por clusters obtidos com o método de agrupamento hierárquico (hclust). **(c)** Rede de correlação gerada com o método de correlação de Fruchterman-Reingold, utilizando um limiar de corte de 0,5, evidenciando grupos sazonais bem definidos, com elipses tracejadas indicando as comunidades predominantes em cada estação: seca (Vermelho) e chuvosa (Azul). **(d)** Redes de correlação adicionais explorando diferentes limiares de corte, mostrando variações nas interações entre as comunidades conforme o parâmetro é ajustado.

4.6 Análises pareadas e segregação sazonal de grupos funcionais

Uma análise mais detalhada das relações entre pares específicos de grupos taxonômicos do consórcio líquênico (Fig. 16a-d) revela relações robustas de coocorrência que corroboram e refinam as observações das matrizes de correlação. A relação simbiótica fundamental entre Peltigerales e Nostocales é evidenciada por sua forte correlação positiva (Fig. 16d, $R^2 = 0,54$), confirmando a estabilidade do módulo líquênico durante a estação seca. Em torno deste núcleo simbiótico, destaca-se o papel central das bactérias acessórias: Chloroflexales demonstra uma correlação significativa com Nostocales (Fig. 16a, $R^2 = 0,45$), e Cytophagales apresenta fortes correlações positivas tanto com Chloroflexales (Fig. 16b, $R^2 = 0,55$) quanto com

Sphingomonadales (Fig. 16c, $R^2 = 0,60$), sugerindo uma rede de interações microbianas estável durante a estação seca, possivelmente relacionada às suas capacidades complementares de degradação de polímeros complexos e ciclagem de nutrientes.

Notavelmente, a análise revela uma relação de exclusão envolvendo membros da classe Chloroflexia: Ktedonobacterales demonstra uma forte relação de exclusão com Chloroflexales (Fig. 16f, $R^2 = 0,49$), grupo irmão, assim como com Sphingomonadales (Fig. 16e, $R^2 = 0,60$), uma bactéria associada ao consórcio liquênico. Esta dicotomia dentro da classe Chloroflexia, evidenciada pela exclusão mútua entre Ktedonobacterales e Chloroflexales, é particularmente interessante, pois sugere uma divergência evolutiva em termos de adaptações ecológicas e nichos temporais - enquanto Chloroflexales predomina na estação seca como parte do consórcio liquênico, Ktedonobacterales emerge como um táxon dominante na estação úmida, refletindo estratégias metabólicas e adaptativas distintas dentro do mesmo grupo filogenético em resposta às variações sazonais.

As últimas análises (Fig. 16g-i) destacam uma relação estatisticamente robusta de exclusão entre os protistas ciliados da classe Colpodea e as algas verdes eucarióticas que apresentam abundância diferencial significativa na estação chuvosa: Coccomyxaceae ($R^2 = 0,53$), Charophyta ($R^2 = 0,38$) e Chlorophyceae ($R^2 = 0,59$). A relação de exclusão mais forte, observada na matriz de coocorrência entre Colpodea e Charophyta (Colpodida e Charophyta*, Fig. 15a: $-0,82$, $p < 0,001$, FDR-ajustado), reflete uma dicotomia sazonal fundamental na estruturação da comunidade. Esta dinâmica é particularmente significativo por dois aspectos: primeiro, envolve especificamente as algas verdes que demonstram preferência pela estação úmida, e não todas as algas presentes no sistema; segundo, a significância estatística desta exclusão, mesmo após correções rigorosas para múltiplos testes (FDR), sugere uma relação ecológica genuína, além da mera segregação temporal. Esta seletividade na relação de exclusão sugere uma complexa dinâmica ecológica: enquanto Colpodea, com sua estratégia r-selecionada e adaptações para sobrevivência em condições desfavoráveis (incluindo encistamento e reprodução por quadripartição) (Lüftenegger et al., 1985), domina durante a estação seca, as algas verdes encontram condições ótimas para proliferação durante a estação úmida, quando a maior disponibilidade de água favorece seu metabolismo fotossintético e crescimento vegetativo, corroborando a observação anterior de que estas algas, apesar de suas adaptações moleculares avançadas, ainda dependem fortemente da disponibilidade hídrica para manter populações abundantes. Tal segregação temporal pode representar não apenas uma resposta direta às condições ambientais, mas também uma estratégia evolutiva para evitar a

pressão de predação de outros microrganismos sobre estas algas durante seus períodos de maior abundância.

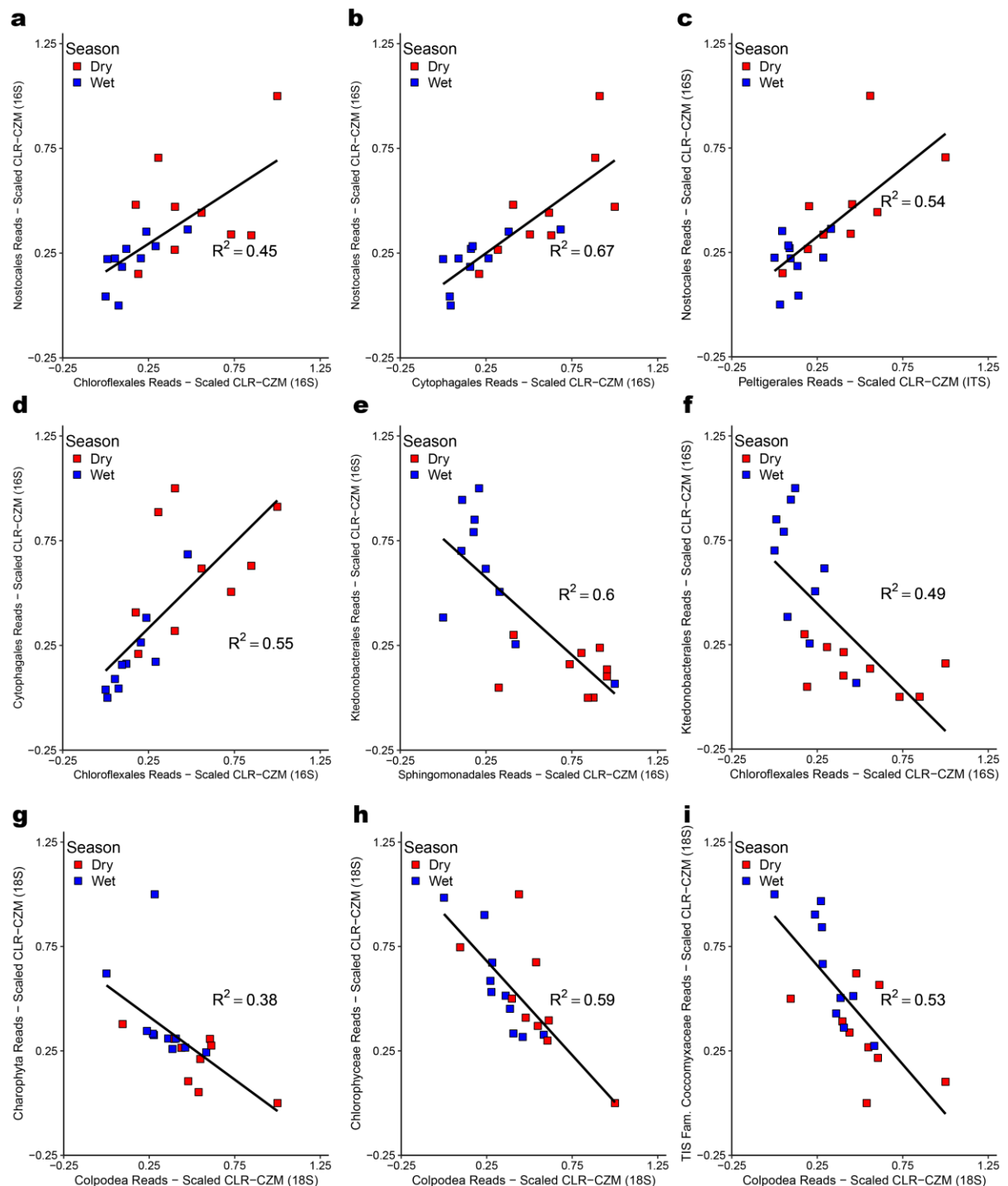


Figura 16: Correlações pareadas entre grupos taxonômicos chave nas CFS. Os gráficos mostram as relações entre pares de táxons com base em suas abundâncias transformadas (CLR-CZM), amostras coloridas por estação (Seco: vermelho (*Dry*); Úmido: azul (*Wet*)). (a-d) Correlações envolvendo o consórcio liquênico: (a) Chloroflexales e Nostocales, (b) Chloroflexales e Cytophagales, (c) Sphingomonadales e Ktedonobacterales, (d) Peltigerales e Nostocales. (e-f) Relações de exclusão sazonal: (e) Sphingomonadales e Ktedonobacterales, (f) Chloroflexales e Ktedonobacterales. (g-i) Relações de exclusão entre Colpodea e algas verdes eucarióticas: (g) Coccomyxaceae, (h) Charophyta, e (i) Chlorophyceae. Valores de R^2 indicam a força da correlação.

4.7 Análises de beta-diversidade e dinâmicas de estruturação sazonal

A análise de ordenação através de múltiplas métricas de dissimilaridade confirma e expande a estruturação sazonal previamente observados nas redes de correlação (Fig. 17). Tanto as análises baseadas em abundância (Bray-Curtis e UniFrac ponderado com dados CSS-normalizados, Fig. 17a-c, m-o) quanto as baseadas em presença/ausência (Jaccard e UniFrac não-ponderado com dados rarefados, Fig. 17g-i, j-l) revelam uma clara separação entre as comunidades das estações seca e úmida (PERMANOVA, $p < 0,05$). Os biplots direcionados (Fig. 17p-x) sugerem que esta segregação sazonal é consistente com as dinâmicas anteriormente observadas: na estação seca, a comunidade é estruturada ao redor do consórcio líquênico (Nostocales-Peltigerales) e seus múltiplos grupos bacterianos acessórios (Chloroflexales, Cytophagales), resultando em uma rede de interações mais complexa. Em contraste, na estação úmida, um conjunto mais restrito de táxons, principalmente algas verdes eucarióticas (Charophyta*, Fam. Coccomyxaceae), emerge como principais direcionadores da estrutura comunitária.

Esta segregação sazonal também se reflete na dinâmica fúngica, onde observamos um padrão similar ao documentado por (Hawkes et al., 2011), em manipulações de campo de longo prazo: comunidades fúngicas mais abundantes, diversas e consistentes predominam em condições mais secas, enquanto comunidades menos abundantes, menos diversas e mais variáveis emergem durante períodos úmidos (Fig. 17c,f,i,l). Este padrão sugere que o estresse por dessecação pode moderar a competição entre táxons fúngicos, permitindo a coexistência de espécies com ampla gama de tolerâncias ambientais. A recuperação repetida da diversidade e abundância fúngica durante eventos periódicos de seca indica uma possível relação entre a escala temporal das flutuações ambientais naturais e a capacidade das comunidades microbianas do solo de responder a mudanças ambientais.

Estas respostas à sazonalidade, tanto na comunidade geral quanto especificamente na componente fúngica, revelam aspectos importantes sobre a organização destas comunidades microbianas. A diferença na complexidade das associações não indica necessariamente uma disparidade na diversidade total entre as estações, mas sim possíveis diferentes estratégias de organização comunitária: enquanto a estação seca favorece uma estrutura mais interconectada com múltiplos táxons acessórios suportando o módulo líquênico central, a estação úmida é caracterizada pela dominância de um grupo menor de produtores primários eucarióticos que, devido à sua eficiência fotossintética e maior tamanho celular, podem sustentar comunidades mais independentes quando as condições hídricas são favoráveis. Esta distinção na estruturação da comunidade é ainda corroborada pela análise da distribuição de diferenças sazonais ao longo

dos níveis taxonômicos (Fig. 17y), que revela uma maior proporção de táxons com abundância diferencial significativa em todos os níveis taxonômicos, exceto Reino, sugerindo que a sazonalidade afeta profundamente a estrutura da comunidade em múltiplas escalas taxonômicas.

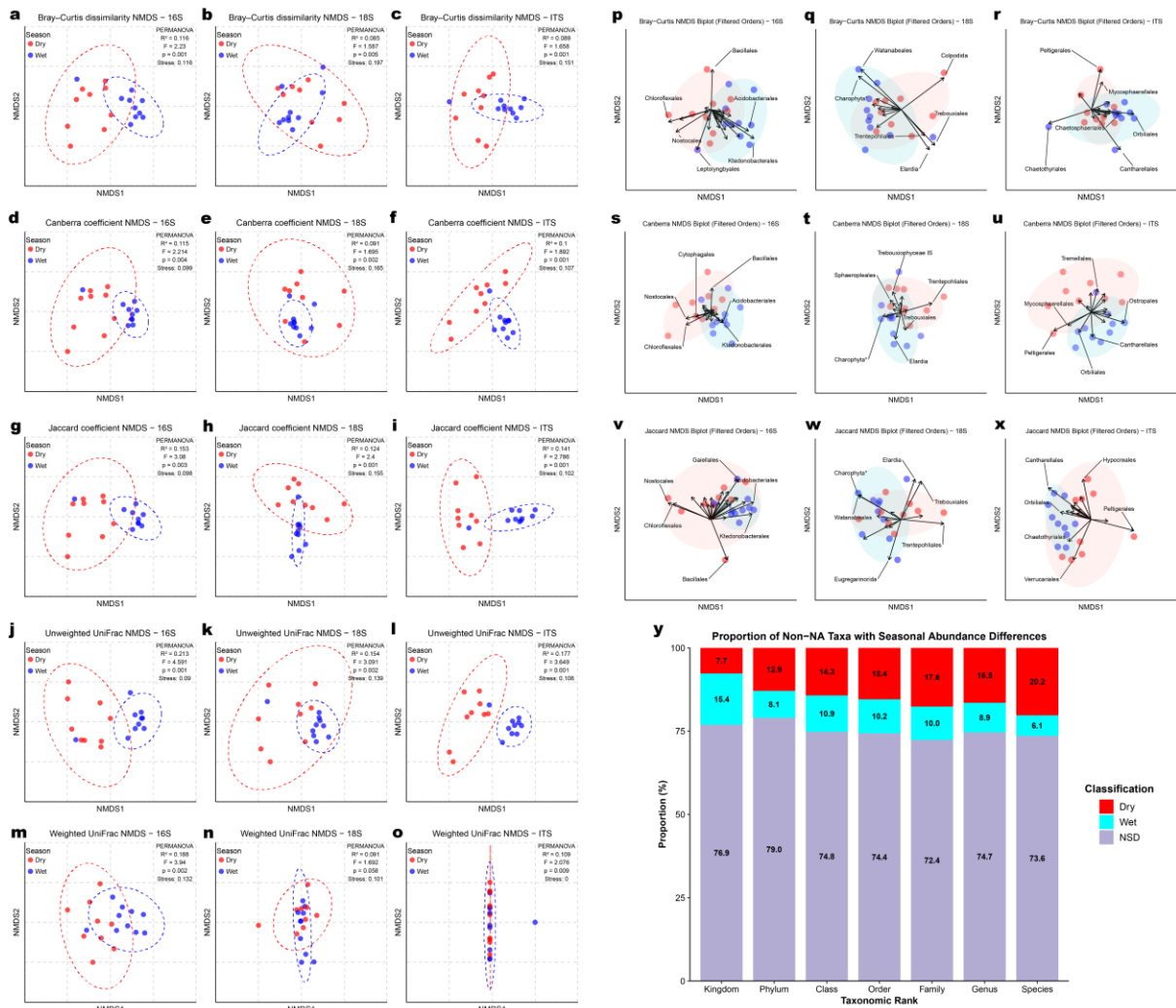


Figura 17: Análises de ordenação NMDS e distribuição de diferenças sazonais na comunidade microbiana. (a-c) Ordenações NMDS baseadas em dissimilaridade Bray-Curtis com dados normalizados por CSS para 16S, 18S e ITS, respectivamente. (d-f) Ordenações NMDS utilizando coeficiente de Canberra com dados normalizados por CSS. (g-i) Ordenações NMDS baseadas no coeficiente de Jaccard aplicadas a dados rarefados. (j-l) Ordenações NMDS usando UniFrac não-ponderado com dados rarefados e árvores podadas. (m-o) Ordenações NMDS usando UniFrac ponderado com dados CSS-normalizados e árvores podadas. Todas as ordenações incluem estatísticas PERMANOVA e valores de stress. Para todas as análises NMDS acima, amostras da estação seca são representadas em vermelho e da estação úmida em azul. (p-r) Biplots direcionados baseados em dissimilaridade Bray-Curtis com dados CSS-normalizados. (s-u) Biplots baseados no coeficiente de Canberra com dados CSS-normalizados. (v-x) Biplots baseados no coeficiente de Jaccard com dados rarefados. (y) Proporção de táxons apresentando diferenças significativas de abundância entre as estações (teste de Wilcoxon com p -valores ajustados por FDR; vermelho: maior abundância na estação seca; azul: maior abundância na estação úmida; cinza: NSD (sem diferença significativa) ao longo dos diferentes níveis taxonômicos.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A análise sazonal das comunidades microbianas em crostas fotossintéticas de solo não apenas confirmou nossa hipótese de variação na composição e estrutura entre as estações, mas revelou dinâmicas contrastantes de organização que oferecem evidências únicas sobre a evolução da vida terrestre. As CFS modernas, compostas por cianobactérias e algas eucarióticas, servem como modelos importantes para compreender como os primeiros organismos fotossintéticos podem ter se estabelecido e interagido no ambiente terrestre primitivo.

Durante a temporada úmida, observou-se uma predominância de algas verdes eucarióticas, como os representantes da classe Zygnematophyceae, que formam populações praticamente autônomas, necessitando apenas de interações microbianas específicas e funcionalmente direcionadas. Esta independência reflete suas adaptações moleculares avançadas, incluindo genes de resistência a estresses abióticos adquiridos por transferência horizontal de microrganismos do solo.

Notavelmente, estas algas conseguiram estabelecer uma presença efetiva no ambiente terrestre mesmo distante de corpos d'água permanentes, através de uma estratégia de colonização oportunista provavelmente mediado pela precipitação e pelo vento. Esta estratégia, combinando explosões populacionais em condições favoráveis com a formação de estruturas resistentes em períodos desfavoráveis, sugere que mesmo antes do desenvolvimento de adaptações mais complexas, as algas verdes já haviam encontrado mecanismos viáveis para explorar o ambiente terrestre, ainda que de forma intermitente. No entanto, a drástica redução de sua abundância durante a temporada seca, mesmo em um ambiente apenas sazonalmente árido, sugere limitações importantes deste modelo de autonomia.

A temporada seca revelou uma rede complexa de interações microbianas centrada em consórcios liquênicos, evidenciando uma estratégia de sobrevivência baseada em relações sinérgicas. É importante ressaltar que as diferenças observadas entre as estações não representam simplesmente comunidades em estados fisiológicos diferentes que alternadamente secam e reidratam. As análises de redes de correlação e as relações de exclusão mútua observadas entre grupos funcionais específicos sugerem comunidades estruturalmente distintas, com adaptações específicas para cada condição sazonal, revelando estratégias fundamentalmente diferentes de sobrevivência.

Esta alternância sazonal entre grupos centrais reflete diferentes respostas aos padrões temporais de variação ambiental: enquanto a sazonalidade favorece uma estratégia de alternância entre estados ativos e quiescentes, o gradiente crescente de aridez enfrentado durante a terrestrialização representou uma pressão seletiva direcional que possivelmente

favoreceu adaptações permanentes. Enquanto adaptações moleculares permitiram maior autonomia em condições favoráveis, a persistente vulnerabilidade à escassez hídrica pode ter representado uma pressão seletiva crucial para o desenvolvimento de estruturas radiculares primitivas nas primeiras embriófitas, permitindo a exploração de recursos em camadas mais profundas do solo.

É importante reconhecer as limitações inerentes a este estudo, incluindo restrições temporais na amostragem, vieses metodológicos nas análises moleculares, e limitações nos bancos de dados taxonômicos disponíveis, particularmente para linhagens basais de Streptophyta. Além disso, este trabalho representa uma das primeiras tentativas de investigar sistematicamente a dinâmica sazonal de comunidades microbianas com foco específico em algas Streptophyta em CFS, oferecendo uma perspectiva única sobre as estratégias adaptativas destes organismos no ambiente terrestre. No entanto, apesar destas limitações, as CFS modernas ainda representam o melhor sistema modelo disponível para compreender as dinâmicas ancestrais de colonização terrestre. A conservação de estratégias adaptativas fundamentais e a presença de linhagens evolutivamente antigas fazem das CFS uma janela única para o passado, permitindo *insights* sobre os processos que moldaram a evolução das plantas terrestres.

Baseado nos resultados deste trabalho e nas evidências disponíveis na literatura, propomos um modelo evolutivo que integra as diferentes estratégias adaptativas observadas nas CFS modernas com o processo de terrestrialização (Fig. 18). Este modelo sugere uma progressão desde colonizadores iniciais altamente dependentes de interações microbianas em zonas de transição entre a interface aquática e a subaérea, similares às comunidades observadas durante a estação seca. O contato próximo com a microbiota nessas zonas de transição pode ter facilitado eventos cruciais de transferência horizontal de genes, levando a organismos com maior autonomia molecular, representados pelas populações de algas verdes da estação úmida, e culminando nas primeiras embriófitas que desenvolveram inovações estruturais permitindo a conquista efetiva do ambiente terrestre. A alternância sazonal observada nas CFS modernas entre estas diferentes estratégias organizacionais oferece suporte empírico para este modelo evolutivo.

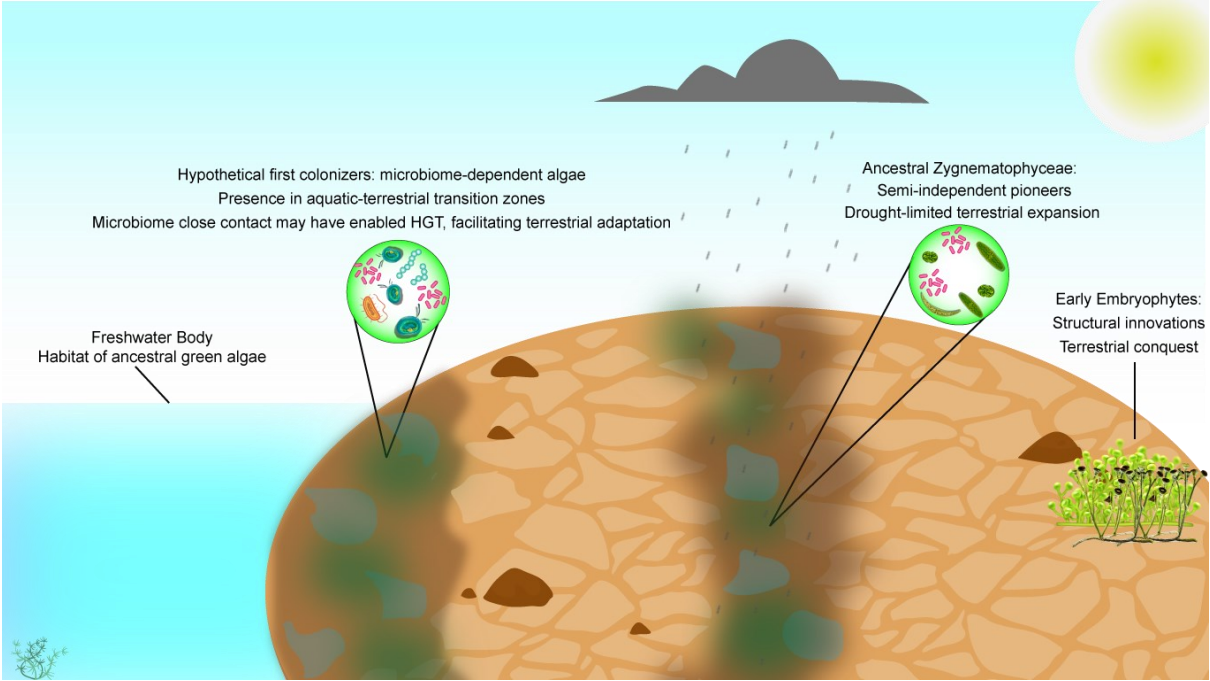


Figura 18: Modelo conceitual da progressão evolutiva rumo à terrestrialização. O esquema ilustra três estágios fundamentais: (1) Colonizadores iniciais com alta dependência do microbioma, ocupando zonas de transição aquático-terrestres, onde o contato próximo com a microbiota pode ter facilitado eventos de transferência horizontal de genes (HGT); (2) Ancestrais das Zygnematomyceae, representando um estágio intermediário com maior autonomia molecular mas ainda limitados pela disponibilidade hídrica; (3) Primeiras embriófitas, que desenvolveram inovações estruturais permitindo a conquista efetiva do ambiente terrestre. Este modelo reflete a transição gradual observada nas CFS modernas, onde diferentes estratégias de organização comunitária podem representar análogos de distintos estágios evolutivos.

As observações feitas neste estudo sugerem que a transição para a vida terrestre não foi simplesmente uma questão de acumular adaptações moleculares, mas envolveu uma mudança fundamental na estratégia de resposta ao estresse: da sobrevivência passiva para a capacidade de manter atividade contínua mesmo sob condições adversas. O estudo das CFS, junto com evidências de interações simbióticas em algas carófitas basais, revela como diferentes padrões temporais de estresse podem ter moldado distintas estratégias adaptativas durante a terrestrialização. Esta perspectiva destaca a importância de considerar não apenas as adaptações individuais e interações ecológicas, mas também a natureza temporal das pressões seletivas para compreender plenamente a evolução das plantas terrestres.

Tabela 2: Classificação taxonômica dos organismos fotossintetizantes eucarióticos identificados nas crostas fotossintéticas de solo, incluindo gênero, ordem e grupo taxonômico principal.

Gênero	Ordem	Grupo/Filo
<i>Closterium</i>	Desmidiales	Charophyta
<i>Cosmarium</i>	Desmidiales	Charophyta
<i>Klebsormidium</i>	Klebsormidiales	Charophyta
<i>Netrium</i>	Zygnematales	Charophyta
<i>Roya</i>	Zygnematales	Charophyta

<i>Floydiella</i>	Chaetopeltidales	Chlorophyta
<i>Uvulifera</i>	Chaetophorales	Chlorophyta
<i>Chlamydomonas</i>	Chlamydomonadales	Chlorophyta
<i>Deasonia</i>	Chlamydomonadales	Chlorophyta
<i>Tetracystis</i>	Chlamydomonadales	Chlorophyta
<i>Chlorella</i>	Chlorellales	Chlorophyta
<i>Leptochlorella</i>	Chlorellales	Chlorophyta
<i>Prototheca</i>	Chlorellales	Chlorophyta
<i>Desmochloris</i>	Chlorocystidales	Chlorophyta
<i>Chlorosarcinopsis</i>	Chlorosarcinales	Chlorophyta
<i>Coccomyxa</i>	Fam. Coccomyxaceae	Chlorophyta
<i>Paradoxia</i>	Fam. Coccomyxaceae	Chlorophyta
<i>Leptosira</i>	Fam. Leptosiraceae	Chlorophyta
<i>Elliptochloris</i>	Prasiolales	Chlorophyta
<i>Koliella</i>	Prasiolales	Chlorophyta
<i>Prasiola</i>	Prasiolales	Chlorophyta
<i>Bracteacoccus</i>	Sphaeropleales	Chlorophyta
<i>Chromochloris</i>	Sphaeropleales	Chlorophyta
<i>Coenocystis</i>	Sphaeropleales	Chlorophyta
<i>Gloeocystis</i>	Sphaeropleales	Chlorophyta
<i>Hylodesmus</i>	Sphaeropleales	Chlorophyta
<i>Neocystis</i>	Sphaeropleales	Chlorophyta
<i>Dictyochloropsis</i>	Trebouxiales	Chlorophyta
<i>Heterochlorella</i>	Trebouxiales	Chlorophyta
<i>Lobosphaera</i>	Trebouxiales	Chlorophyta
<i>Myrmecia</i>	Trebouxiales	Chlorophyta
<i>Pabia</i>	Trebouxiales	Chlorophyta
<i>Symbiochloris</i>	Trebouxiales	Chlorophyta
<i>Trebouxia</i>	Trebouxiales	Chlorophyta
<i>Xylochloris</i>	Trebouxiales	Chlorophyta
<i>Chloropyrula</i>	Trebouxiophyceae incertae sedis	Chlorophyta
<i>Eremochloris</i>	Trebouxiophyceae incertae sedis	Chlorophyta
<i>Trentepohlia</i>	Trentepohliales	Chlorophyta
<i>Planophila</i>	Ulotrichales	Chlorophyta
<i>Chloroidium</i>	Watanabeales	Chlorophyta
<i>Heveochlorella</i>	Watanabeales	Chlorophyta
<i>Parachloroidium</i>	Watanabeales	Chlorophyta
<i>Watanabea</i>	Watanabeales	Chlorophyta
<i>Spumella</i>	Chromulinales	Ochrophyta
<i>Cryptomonas</i>	Cryptomonadales	Ochrophyta
<i>Eunotia</i>	Eunotiales	Ochrophyta
<i>Microchloropsis</i>	Eustigmatales	Ochrophyta
<i>Vischeria</i>	Eustigmatales	Ochrophyta
<i>Pleurochloris</i>	Mischococcales	Ochrophyta

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarenkov, K., Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Taylor, A. F. S., May, T. W., Frøslev, T. G., Pawlowska, J., Lindahl, B., Põldmaa, K., Truong, C., Vu, D., Hosoya, T., Niskanen, T., Piirmann, T., Ivanov, F., Zirk, A., Peterson, M., Cheeke, T. E., Ishigami, Y., ... Kõljalg, U. (2024). The UNITE database for molecular identification and taxonomic communication of fungi and other eukaryotes: Sequences, taxa and classifications reconsidered. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D791–D797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1039>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andrade, G., Mihara, K., Linderman, R., & Bethlenfalvay, G. (1998). Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. *Plant and Soil*, 202, 89–96. <https://doi.org/10.1023/A:1004301423150>
- Arc, E., Pichrtová, M., Kranner, I., & Holzinger, A. (2020). Pre-akinetete formation in *Zygnema* sp. From polar habitats is associated with metabolite re-arrangement. *Journal of Experimental Botany*, 71(11), 3314–3322. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa123>
- Artur, M. A. S., & Kajala, K. (2021). Convergent evolution of gene regulatory networks underlying plant adaptations to dry environments. *Plant, Cell & Environment*, 44(10), 3211–3222. <https://doi.org/10.1111/pce.14143>
- Ashtaputre, A. A., & Shah, A. K. (1995). Studies on a Viscous, Gel-Forming Exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1159–1162. <https://doi.org/10.1128/aem.61.3.1159-1162.1995>
- Badyaev, A. V. (2005). Stress-induced variation in evolution: From behavioural plasticity to genetic assimilation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1566), 877–886. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.3045>

- Becker, B., & Marin, B. (2009). Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Annals of Botany*, 103(7), 999–1004. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp044>
- Beckett, R. P., Mayaba, N., Minibayeva, F. V., & Alyabyev, A. J. (2005). Hardening by Partial Dehydration and ABA Increase Desiccation Tolerance in the Cyanobacterial Lichen *Peltigera polydactylon*. *Annals of Botany*, 96(1), 109–115. <https://doi.org/10.1093/aob/mci156>
- Bhatti, A. A., Haq, S., & Bhat, R. A. (2017). Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. *Microbial Pathogenesis*, 111, 458–467. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.036>
- Bierenbroodspot, M. J., Pröschold, T., Fürst-Jansen, J. M. R., de Vries, S., Irisarri, I., Darienko, T., & de Vries, J. (2024). Phylogeny and evolution of streptophyte algae. *Annals of Botany*, 134(3), 385–400. <https://doi.org/10.1093/aob/mcae091>
- Blanco, Y., Rivas, L. A., González-Toril, E., Ruiz-Bermejo, M., Moreno-Paz, M., Parro, V., Palacín, A., Aguilera, Á., & Puente-Sánchez, F. (2019). Environmental parameters, and not phylogeny, determine the composition of extracellular polymeric substances in microbial mats from extreme environments. *The Science of the total environment*, 650 Pt 1, 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.440>
- Bockheim, J. G., & Gennadiyev, A. N. (2000). The role of soil-forming processes in the definition of taxa in Soil Taxonomy and the World Soil Reference Base. *Geoderma*, 95(1–2), 53–72. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(99\)00083-X](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(99)00083-X)
- Bohnert, H. J., & Sheveleva, E. (1998). Plant stress adaptations—Making metabolism move. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(3), 267–274. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(98\)80115-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(98)80115-5)
- Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., & Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn,

- C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Borin, S., Ventura, S., Tambone, F., Mapelli, F., Schubotz, F., Brusetti, L., Scaglia, B., D'Acqui, L. P., Solheim, B., Turicchia, S., Marasco, R., Hinrichs, K., Baldi, F., Adani, F., & Daffonchio, D. (2010). Rock weathering creates oases of life in a High Arctic desert. *Environmental Microbiology*, 12(2), 293–303. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02059.x>
- Bowles, T. M., Jackson, L. E., & Cavagnaro, T. R. (2018). Mycorrhizal fungi enhance plant nutrient acquisition and modulate nitrogen loss with variable water regimes. *Global Change Biology*, 24(1). <https://doi.org/10.1111/gcb.13884>
- Breiman, L., Cutler, A., Liaw, A., & Wiener, M. (2002). *randomForest: Breiman and Cutlers Random Forests for Classification and Regression* (p. 4.7-1.2) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.randomForest>
- Briatte, F. (2016). *ggnetwork: Geometries to Plot Networks with "ggplot2"* (p. 0.5.13) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.ggnetwork>
- Butts, C. T. (2001). *sna: Tools for Social Network Analysis* (p. 2.8) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.sna>
- Butts, C. T. (2005). *network: Classes for Relational Data* (p. 1.18.2) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.network>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Campitelli, E. (2019). *ggnewscale: Multiple Fill and Colour Scales in "ggplot2"* (p. 0.5.0) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.ggnewscale>
- Chamizo, S., Mugnai, G., Rossi, F., Certini, G., & De Philippis, R. (2018). Cyanobacteria Inoculation Improves Soil Stability and Fertility on Different Textured Soils: Gaining Insights for

Applicability in Soil Restoration. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 49.

<https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00049>

Chang, Y., Wang, S., Sekimoto, S., Aerts, A. L., Choi, C., Clum, A., LaButti, K. M., Lindquist, E. A., Yee

Ngan, C., Ohm, R. A., Salamov, A. A., Grigoriev, I. V., Spatafora, J. W., & Berbee, M. L. (2015).

Phylogenomic Analyses Indicate that Early Fungi Evolved Digesting Cell Walls of Algal

Ancestors of Land Plants. *Genome Biology and Evolution*, 7(6), 1590–1601.

<https://doi.org/10.1093/gbe/evv090>

Cheng, S., Xian, W., Fu, Y., Marin, B., Keller, J., Wu, T., Sun, W., Li, X., Xu, Y., Zhang, Y., Wittek, S.,

Reder, T., Günther, G., Gontcharov, A., Wang, S., Li, L., Liu, X., Wang, J., Yang, H., ...

Melkonian, M. (2019). Genomes of Subaerial Zygnematophyceae Provide Insights into Land

Plant Evolution. *Cell*, 179(5), 1057-1067.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.019>

Couradeau, E., Giraldo-Silva, A., Martini, F. D., & Garcia-Pichel, F. (2019). Spatial segregation of the

biological soil crust microbiome around its foundational cyanobacterium, *Microcoleus vaginatus*, and the formation of a nitrogen-fixing cyanosphere. *Microbiome*, 7(1).

<https://doi.org/10.1186/s40168-019-0661-2>

Cruz, A. A., Cooper, P. J., Figueiredo, C. A., Alcantara-Neves, N. M., Rodrigues, L. C., & Barreto, M. L.

(2017). Global issues in allergy and immunology: Parasitic infections and allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(5), 1217–1228.

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.005>

Dahl, T., & Arens, S. (2020). The impacts of land plant evolution on Earth's climate and oxygenation state – An interdisciplinary review. *Chemical Geology*.

<https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2020.119665>

De Cáceres, M., Sol, D., Lapiedra, O., & Legendre, P. (2011). A framework for estimating niche metrics using the resemblance between qualitative resources. *Oikos*, 120(9), 1341–1350.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19679.x>

- de Vries, J., & Archibald, J. M. (2018). Plant evolution: Landmarks on the path to terrestrial life. *New Phytologist*, 217(4), 1428–1434. <https://doi.org/10.1111/nph.14975>
- DeAngelis, K. M., & Pold, G. (2020). Genome Sequences of *Frankineae* sp. Strain MT45 and *Jatrophihabitans* sp. Strain GAS493, Two Actinobacteria Isolated from Forest Soil. *Microbiology Resource Announcements*, 9(38), e00614-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00614-20>
- Degli Esposti, M., Mentel, M., Martin, W., & Sousa, F. L. (2019). Oxygen Reductases in Alphaproteobacterial Genomes: Physiological Evolution From Low to High Oxygen Environments. *Frontiers in Microbiology*, 10, 499. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00499>
- Degrune, F., Dumack, K., Fiore-Donno, A. M., Bonkowski, M., Sosa-Hernández, M. A., Schlöter, M., Kautz, T., Fischer, D., & Rillig, M. C. (2019). Distinct communities of Cercozoa at different soil depths in a temperate agricultural field. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(4). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz041>
- Delaux, P.-M., Radhakrishnan, G. V., Jayaraman, D., Cheema, J., Malbreil, M., Volkening, J. D., Sekimoto, H., Nishiyama, T., Melkonian, M., Pokorny, L., Rothfels, C. J., Sederoff, H. W., Stevenson, D. W., Surek, B., Zhang, Y., Sussman, M. R., Dunand, C., Morris, R. J., Roux, C., ... Ané, J.-M. (2015). Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(43), 13390–13395. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515426112>
- Delaux, P.-M., & Schornack, S. (2021). Plant evolution driven by interactions with symbiotic and pathogenic microbes. *Science*, 371(6531), eaba6605. <https://doi.org/10.1126/science.aba6605>
- Del-Bem, L. E. (2018). Xyloglucan evolution and the terrestrialization of green plants. *New Phytologist*, 219(4), 1150–1153. <https://doi.org/10.1111/nph.15191>
- Delwiche, C., & Cooper, E. (2015). The Evolutionary Origin of a Terrestrial Flora. *Current Biology*, 25, 899–910. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.029>

- Domozych, D. S., & Bagdan, K. (2022). The cell biology of charophytes: Exploring the past and models for the future. *Plant Physiology*, 190(3), 1588–1608. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac390>
- Domozych, D. S., & LoRicco, J. G. (2023). The extracellular matrix of green algae. *Plant Physiology*, 194(1), 15–32. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad384>
- Donner, A., Glaser, K., Borchhardt, N., & Karsten, U. (2017). Ecophysiological Response on Dehydration and Temperature in Terrestrial Klebsormidium (Streptophyta) Isolated from Biological Soil Crusts in Central European Grasslands and Forests. *Microbial Ecology*, 73(4), 850–864. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0917-3>
- Donoghue, P., Harrison, C. J., Paps, J., & Schneider, H. (2021). The evolutionary emergence of land plants. *Current Biology*, 31, 1281–1298. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.07.038>
- Elick, J. M., Driese, S. G., & Mora, C. I. (1998). Very large plant and root traces from the Early to Middle Devonian: Implications for early terrestrial ecosystems and atmospheric p(CO₂). *Geology*, 26(2), 143. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1998\)026<0143:VLPART>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1998)026<0143:VLPART>2.3.CO;2)
- Ewens, S. D., Gomberg, A. F. S., Barnum, T. P., Borton, M. A., Carlson, H. K., Wrighton, K. C., & Coates, J. D. (2020). *The Diversity and Evolution of Microbial Dissimilatory Phosphite Oxidation*. Microbiology. <https://doi.org/10.1101/2020.12.28.424620>
- Fincker, M., Huber, J. A., Orphan, V. J., Rappé, M. S., Teske, A., & Spormann, A. M. (2020). Metabolic strategies of marine subseafloor Chloroflexi inferred from genome reconstructions. *Environmental Microbiology*, 22(8), 3188–3204. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15061>
- Flues, S., Blokker, M., Dumack, K., & Bonkowski, M. (2018). Diversity of Cercomonad Species in the Phyllosphere and Rhizosphere of Different Plant Species with a Description of *Neocercomonas epiphylla* (Cercozoa, Rhizaria) a Leaf-Associated Protist. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 65(5), 587–599. <https://doi.org/10.1111/jeu.12503>
- Francioli, D., Lentendu, G., Lewin, S., & Kolb, S. (2021). DNA Metabarcoding for the Characterization of Terrestrial Microbiota—Pitfalls and Solutions. *Microorganisms*, 9(2), 361. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020361>

- Fürst-Jansen, J. M. R., De Vries, S., & De Vries, J. (2020). Evo-physio: On stress responses and the earliest land plants. *Journal of Experimental Botany*, 71(11), 3254–3269.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa007>
- Galloway, A. F., Akhtar, J., Marcus, S., Fletcher, N., Field, K. J., & Knox, P. (2020). Cereal root exudates contain highly structurally complex polysaccharides with soil-binding properties. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. <https://doi.org/10.1111/tpj.14852>
- Galloway, A. F., Pedersen, M. J., Merry, B., Marcus, S. E., Blacker, J., Benning, L. G., Field, K. J., & Knox, J. P. (2018). Xyloglucan is released by plants and promotes soil particle aggregation. *New Phytologist*, 217(3), 1128–1136. <https://doi.org/10.1111/nph.14897>
- Gangwar, R. K., Táncsics, A., Makádi, M., Farkas, M., Cserhádi, M., Michéli, E., Fuchs, M., & Szegi, T. (2024). Bacterial community composition of Hungarian salt-affected soils under different land uses. *Biologia Futura*, 75(3), 339–350. <https://doi.org/10.1007/s42977-024-00235-1>
- Gasulla, F., Del Campo, E. M., Casano, L. M., & Guéra, A. (2021). Advances in Understanding of Desiccation Tolerance of Lichens and Lichen-Forming Algae. *Plants*, 10(4), 807.
<https://doi.org/10.3390/plants10040807>
- Ghassemi, N., Poulhazan, A., Deligey, F., Mentink-Vigier, F., Marcotte, I., & Wang, T. (2022). Solid-State NMR Investigations of Extracellular Matrixes and Cell Walls of Algae, Bacteria, Fungi, and Plants. *Chemical Reviews*, 122(10), 10036–10086.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00669>
- Giraldo-Silva, A., Fernandes, V., Bethany, J., & Garcia-Pichel, F. (2020). Niche Partitioning with Temperature among Heterocystous Cyanobacteria (*Scytonema* spp., *Nostoc* spp., and *Tolypothrix* spp.) from Biological Soil Crusts. *Microorganisms*, 8.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8030396>
- Gray, D., Lewis, L., & Cardon, Z. (2007). Photosynthetic recovery following desiccation of desert green algae (Chlorophyta) and their aquatic relatives. *Plant, cell & environment*, 30 10, 1240–1255.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.2007.01704.X>

- Grinhut, T., Hadar, Y., & Chen, Y. (2007). Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: Processes and mechanisms. *Fungal Biology Reviews*, 21(4), 179–189.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.09.003>
- Grove, M., Timbrell, L., Jolley, B., Polack, F., & Borg, J. M. (2022). The Importance of Noise Colour in Simulations of Evolutionary Systems. *Artificial Life*, 27(3–4), 164–182.
https://doi.org/10.1162/artl_a_00354
- Grube, M., Cernava, T., Soh, J., Fuchs, S., Aschenbrenner, I., Lassek, C., Wegner, U., Becher, D., Riedel, K., Sensen, C. W., & Berg, G. (2015). Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *The ISME Journal*, 9(2), 412–424.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2014.138>
- Gueneli, N., McKenna, A. M., Ohkouchi, N., Boreham, C. J., Beghin, J., Javaux, E. J., & Brocks, J. J. (2018). 1.1-billion-year-old porphyrins establish a marine ecosystem dominated by bacterial primary producers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(30).
<https://doi.org/10.1073/pnas.1803866115>
- Guo, Y.-S., Furrer, J. M., Kadilak, A. L., Hinestroza, H. F., Gage, D. J., Cho, Y. K., & Shor, L. M. (2018). Bacterial Extracellular Polymeric Substances Amplify Water Content Variability at the Pore Scale. *Frontiers in Environmental Science*, 6, 93. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00093>
- Halley, J. M. (1996). Ecology, evolution and 1f-noise. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(1), 33–37.
[https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)81067-6](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)81067-6)
- Harholt, J., Moestrup, Ø., & Ulvskov, P. (2016). Why Plants Were Terrestrial from the Beginning. *Trends in Plant Science*, 21(2), 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.010>
- Hartemink, A. E., & Bockheim, J. G. (2013). Soil genesis and classification. *Catena*, 104, 251–256.
<https://doi.org/10.1016/j.catena.2012.12.001>
- Hartung, W. (2010). The evolution of abscisic acid (ABA) and ABA function in lower plants, fungi and lichen. *Functional Plant Biology*, 37(9), 806. <https://doi.org/10.1071/FP10058>

- Hawkes, C. V., Kivlin, S. N., Rocca, J. D., Huguet, V., Thomsen, M. A., & Suttle, K. B. (2011). Fungal community responses to precipitation: FUNGAL CLIMATE RESPONSE. *Global Change Biology*, 17(4), 1637–1645. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02327.x>
- Hell, A. F., Gasulla, F., González-Hourcade, M., Del Campo, E. M., Centeno, D. C., & Casano, L. M. (2019). Tolerance to Cyclic Desiccation in Lichen Microalgae is Related to Habitat Preference and Involves Specific Priming of the Antioxidant System. *Plant and Cell Physiology*, 60(8), 1880–1891. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz103>
- Herburger, K., & Holzinger, A. (2015). Localization and Quantification of Callose in the Streptophyte Green Algae *Zygnema* and *Klebsormidium*: Correlation with Desiccation Tolerance. *Plant and Cell Physiology*, pcv139. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv139>
- Hetherington, A. J., & Dolan, L. (2018). Stepwise and independent origins of roots among land plants. *Nature*, 561(7722), 235–238. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0445-z>
- Holzinger, A., & Karsten, U. (2013). Desiccation stress and tolerance in green algae: Consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00327>
- Holzinger, A., Lütz, C., & Karsten, U. (2011). DESICCATION STRESS CAUSES STRUCTURAL AND ULTRASTRUCTURAL ALTERATIONS IN THE AEROTERRESTRIAL GREEN ALGA KLEBSORMIDIUM CRENULATUM (KLEBSORMIDIOPHYCEAE, STREPTOPHYTA) ISOLATED FROM AN ALPINE SOIL CRUST1: STRUCTURAL EFFECTS OF DESICCATION IN KLEBSORMIDIUM. *Journal of Phycology*, 47(3), 591–602. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.00980.x>
- Holzinger, A., & Pichrtová, M. (2016). Abiotic Stress Tolerance of Charophyte Green Algae: New Challenges for Omics Techniques. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00678>
- Hooper, D. U., Chapin, F. S., Ewel, J. J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J. H., Lodge, D. M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A. J., Vandermeer, J., & Wardle, D. A. (2005). EFFECTS OF BIODIVERSITY ON ECOSYSTEM FUNCTIONING: A CONSENSUS OF

- CURRENT KNOWLEDGE. *Ecological Monographs*, 75(1), 3–35. <https://doi.org/10.1890/04-0922>
- Houston, K., Tucker, M. R., Chowdhury, J., Shirley, N., & Little, A. (2016). The Plant Cell Wall: A Complex and Dynamic Structure As Revealed by the Responses of Genes under Stress Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00984>
- Imam, S., Noguera, D. R., & Donohue, T. J. (2015). CceR and AkgR Regulate Central Carbon and Energy Metabolism in Alphaproteobacteria. *mBio*, 6(1), e02461-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02461-14>
- Jonge, L. W., Møldrup, P., Vendelboe, A. L., Tuller, M., & Wildenschild, D. (2012). Soil Architecture and Physicochemical Functions: An Introduction. *Vadose Zone Journal*, 11, 0–0. <https://doi.org/10.2136/vzj2011.0185>
- Jordan, B. (2018). *qiime2R: Importing QIIME2 artifacts and associated data into R sessions*. <https://github.com/jbisanz/qiime2R>
- Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A., Lone, A. A., Pareek, A., & Singla-Pareek, S. L. (2016). Transcription Factors and Plants Response to Drought Stress: Current Understanding and Future Directions. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01029>
- Jun Chen, Xianyang Zhang, Lu Yang, Lujun Zhang. (2012). *GUniFrac: Generalized UniFrac Distances, Distance-Based Multivariate Methods and Feature-Based Univariate Methods for Microbiome Data Analysis* (p. 1.8) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.GUniFrac>
- Kaboré, O. D., Godreuil, S., & Drancourt, M. (2020). Planctomycetes as Host-Associated Bacteria: A Perspective That Holds Promise for Their Future Isolations, by Mimicking Their Native Environmental Niches in Clinical Microbiology Laboratories. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 519301. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.519301>
- Karsten, U., Herburger, K., & Holzinger, A. (2016). Living in biological soil crust communities of African deserts—Physiological traits of green algal Klebsormidium species (Streptophyta) to cope

- with desiccation, light and temperature gradients. *Journal of Plant Physiology*, 194, 2–12.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.09.002>
- Kassambara, A. (2016). *ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots* (p. 0.6.0) [Dataset].
<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.ggpubr>
- Kassambara, A. (2019). *rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests* (p. 0.7.2) [Dataset].
<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.rstatix>
- Kaviya, N., Upadhayay, V. K., Singh, J., Khan, A., Panwar, M., & Singh, A. V. (2019). Role of Microorganisms in Soil Genesis and Functions. Em A. Varma & D. K. Choudhary (Orgs.), *Mycorrhizosphere and Pedogenesis* (p. 25–52). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6480-8_2
- Kawai, S., Martinez, J. N., Lichtenberg, M., Trampe, E., K hl, M., Tank, M., Haruta, S., Nishihara, A., Hanada, S., & Thiel, V. (2021). In-Situ Metatranscriptomic Analyses Reveal the Metabolic Flexibility of the Thermophilic Anoxygenic Photosynthetic Bacterium *Chloroflexus aggregans* in a Hot Spring Cyanobacteria-Dominated Microbial Mat. *Microorganisms*, 9(3), 652.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9030652>
- Kembel, S. W., Cowan, P. D., Helmus, M. R., Cornwell, W. K., Morlon, H., Ackerly, D. D., Blomberg, S. P., & Webb, C. O. (2010). Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics*, 26(11), 1463–1464. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq166>
- Khan, M. A., Gemenet, D. C., & Villordon, A. (2016). Root System Architecture and Abiotic Stress Tolerance: Current Knowledge in Root and Tuber Crops. *Frontiers in Plant Science*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01584>
- Klatt, C. G., Liu, Z., Ludwig, M., K hl, M., Jensen, S. I., Bryant, D. A., & Ward, D. M. (2013). Temporal metatranscriptomic patterning in phototrophic *Chloroflexi* inhabiting a microbial mat in a geothermal spring. *The ISME Journal*, 7(9), 1775–1789.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2013.52>

- Knoll, A., Bergmann, K., & Strauss, J. (2016). Life: The first two billion years. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0493>
- Kögel-Knabner, I., Zech, W., & Hatcher, P. G. (1988). Chemical composition of the organic matter in forest soils: The humus layer. *Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde*, 151(5), 331–340. <https://doi.org/10.1002/jpln.19881510512>
- Köhler, T., Stingl, U., Meuser, K., & Brune, A. (2008). Novel lineages of *Planctomycetes* densely colonize the alkaline gut of soil-feeding termites (*Cubitermes* spp.). *Environmental Microbiology*, 10(5), 1260–1270. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01540.x>
- Kolkas, H., Burlat, V., & Jamet, E. (2023). Immunochemical Identification of the Main Cell Wall Polysaccharides of the Early Land Plant *Marchantia polymorpha*. *Cells*, 12.
<https://doi.org/10.3390/cells12141833>
- Kopecky, J., Kyselkova, M., Omelka, M., Cermak, L., Novotna, J., Grundmann, G. L., Moënne-Loccoz, Y., & Sagova-Mareckova, M. (2011). Actinobacterial community dominated by a distinct clade in acidic soil of a waterlogged deciduous forest. *FEMS Microbiology Ecology*, 78(2), 386–394.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01173.x>
- Kranner, I., Cram, W. J., Zorn, M., Wornik, S., Yoshimura, I., Stabentheiner, E., & Pfeifhofer, H. W. (2005). Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 3141–3146.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0407716102>
- Kuhn, M. (2007). *caret: Classification and Regression Training* (p. 6.0-94) [Dataset].
<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.caret>
- Kulichevskaya, I. S., Ivanova, A. A., Detkova, E. N., Rijpstra, W. I. C., Sinninghe Damsté, J. S., & Dedys, S. N. (2017). *Tundrisphaera lichenicola* gen. Nov., sp. Nov., a psychrotolerant representative of the family Isosphaeraceae from lichen-dominated tundra soils. *International Journal of*

Systematic and Evolutionary Microbiology, 67(9), 3583–3589.

<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002172>

Kumar, K., Mella-Herrera, R. A., & Golden, J. W. (2010). Cyanobacterial Heterocysts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(4), a000315–a000315.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000315>

Kunz, C. F., De Vries, S., & De Vries, J. (2024). Plant terrestrialization: An environmental pull on the evolution of multi-sourced streptophyte phenolics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 379(1914), 20230358. <https://doi.org/10.1098/rstb.2023.0358>

Larsbrink, J., & McKee, L. S. (2020). Chapter Two - Bacteroidetes bacteria in the soil: Glycan acquisition, enzyme secretion, and gliding motility. Em G. M. Gadd & S. Sariaslani (Orgs.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 110, p. 63–98). Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.11.001>

Le Gall, S., Bérard, A., Page, D., Lanoe, L., Bertin, N., & Doussan, C. (2021). Increased exopolysaccharide production and microbial activity affect soil water retention and field performance of tomato under water deficit. *Rhizosphere*, 19, 100408.

<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100408>

Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F., & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 1–46. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>

Lemes-Da-Silva, N. M., Branco, L. H. Z., & Necchi-Júnior, O. (2010). Corticolous green algae from tropical forest remnants in the northwest region of São Paulo State, Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, 33, 215–226. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042010000200003>

Lemes-da-Silva, N. M., Garey, M. V., & Branco, L. H. Z. (2017). Floristic diversity, richness and distribution of Trentepohliales (Chlorophyta) in Neotropical ecosystems. *Brazilian Journal of Botany*, 40(4), 883–896. <https://doi.org/10.1007/s40415-017-0390-3>

- Li, Y., Xu, L., Gong, H., Ding, B., Dong, M., & Li, Y. (2017). A Microbial Exopolysaccharide Produced by *Sphingomonas* Species for Enhanced Heavy Oil Recovery at High Temperature and High Salinity. *Energy & Fuels*, 31(4), 3960–3969. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b02923>
- Ligrone, R., Duckett, J. G., & Renzaglia, K. S. (2012). The origin of the sporophyte shoot in land plants: A bryological perspective. *Annals of Botany*, 110(5), 935–941. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs176>
- López-Bautista, J. M., Rindi, F., & Guiry, M. D. (2006). Molecular systematics of the subaerial green algal order Trentepohliales: An assessment based on morphological and molecular data. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7), 1709–1715. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63990-0>
- Lucas, M., Schlüter, S., Vogel, H., & Vetterlein, D. (2019). Soil structure formation along an agricultural chronosequence. *Geoderma*. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2019.04.041>
- Lüftenegger, G., Foissner, W., & Adam, H. (1985). r- and K-selection in soil ciliates: A field and experimental approach. *Oecologia*, 66(4), 574–579. <https://doi.org/10.1007/BF00379352>
- Magain, N., Tniong, C., Goward, T., Niu, D., Goffinet, B., Sérusiaux, E., Vitikainen, O., Lutzoni, F., & Miadlikowska, J. (2018). Species delimitation at a global scale reveals high species richness with complex biogeography and patterns of symbiont association in *Peltigera* section *Peltigera* (lichenized Ascomycota: Lecanoromycetes). *TAXON*, 67(5), 836–870. <https://doi.org/10.12705/675.3>
- Martin, F., Uroz, S., & Barker, D. (2017). Ancestral alliances: Plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria. *Science*, 356. <https://doi.org/10.1126/science.aad4501>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martin Morgan, V. O. (2017). *SummarizedExperiment* [Software]. Bioconductor. <https://doi.org/10.18129/B9.BIOC.SUMMARIZEDEXPERIMENT>

- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Meneghini, A. K., Moretto, C., Castellane, T. C. L., & Carareto Alves, L. M. (2017). Production, Characterization and Bioemulsifying Activity of an Exopolysaccharide Produced by *Sphingomonas* sp. Isolated from Freshwater. *Journal of Polymers and the Environment*, 25(4), 1080–1086. <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0878-0>
- Miadlikowska, J., Kauff, F., Högnabba, F., Oliver, J. C., Molnár, K., Fraker, E., Gaya, E., Hafellner, J., Hofstetter, V., Gueidan, C., Otálora, M. A. G., Hodkinson, B., Kukwa, M., Lücking, R., Björk, C., Sipman, H. J. M., Burgaz, A. R., Thell, A., Passo, A., ... Stenroos, S. (2014). A multigene phylogenetic synthesis for the class Lecanoromycetes (Ascomycota): 1307 fungi representing 1139 infrageneric taxa, 317 genera and 66 families. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 79, 132–168. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.04.003>
- Mikkelsen, M. D., Harholt, J., Ulvskov, P., Johansen, I. E., Fangel, J. U., Doblin, M. S., Bacic, A., & Willats, W. G. T. (2014). Evidence for land plant cell wall biosynthetic mechanisms in charophyte green algae. *Annals of Botany*, 114(6), 1217–1236.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcu171>
- Mikkelsen, M. D., Harholt, J., Westereng, B., Domozych, D., Fry, S. C., Johansen, I. E., Fangel, J. U., Łężyk, M., Feng, T., Nancke, L., Mikkelsen, J. D., Willats, W. G. T., & Ulvskov, P. (2021). Ancient origin of fucosylated xyloglucan in charophycean green algae. *Communications Biology*, 4(1), 754. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02277-w>
- Mishler, B., & Churchill, S. (1985). TRANSITION TO A LAND FLORA: PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF THE GREEN ALGAE AND BRYOPHYTES. *Cladistics*, 1. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.1985.tb00431.x>

- Mitchell, R., Cuadros, J., Duckett, J., Pressel, S., Mavris, C., Sykes, D., Najorka, J., Edgecombe, G., & Kenrick, P. (2016). Mineral weathering and soil development in the earliest land plant ecosystems. *Geology*, 44, 1007–1010. <https://doi.org/10.1130/G38449.1>
- Mitchell, R. L., Strullu-Derrien, C., & Kenrick, P. (2019). Biologically mediated weathering in modern cryptogamic ground covers and the early Paleozoic fossil record. *Journal of the Geological Society*, 176(3), 430–439. <https://doi.org/10.1144/jgs2018-191>
- Monard, C., Gantner, S., Bertilsson, S., Hallin, S., & Stenlid, J. (2016). Habitat generalists and specialists in microbial communities across a terrestrial-freshwater gradient. *Scientific Reports*, 6(1), 37719. <https://doi.org/10.1038/srep37719>
- Moreira, G. A. M., Pires, E. C. C., Barreto, C. C., & Vale, H. M. M. do. (2020). Total fungi and yeast distribution in soils over native and modified vegetation in central Brazil. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, 44. <https://doi.org/10.36783/18069657rbcs20200097>
- Moreira, G. A. M., & Vale, H. M. M. do. (2018). Occurrence of Yeast Species in Soils under Native and Modified Vegetation in an Iron Mining Area. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, 42, e0170375. <https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20170375>
- Moreira, G. A. M., & Vale, H. M. M. do. (2020). Soil Yeast Communities in Revegetated Post-Mining and Adjacent Native Areas in Central Brazil. *Microorganisms*, 8(8), 1116. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081116>
- Morris, J. L., Puttick, M. N., Clark, J. W., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C. H., Yang, Z., Schneider, H., & Donoghue, P. C. J. (2018). The timescale of early land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(10), 201719588–201719588. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719588115>
- Motte, H., Parizot, B., Fang, T., & Beeckman, T. (2020). The evolutionary trajectory of root stem cells. *Current Opinion in Plant Biology*, 53, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.09.005>
- Muggia, L., Leavitt, S., & Barreno, E. (2018). The hidden diversity of lichenised Trebouxioophyceae (Chlorophyta). *Phycologia*, 57(5), 503–524. <https://doi.org/10.2216/17-134.1>

- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 68.
https://doi.org/10.1111/ejss.4_12398
- Nevo, E. (2011). Evolution Under Environmental Stress at Macro- and Microscales. *Genome Biology and Evolution*, 3, 1039–1052. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr052>
- Nishiyama, T., Sakayama, H., Vries, J. de, Buschmann, H., Saint-Marcoux, D., Ullrich, K. K., Haas, F. B., Vanderstraeten, L., Becker, D., Lang, D., Vosolsobě, S., Rombauts, S., Wilhelmsson, P. K. I., Janitza, P., Kern, R., Heyl, A., Rümpler, F., Villalobos, L. I. A. C., Clay, J. M., ... Rensing, S. A. (2018). The Chara Genome: Secondary Complexity and Implications for Plant Terrestrialization. *Cell*, 174(2), 448–464.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.033>
- Normand, P., & Fernandez, M. P. (2008). Evolution and Diversity of Frankia. Em K. Pawlowski (Org.), *Prokaryotic Symbionts in Plants* (Vol. 8, p. 103–125). Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/7171_2008_121
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., ... Weedon, J. (2001). *vegan: Community Ecology Package* (p. 2.6-8) [Dataset].
<https://doi.org/10.32614/CRAN.package.vegan>
- Oliver, M. J., Tuba, Z., & Mishler, B. D. (2000). The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology*, 151(1), 85–100. <https://doi.org/10.1023/A:1026550808557>
- Palarea-Albaladejo, J., & Martín-Fernández, J. A. (2015). zCompositions—R package for multivariate imputation of left-censored data under a compositional approach. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 143, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2015.02.019>
- Panteris, E., Kouskouveli, A., Pappas, D., & Adamakis, I.-D. S. (2021). Cytokinesis in fra2 Arabidopsis thaliana p60-Katanin Mutant: Defects in Cell Plate/Daughter Wall Formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1405. <https://doi.org/10.3390/ijms22031405>

- Paradis, E., Blomberg, S., Bolker, B., Brown, J., Claramunt, S., Claude, J., Cuong, H. S., Desper, R., Didier, G., Durand, B., Dutheil, J., Ewing, R., Gascuel, O., Guillaume, T., Heibl, C., Ives, A., Jones, B., Krah, F., Lawson, D., ... De Vienne, D. (2002). *ape: Analyses of Phylogenetics and Evolution* (p. 5.8) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.ape>
- Parnell, J., & Foster, S. (2012). Ordovician ash geochemistry and the establishment of land plants. *Geochemical Transactions*, 13, 7–7. <https://doi.org/10.1186/1467-4866-13-7>
- Paulson, J. N., Stine, O. C., Bravo, H. C., & Pop, M. (2013). Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nature Methods*, 10(12), 1200–1202. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2658>
- Permann, C., Herburger, K., Felhofer, M., Gierlinger, N., Lewis, L. A., & Holzinger, A. (2021). Induction of Conjugation and Zygospore Cell Wall Characteristics in the Alpine *Spirogyra mirabilis* (Zygnematophyceae, Charophyta): Advantage under Climate Change Scenarios? *Plants*, 10(8), 1740. <https://doi.org/10.3390/plants10081740>
- Permann, C., Pichrtová, M., Šoljaková, T., Herburger, K., Jouneau, P., Uwizeye, C., Falconet, D., Marechal, E., & Holzinger, A. (2023). 3D-reconstructions of zygospores in *Zygnema vaginatum* (Charophyta) reveal details of cell wall formation, suggesting adaptations to extreme habitats. *Physiologia Plantarum*, 175(4), e13988. <https://doi.org/10.1111/ppl.13988>
- Pfeifer, L., Utermöhlen, J., Happ, K., Permann, C., Holzinger, A., Von Schwartzberg, K., & Classen, B. (2022). Search for evolutionary roots of land plant arabinogalactan-proteins in charophytes: Presence of a rhamnogalactan-protein in *Spirogyra pratensis* (Zygnematophyceae). *The Plant Journal*, 109(3), 568–584. <https://doi.org/10.1111/tpj.15577>
- Pichrtová, M., Arc, E., Stöggel, W., Kranner, I., Hájek, T., Hackl, H., & Holzinger, A. (2016). Formation of lipid bodies and changes in fatty acid composition upon pre-akinete formation in Arctic and Antarctic *Zygnema* (Zygnematophyceae, Streptophyta) strains. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(7), fiw096. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw096>

- Pichrtová, M., Hájek, T., & Elster, J. (2014). Osmotic stress and recovery in field populations of *Zygnema* sp. (*Zygnematophyceae* , *Streptophyta*) on Svalbard (High Arctic) subjected to natural desiccation. *FEMS Microbiology Ecology*, 89(2), 270–280.
<https://doi.org/10.1111/1574-6941.12288>
- Pichrtová, M., Hájek, T., & Elster, J. (2016). Annual development of mat-forming conjugating green algae *Zygnema* spp. in hydro-terrestrial habitats in the Arctic. *Polar Biology*, 39(9), 1653–1662. <https://doi.org/10.1007/s00300-016-1889-y>
- Pichrtová, M., Holzinger, A., Kulichová, J., Ryšánek, D., Šoljaková, T., Trumhová, K., & Nemcova, Y. (2018). Molecular and morphological diversity of *Zygnema* and *Zygnemopsis* (*Zygnematophyceae*, *Streptophyta*) from Svalbard (High Arctic). *European Journal of Phycology*, 53(4), 492–508. <https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1476920>
- Pichrtová, M., Kulichová, J., & Holzinger, A. (2014). Nitrogen Limitation and Slow Drying Induce Desiccation Tolerance in Conjugating Green Algae (*Zygnematophyceae*, *Streptophyta*) from Polar Habitats. *PLoS ONE*, 9(11), e113137. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113137>
- Provorov, N., Borisov, A., & Tikhonovich, I. (2002). Developmental genetics and evolution of symbiotic structures in nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza. *Journal of theoretical biology*, 214 2, 215–232. <https://doi.org/10.1006/JTBI.2001.2453>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rachmania, M. K., Ningsih, F., Sari, D. C. A. F., Eshananda, Y., Sakai, Y., Yabe, S., Yokota, A., & Sjamsuridzal, W. (2022). Identification and screening of enzymatic abilities of Ktedonobacteria from forest soil of Cisolok Geothermal Area, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(9). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230935>

- Raven, J., & Edwards, D. (2001). Roots: Evolutionary origins and biogeochemical significance. *Journal of experimental botany*, 52 Spec Issue, 381–401.
https://doi.org/10.1093/JEXBOT/52.SUPPL_1.381
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., & Blankenship, R. E. (2004). The Natural History of Nitrogen Fixation. *Molecular Biology and Evolution*, 21(3), 541–554.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msh047>
- Rey-Boissezon, A., & Auderset Joye, D. (2015). Habitat requirements of charophytes—Evidence of species discrimination through distribution analysis. *Aquatic Botany*, 120, 84–91.
<https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2014.05.007>
- Rillig, M. C., Muller, L. A., & Lehmann, A. (2017). Soil aggregates as massively concurrent evolutionary incubators. *ISME Journal*, 11(9), 1943–1948. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.56>
- Rindi, F., Guiry, M. D., & López-Bautista, J. M. (2008). DISTRIBUTION, MORPHOLOGY, AND PHYLOGENY OF *KLEBSORMIDIUM* (KLEBSORMIDIALES, CHAROPHYCEAE) IN URBAN ENVIRONMENTS IN EUROPE¹. *Journal of Phycology*, 44(6), 1529–1540.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00593.x>
- Rippin, M., Lange, S., Sausen, N., & Becker, B. (2018). Biodiversity of biological soil crusts from the Polar Regions revealed by metabarcoding. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(4).
<https://doi.org/10.1093/FEMSEC/FIY036>
- Romanov, R. E., Mallaliev, M. M., Barinova, S., Nikulin, V. Yu., & Gontcharov, A. A. (2023). The Charophytes (Charophyceae, Characeae) from Dagestan Aquatic Habitats, North Caucasus: Biogeographical and Barcoding Perspectives. *Environments*, 10(9), 153.
<https://doi.org/10.3390/environments10090153>
- Rubinstein, C. V., Gerrienne, P., de la Puente, G. S., Astini, R. A., & Steemans, P. (2010). Early Middle Ordovician evidence for land plants in Argentina (eastern Gondwana). *New Phytologist*, 188(2), 365–369. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03433.x>

- Sayers, E. W., Beck, J., Bolton, E. E., Bourexis, D., Brister, J. R., Canese, K., Comeau, D. C., Funk, K., Kim, S., Klimke, W., Marchler-Bauer, A., Landrum, M., Lathrop, S., Lu, Z., Madden, T. L., O’Leary, N., Phan, L., Rangwala, S. H., Schneider, V. A., ... Sherry, S. T. (2021). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D10–D17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa892>
- Schulz, S. ;, Brankatschk, R. ;, Dümig, A. ;, Kögel-Knabner, I. ;, Schlöter, M. ;, Zeyer, J., Schulz, S., Brankatschk, R., Umig, A. D. ", Kögel-Knabner, I., Schlöter, M., & Zeyer, J. (2013). The role of microorganisms at different stages of ecosystem development for soil formation Climate of the Past Geoscientific Instrumentation Methods and Data Systems The role of microorganisms at different stages of ecosystem development for soil formation. *Biogeosciences*, 10, 3983–3996. <https://doi.org/10.3929/ethz-b-000070776>
- Schwager, M., Johst, K., & Jeltsch, F. (2006). Does Red Noise Increase or Decrease Extinction Risk? Single Extreme Events versus Series of Unfavorable Conditions. *The American Naturalist*, 167(6), 879–888. <https://doi.org/10.1086/503609>
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., & Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biology*, 12(6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>
- Sellstedt, A., & Richau, K. H. (2013). Aspects of nitrogen-fixing *Actinobacteria* , in particular free-living and symbiotic *Frankia*. *FEMS Microbiology Letters*, 342(2), 179–186. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12116>
- Servais, T., Cascales-Miñana, B., Cleal, C., Gerrienne, P., Harper, D., & Neumann, M. (2019). Revisiting the Great Ordovician Diversification of land plants: Recent data and perspectives. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. <https://doi.org/10.1016/J.PALAEO.2019.109280>
- Shade, A., Peter, H., Allison, S. D., Baho, D. L., Berga, M., Bürgmann, H., Huber, D. H., Langenheder, S., Lennon, J. T., Martiny, J. B. H., Matulich, K. L., Schmidt, T. M., & Handelsman, J. (2012).

- Fundamentals of Microbial Community Resistance and Resilience. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00417>
- Silva, N. M. L. da [UNESP. (2009). *Algas e cianobactérias aerofíticas de fragmentos de floresta estacional semidecidual no noroeste paulista*. <http://hdl.handle.net/11449/87898>
- Simon, A., Glöckner, G., Felder, M., Melkonian, M., & Becker, B. (2006). EST analysis of the scaly green flagellate *Mesostigma viride* (Streptophyta): Implications for the evolution of green plants (Viridiplantae). *BMC Plant Biology*, 6(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-2>
- Skariah, S., Abdul-Majid, S., Hay, A. G., Acharya, A., Kano, N., Al-Ishaq, R. K., De Figueiredo, P., Han, A., Guzman, A., Dargham, S. R., Sameer, S., Kim, G. E., Khan, S., Pillai, P., & Sultan, A. A. (2023). Soil Properties Correlate with Microbial Community Structure in Qatari Arid Soils. *Microbiology Spectrum*, 11(2), e03462-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03462-22>
- Smith, L. G. (1999). Divide and conquer: Cytokinesis in plant cells. *Current opinion in plant biology*, 2, 447–453. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)00022-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00022-9)
- Sørensen, I., Rose, J. K. C., Doyle, J. J., Domozych, D. S., & Willats, W. G. T. (2012). The Charophycean green algae as model systems to study plant cell walls and other evolutionary adaptations that gave rise to land plants. *Plant Signaling & Behavior*, 7(1), 1–3. <https://doi.org/10.4161/psb.7.1.18574>
- Strother, P. K., Al-Hajri, S., & Traverse, A. (1996). New evidence for land plants from the lower Middle Ordovician of Saudi Arabia. *Geology*, 24(1), 55–58. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1996\)024<0055:NEFLPF>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1996)024<0055:NEFLPF>2.3.CO;2)
- Terlova, E. F., Holzinger, A., & Lewis, L. (2021). Terrestrial Green Algae Show Higher Tolerance to Dehydration than Do Their Aquatic Sister-Species. *Microbial Ecology*, 82, 770–782. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01679-3>
- Torchiano, M. (2013). *effsize: Efficient Effect Size Computation* (p. 0.8.1) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.effsize>

- Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3), 240–245. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00324-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7)
- Tralli, M. P. (2015). *Diversidade de algas verdes em crostas biológicas de solos do cerrado*.
- Tsimring, L. S. (2014). Noise in biology. *Reports on Progress in Physics*, 77(2), 026601. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/77/2/026601>
- Van Den Boogaart, K. G., & Tolosana-Delgado, R. (2008). “compositions”: A unified R package to analyze compositional data. *Computers & Geosciences*, 34(4), 320–338. <https://doi.org/10.1016/j.cageo.2006.11.017>
- Verma, S., Sahu, P., Kumar, K., Pal, G., Gond, S., Kharwar, R. N., & White, J. (2021). Endophyte roles in nutrient acquisition, root system architecture development and oxidative stress tolerance. *Journal of Applied Microbiology*, 131. <https://doi.org/10.1111/jam.15111>
- Vitorino, I., Santos, J. D. N., Godinho, O., Vicente, F., Vasconcelos, V., & Lage, O. M. (2021). Novel and Conventional Isolation Techniques to Obtain Planctomycetes from Marine Environments. *Microorganisms*, 9(10), 2078. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102078>
- Wagner, M., & Horn, M. (2006). The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(3), 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.05.005>
- Walker, B. H. (1992). Biodiversity and Ecological Redundancy. *Conservation Biology*, 6(1), 18–23. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1992.610018.x>
- Wang, J., Jenkins, C., Webb, R. I., & Fuerst, J. A. (2002). Isolation of *Gemmata* -Like and *Isosphaera* -Like Planctomycete Bacteria from Soil and Freshwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 417–422. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.417-422.2002>
- Wang, S., Li, L., Li, H., Sahu, S. K., Wang, H., Xu, Y., Xian, W., Song, B., Liang, H., Cheng, S., Chang, Y., Song, Y., Çebi, Z., Wittek, S., Reder, T., Peterson, M., Yang, H., Wang, J., Melkonian, B., ... Liu,

- X. (2019). Genomes of early-diverging streptophyte algae shed light on plant terrestrialization. *Nature Plants*, 6(2), 95–106. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0560-3>
- Ward, N., Staley, J. T., Fuerst, J. A., Giovannoni, S., Schlesner, H., & Stackebrandt, E. (2006). The Order Planctomycetales, Including the Genera Planctomyces, Pirellula, Gemmata and Isosphaera and the Candidatus Genera Brocadia, Kuenenia and Scalindua. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (p. 757–793). Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8_31
- Week, B., Nuismer, S. L., Harmon, L. J., & Krone, S. M. (2021). A white noise approach to evolutionary ecology. *Journal of Theoretical Biology*, 521, 110660. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2021.110660>
- Wei, T., & Simko, V. (2010). *corrplot: Visualization of a Correlation Matrix* (p. 0.95) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.corrplot>
- Wellman, C. H., Osterloff, P. L., & Mohiuddin, U. (2003). Fragments of the earliest land plants. *Nature*, 425(6955), 282–285. <https://doi.org/10.1038/nature01884>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T. L., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., Dunnington, D., & Van Den Brand, T. (2007). *ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics* (p. 3.5.1) [Dataset]. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.ggplot2>
- Wieczynski, D. J., Turner, P. E., & Vasseur, D. A. (2018). Temporally Autocorrelated Environmental Fluctuations Inhibit the Evolution of Stress Tolerance. *The American Naturalist*, 191(6), E195–E207. <https://doi.org/10.1086/697200>

- Williams, C. M., Ragland, G. J., Betini, G., Buckley, L. B., Cheviron, Z. A., Donohue, K., Hereford, J., Humphries, M. M., Lisovski, S., Marshall, K. E., Schmidt, P. S., Sheldon, K. S., Varpe, Ø., & Visser, M. E. (2017). Understanding Evolutionary Impacts of Seasonality: An Introduction to the Symposium. *Integrative and Comparative Biology*, 57(5), 921–933.
<https://doi.org/10.1093/icb/icx122>
- Willis, K. J., & McElwain, J. C. (2014). 2002, The Evolution of Plants. *New York, Oxford University Press*, 398–398.
- Xie, G., Bruce, D. C., Challacombe, J. F., Chertkov, O., Detter, J. C., Gilna, P., Han, C. S., Lucas, S., Misra, M., Myers, G. L., Richardson, P., Tapia, R., Thayer, N., Thompson, L. S., Brettin, T. S., Henrissat, B., Wilson, D. B., & McBride, M. J. (2007). Genome Sequence of the Cellulolytic Gliding Bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11), 3536–3546. <https://doi.org/10.1128/AEM.00225-07>
- Yabe, S., Sakai, Y., Abe, K., & Yokota, A. (2017). Diversity of *Ktedonobacteria* with Actinomycetes-Like Morphology in Terrestrial Environments. *Microbes and Environments*, 32(1), 61–70.
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME16144>
- Yachi, S., & Loreau, M. (1999). Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4), 1463–1468. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1463>
- Yang, X., Shimizu, Y., Steiner, J. R., & Clardy, J. (1993). Nostoclide I and II, extracellular metabolites from a symbiotic cyanobacterium, *Nostoc* sp., from the lichen *Peltigera canina*. *Tetrahedron Letters*, 34(5), 761–764. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(93\)89005-B](https://doi.org/10.1016/0040-4039(93)89005-B)
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Priesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., & Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D643–D648.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>

Yousuf, B., Kumar, R., Mishra, A., & Jha, B. (2014). Differential distribution and abundance of diazotrophic bacterial communities across different soil niches using a gene-targeted clone library approach. *FEMS Microbiology Letters*, 360(2), 117–125.
<https://doi.org/10.1111/1574-6968.12593>

ANEXO A - PRODUÇÃO ACADÊMICA

Nesta seção são apresentados a produção acadêmica do autor durante o período do doutorado (2019-2024).

Artigos publicados como primeiro autor:

Souza, J. S. M., **Lisboa, A. B. P.**, Santos, T. M., Andrade, M. V. S., Neves, V. B. S., Teles-Souza, J., ... & Del-Bem, L. E. (2020). The evolution of ADAM gene family in eukaryotes. *Genomics*, 112(5), 3108-3116.

Lisboa, A. B., Alcantara-Neves, N. M., Aguiar, E. R., Pinheiro, C. S., Pacheco, L. G., & da Silva, E. S. (2024). Structural Insights on Cross-Reactivity of Mite Allergens with Helminth Proteins. *Allergies*, 4(2), 64-79.

Santos, S. P., **Lisboa, A. B.**, Silva, F. S., Tiwari, S., Azevedo, V., Cruz, Á. A., ... & Pacheco, L. G. (2022). Rationally designed hypoallergenic mutant variants of the house dust mite allergen Der p 21. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1866(4), 130096.

Santos, T. M., **Lisboa, A. B.**, Rodrigues, W., Gomes, H., Abrahão, J., & Del-Bem, L. E. (2023). Human variation in the protein receptor ACE2 affects its binding affinity to SARS-CoV-2 in a variant-dependent manner. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(7), 2947-2955.

Demais artigos:

Rodrigues, W. F. C., **Lisboa, A. B. P.**, Lima, J. E., Ricachenevsky, F. K., & Del-Bem, L. E. (2023). Ferrous iron uptake via IRT1/ZIP evolved at least twice in green plants. *New Phytologist*, 237(6), 1951-1961.

ANEXO B – REFERÊNCIA ÀS IMAGENS UTILIZADAS

Taxa	URL	Owner
<i>Roya sp.</i>	https://www.flickr.com/photos/microagua/4283218332/in/photostream/	PROYECTO AGUA
<i>Klebsormidium sp.</i>	https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Klebsormidium_bilatum_Belgium_%2814759117646%29.jpg	Katz Lab
<i>Netrium digitus</i>	https://www.flickr.com/photos/microagua/3710631596	PROYECTO AGUA
<i>Cosmarium sp.</i>	https://pt.wikipedia.org/wiki/Cosmarium#/media/Ficheiro:Cosmarium_sp..JPG	Sourav Bhowmick
<i>Closterium sp.</i>	https://en.wikipedia.org/wiki/Closterium#/media/File:RIMG_4595p.jpg	Giuseppe Vago
<i>Vischeria sp.</i>	https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=887-2	N. Rybalka
<i>Microchloropsis gaditana</i>	https://en.wikipedia.org/wiki/Eustigmatophyte#/media/File:CSIRO_ScienceImage_10697_Microalgae.jpg	CSIRO
<i>Paradoxia multiseta</i>	https://www.algaebase.org/search/images/detail/?img_id=10859	Robin Matthews
<i>Coccomyxa sp.</i>	https://en.wikipedia.org/wiki/Coccomyxa#/media/File:Coccomyxa_polymorpha.png	Tatyana Darienko, Lydia Gustavs, Anja Eggert, Wiebke Wolf, Thomas Pröschold

<i>Elliptochloris bilobata</i>	Patova et al 2023 5d Elliptochloris bilobata - Elliptochloris - Wikipedia	Elena Patova, Irina Novakovskaya, Evgeniy Gusev & Nikita Martynenko
<i>Elliptochloris reniformis</i>	https://ib.komisc.ru/sykoa/image/136/	Ettl et Gärtner
<i>Xylochloris</i>	https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=2382	T. Darienko:
<i>Dictyochloropsis</i>	https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=2098	P. Skaloud
<i>Trebouxia</i>	https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=2103	T. Darienko:
<i>Myrmecia</i>	https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=8.82	T. Darienko
<i>Calothrix</i>	https://atlasofcyanobacteria.com/browse.php?path=Cyanobacteria/Nostocales/Rivulariaceae/Calothrix	Atlas of cyanobacteria
<i>Scytonema</i>	https://atlasofcyanobacteria.com/browse.php?path=Cyanobacteria/Nostocales/Scytonemataceae/Scytonema	Atlas of cyanobacteria
<i>Nostoc</i>	atlasofcyanobacteria.com/browse.php?path=../Cyanobacteria/Nostocales/Nostocaceae/Nostoc	Atlas of cyanobacteria