INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)
BIOTECNOLOGIA

DIVERSIDADE MICROBIANA ENDOFÍTICA EM SEMENTES DO GÊNERO *Zea:* ANÁLISE COMPARATIVA DE MILHO-PIPOCA CRIOULO E DO PARENTE SILVESTRE DA ESPÉCIE COM UMA VARIEDADE TRANSGÊNICA

THAYNARA CRISTINA DE CARVALHO

Foz do Iguaçu
2025

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)
BIOTECNOLOGIA

DIVERSIDADE MICROBIANA ENDOFÍTICA EM SEMENTES DO GÊNERO *Zea:* ANÁLISE COMPARATIVA DE MILHO-PIPOCA CRIOULO E DO PARENTE SILVESTRE DA ESPÉCIE COM UMA VARIEDADE TRANSGÊNICA

THAYNARA CRISTINA DE CARVALHO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Samuel Henrique Kamphorst

Foz do Iguaçu
2025

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

THAYNARA CRISTINA DE CARVALHO

DIVERSIDADE MICROBIANA ENDOFÍTICA EM SEMENTES DO GÊNERO *Zea:* ANÁLISE COMPARATIVA DE MILHO-PIPOCA CRIOULO E DO PARENTE SILVESTRE DA ESPÉCIE COM UMA VARIEDADE TRANSGÊNICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

_____
Orientador: Prof. Dr. Samuel Henrique Kamphorst
UNILA

_____
Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos
UNILA

_____
Dr. Valter Jário de Lima
UVA

_____
Me Sarah Henaut Jacobs
UENF

Foz do Iguaçu, 05 de fevereiro de 2025.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

AGRADECIMENTOS

É costumeiro iniciar agradecimentos a divindades pela dádiva da perseverança que confiaram a nós, seres humanos. No entanto, escolho começar de forma heteróclita ao saudar pessoas que não conheci. Aclamar e agradecer a existência de trabalhos antecessores aos meus de grandes cientistas que fizeram de sua curiosidade paixões atemporais e que transcendem gerações e se instalam em alguns atípicos corações.

Particularmente, acredito que não há espaço para certezas imutáveis na natureza e tampouco devemos tê-las em nossas ciências. Assim como cada célula de nosso corpo passa por mudanças e necessita de bases comuns para se desenvolver, o conhecimento acerca do mundo que nos rodeia é construído a pequenos passos iniciados por gigantes ancestrais, como Charles Darwin, Gregor Mendel e Nikolai Vavilov, cujos ombros nos servem de alicerces para que possamos enxergar a distâncias maiores.

Também há necessidade de reconhecer o trabalho de figuras históricas sem nome, homens e mulheres que possibilitaram a sobrevivência da humanidade, com seu duro trabalho de domesticação e construção da agricultura e demais modelos de cultivo, como também de todos os agricultores enamorados de suas sementes que contribuem para manter a existência da biodiversidade de nosso planeta.

Mas, como não sou de toda inovadora, agracio a perseverança e fé de meus pais, tios, avós e demais familiares, assim como meus queridos amigos. Ao meu orientador Prof. Dr. Samuel Henrique Kamphorst e companheiros de trabalho por todo o apoio e paciência para com minha pessoa.

À Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), expresso minha profunda gratidão pela oportunidade de receber uma educação pública e de altíssima qualidade e para com a formação de laços que jamais desatarei.

À bolsa PAD-TCC de apoio financeiro a estudantes para realização do trabalho de conclusão de curso, por tornar a viagem a Anchieta possível.

Meus sinceros agradecimentos também a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), a Sarah Jacobs, Rafael Ribeiro e ao Prof. Thiago Venâncio, pela valiosa colaboração nas análises de dados.

Aos agricultores de Anchieta, que são os mais ilustres guardiões de uma biodiversidade singular, e sem a qual esse trabalho não teria sentido, sou

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

imensamente grata por terem tornado possível esta pesquisa. A generosidade em compartilhar seu saber, paixão e o compromisso com a preservação dos milhos crioulos e de sua cultura tão rica e deslumbrante.

Talvez, nem todos os meus entes queridos e apoiadores desse trabalho sigam por caminhos científicos, mas aqueles que insistirem em me acompanhar física ou emocionalmente serão sempre motivo de minha tenacidade e teimosia.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

Quem quer passar além do Bojador
tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo
deu, mas nele é que espelhou o céu
Fernando Pessoa

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

RESUMO

A microbiota endofítica desempenha um papel fundamental na adaptação das plantas a diferentes ambientes, influenciando sua resistência a estresses bióticos e abióticos. Neste estudo, investigou-se a diversidade e composição da microbiota endofítica radicular em diferentes variedades de milho, incluindo o teosinto (*Zea luxurians*), variedades crioulas de milho-pipoca (Roxa, Colorida e Vermelha) e um híbrido transgênico SX 3197 TR, com o objetivo de avaliar o impacto do processo de domesticação e do manejo agrícola sobre a comunidade microbiana. A hipótese testada foi de que a domesticação, o melhoramento genético e o cultivo em ambientes com diferentes níveis de insumos influenciam diretamente a diversidade da microbiota endofítica. As sementes foram coletadas em Anchieta (SC), desinfestadas e germinadas em condições controladas. O DNA microbiano das raízes foi sequenciado (gene 16S rRNA) e analisado com os pacotes DADA2, Phyloseq e Vegan. Os resultados mostraram que o teosinto, parente silvestre do milho, teve a microbiota mais diversa, com 339 Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), incluindo bactérias ligadas à resistência a estresses. As variedades crioulas apresentaram menos OTUs (Vermelha: 172, Roxa: 77, Colorida: 22), mas mantiveram microrganismos adaptativos e potencialmente benéficos. O milho híbrido transgênico teve 237 OTUs, mas concentradas em menos grupos microbianos, possivelmente devido à sua base genética mais restrita e ao uso intensivo de insumos no cultivo. A ausência de OTUs em comum entre os genótipos destaca a influência do tipo de milho, do manejo e do ambiente na composição microbiana. Esses achados reforçam a importância de conservar a diversidade genética do milho e de seu microbioma, especialmente em variedades menos domesticadas, que podem servir de fonte para o desenvolvimento de bioinsumos e práticas agrícolas mais sustentáveis. Pesquisas futuras devem explorar o potencial funcional dessas comunidades microbianas.

Palavras-chave: biodiversidade, domesticação, melhoramento genético, variedades crioulas, milho

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

RESUMEN

La microbiota endofítica desempeña un papel fundamental en la adaptación de las plantas a diferentes ambientes, influyendo en su resistencia a estreses bióticos y abióticos. En este estudio se investigó la diversidad y composición de la microbiota endofítica radicular en distintas variedades de maíz, incluyendo el teocintle (*Zea luxurians*), variedades criollas de maíz-palomero (Roxa, Colorida y Vermelha) y un híbrido transgénico (SX 3197 TR), con el objetivo de evaluar el impacto del proceso de domesticación y del manejo agrícola sobre la comunidad microbiana. La hipótesis evaluada fue que la domesticación, el mejoramiento genético y el cultivo en ambientes con distintos niveles de insumos influyen directamente en la diversidad de la microbiota endofítica. Las semillas fueron recolectadas en Anchieta (SC), desinfectadas y germinadas en condiciones controladas. El ADN microbiano de las raíces fue secuenciado (gen 16S rRNA) y analizado con los paquetes DADA2, Phyloseq y Vegan. Los resultados mostraron que el teocintle, pariente silvestre del maíz, presentó la microbiota más diversa, con 339 Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs), incluyendo bacterias asociadas a la resistencia a estreses. Las variedades criollas mostraron un menor número de OTUs (Vermelha: 172, Roxa: 77, Colorida: 22), pero conservaron microorganismos adaptativos y potencialmente beneficiosos. El maíz híbrido transgénico presentó 237 OTUs, concentradas en un menor número de grupos microbianos, posiblemente debido a su base genética más restringida y al uso intensivo de insumos en su cultivo. La ausencia de OTUs compartidas entre los genotipos destaca la influencia del tipo de maíz, el manejo y el ambiente en la composición de la comunidad microbiana. Estos hallazgos refuerzan la importancia de conservar la diversidad genética del maíz y su microbioma, especialmente en variedades menos domesticadas, que pueden ser fuentes valiosas de microorganismos beneficiosos para el desarrollo de bioinsumos y prácticas agrícolas más sostenibles. Futuros estudios deben profundizar en el potencial funcional de estas comunidades microbianas.

Palabras clave: biodiversidad, domesticación, mejoramiento genético, razas locales, maiz

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

ABSTRACT

Endophytic microbiota plays a key role in plant adaptation to different environments, influencing their resistance to biotic and abiotic stresses. This study investigated the diversity and composition of root endophytic microbiota in different maize varieties, including teosinte (*Zea luxurians*), creole popcorn varieties (Roxa, Colorida, and Vermelha), and a transgenic hybrid (SX 3197 TR), aiming to assess the impact of domestication and agricultural management on microbial communities. The tested hypothesis was that domestication, genetic improvement, and cultivation under varying input levels directly affect endophytic microbiota diversity. Seeds were collected in Anchieta (SC), surface-sterilized, and germinated under controlled conditions. Root microbial DNA was sequenced (16S rRNA gene) and analyzed using the DADA2, Phyloseq, and Vegan packages.Results showed that teosinte, the wild relative of maize, had the most diverse microbiota, with 339 Operational Taxonomic Units (OTUs), including bacteria associated with stress resistance. The creole varieties showed fewer OTUs (Vermelha: 172, Roxa: 77, Colorida: 22), but maintained adaptive and potentially beneficial microorganisms. The transgenic hybrid maize presented 237 OTUs, but concentrated within fewer microbial groups, possibly due to its narrower genetic base and the high-input cultivation environment. The absence of shared OTUs among genotypes highlights the influence of genotype, management, and environmental conditions on microbial community composition. These findings emphasize the importance of conserving maize genetic and microbial diversity, especially in less domesticated varieties, which may serve as valuable sources of beneficial microorganisms for the development of bioinputs and more sustainable agricultural practices. Future studies should further explore the functional potential of these microbial communities.

Key words: biodiversity, domestication, genetic improvement, landraces, corn

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Comparação morfológica entre teosinto (a) e milho (b).....18
Figura 2 – Comparação conteúdo nutricional teosinto x milho.....19
Figura 3 - The Famine Memorial, Dublin..... 22
Figura 4 - Vassoura de bruxa no cacaueiro.....23
Figura 5 - Localização dos municípios de Anchieta e Guaraciaba no Extremo Oeste de Santa Catarina, Sul do Brasil, conhecidos como microcentro de diversidade de milho.....26
Figura 6 – Variedades tradicionais de milho coletados de Anchieta/SC... 27
Figura 7– Esquema da colonização de endofíticos a partir da rizosfera...29
Figura 8 - Diferentes genótipos de plantas silvestres (a esquerda), selecionados pela domesticação (centro), resultando em cultivares domesticadas (a direita) e seus efeitos na microbiota vegetal.....30
Figura 9 - Sementes de milhos-pipoca crioulos e teosinto coletados em Anchieta e o milho híbrido.....33
Figura 10 - Protocolo de lavagem das sementes, beckers contendo álcool 70%, hipoclorito e água destilada estéril.....34
Figura 11 - Placas de petri com meio ágar: água e as sementes tradicionais..... 35
Figura 12 - Diagrama de Venn representando o número de OTUs exclusivas e compartilhadas entre a microbiota radicular de três variedades crioulas de milho-pipoca (Vermelha, Roxa e Colorida), um parente silvestre da espécie (Teosinto – Zea luxurians) e uma variedade híbrida transgênico (SX 3197 TR).....38
Figura 13 - Histograma com índices de alfa diversidade das variedades crioulas de milho-pipoca (Vermelha, Roxa e Colorida) do parente silvestre da espécie (Teosinto – Zea luxurians) e uma variedade híbrida transgênico (SX 3197 TR)..... 39
Figura 14 - Análise de coordenadas principais (PCoA) demonstrando a beta diversidade da microbiota radicular das variedades crioulas de milho-pipoca (Vermelha, Roxa e Colorida), do parente silvestre da espécie (Teosinto – Zea luxurians) e da variedade híbrida (SX 3197 TR) segundo os valores de dissimilaridade..... 40
Figura 15 - Dendograma e gráfico de barras representando a abundância relativa dos principais filos bacterianos encontrados nos genótipos das variedades crioulas de milho-pipoca (Vermelha, Roxa e Colorida), do parente silvestre da espécie (Teosinto – Zea luxurians) e da variedade híbrida (SX 3197 TR)..... 41
Figura 16 - Abundância relativa das principais classes bacterianas associadas às amostras radiculares das variedades crioulas de milho-pipoca (Vermelha, Roxa e Colorida), do parente silvestre da espécie (Teosinto – Zea luxurians) e da variedade híbrida (SX 3197 TR)..... 42
Figura 17 - Abundância relativa dos 30 principais gêneros bacterianos associados às raízes dos diferentes genótipos milho-pipoca crioula (Vermelha, Roxa e Colorida), do parente silvestre da espécie (Teosinto –

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

Zea luxurians) e da variedade híbrida (SX 3197 TR).....44
Figura 18 - Anotação Funcional de Taxa Procariótica (FAPROTAX) da microbiota radicular de três genótipos de milho-pipoca crioulas de milho-pipoca (Vermelha, Roxa e Colorida), do parente silvestre da espécie (Teosinto – Zea luxurians) e da variedade híbrida (SX 3197 TR)..... 45

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

Sumário

1 INTRODUÇÃO..... 12
2. REFERENCIAL TEÓRICO..... 17
2.1 A DOMESTICAÇÃO VEGETAL: UM PROCESSO HUMANO (IN)CONSCIENTE.. 17
2.2 CULTIVANDO A REVOLUÇÃO: MONOCULTIVOS E SEUS IMPACTOS..... 19
2.3 DIVERGIR PARA SOBREVIVER: A BUSCA POR RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS..... 21
2.4. ANCHIETA E O MICROCENTRO DE DIVERSIDADE DE MILHO.....25
2.5 A MICROBIOTA ENDOFÍTICA E SUAS VANTAGENS..... 28
2.6. ANÁLISE *METABARCODING* DA MICROBIOTA ENDOFÍTICA.....31
3 METODOLOGIA..... 33
3.1 OBTENÇÃO DO GERMOPLASMA VEGETAL..... 33
3.2. DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO DAS SEMENTES..... 34
3.3. EXTRAÇÃO DE DNA DA MICROBIOTA RADICULAR..... 36
3.4. SEQUENCIAMENTO *METABARCODING*..... 37
3.5 PROCESSAMENTO DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO..... 37
4 RESULTADOS..... 39
5 DISCUSSÃO..... 46
5.1 DIVERSIDADE E IMPACTO DA DOMESTICAÇÃO E DO MELHORAMENTO GENÉTICO NA MICROBIOTA ENDOFÍTICA DAS VARIEDADES AVALIADAS.....46
5.2 ABUNDÂNCIA RELATIVA, DIVERSIDADE TAXONÔMICA DO MICROBIOMA ENDOFÍTICO..... 47
5.2.1 - Análise taxonômica: filos bacterianos.....47
5.2.2 - Análise taxonômica: classes bacterianas..... 49
5.2.3 - Análise taxonômica dos principais gêneros bacterianos e anotação funcional diferenciada entre as variedades analisadas.....50
5.3 ANOTAÇÃO FUNCIONAL..... 51
5.4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS..... 53
6 CONCLUSÕES..... 54
REFERÊNCIAS..... 56

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

1 INTRODUÇÃO

A diversidade é inata à natureza. Desde os primórdios, a vida na Terra surge, evolui e, por vezes, desaparece. Muitas espécies que outrora compunham a biodiversidade deste planeta, hoje estão presentes apenas como vestígios históricos do que um dia foram. Essa dinamicidade do ecossistema dá-se pelos fatores ambientais que integram a Teoria da Seleção Natural, proposta por Charles Darwin, mas também é influenciada artificialmente quando somada às preferências humanas no que se refere às culturas agrícolas (Brisgewater; Rotherham; Rozzi, 2019).

O surgimento de variedades de determinada espécie, como o milho, foi possibilitado, tanto por fatores bióticos e abióticos, quanto pela preferência humana em relação ao tamanho da parte comestível, a facilidade de obtenção das sementes, a resistência à seca, ao calor ou a doenças, o gosto do alimento e sua cor (Buckler; Stevens, 2006). O milho-pipoca diferencia-se do comum por ser mais delicado, menor, de colmo mais fino, menor número de folhas (Carpentieri-Pípolo et al.,2002), cujo endosperma está encapsulado (Corrêa et al., 2001). A seleção natural e cultural foi responsável pelo processo de domesticação dessa cultura que contribuiu para a ampliação da variabilidade genética, bem como o aparecimento de variedades crioulas com genética e fenótipos distintos, que são provenientes de um parente silvestre comum: o teosinto (Coutiño et al., 2008).

Os diferentes ambientes do planeta contribuem para a heterogeneidade biológica de vários espécimes, em particular microbiológicas e vegetais, conferindo-lhes adaptabilidade aos fatores edafoclimáticos predominantes das regiões em que esses organismos se encontram (De Lima, 2020)**.** Tais recursos genéticos tem uso real ou potencial em programas de melhoramento genético que visam identificar determinada característica benéfica de uma espécie e transferi-la a outra de interesse comercial (Faleiro et al., 2005). Entretanto, com o crescimento da demanda mundial por alimentos, cada vez mais terras tem sua paisagem transformada para suprir a necessidade do mercado e tem sua vegetação nativa substituída, muitas vezes, por monoculturas que levam com elas variedades que detinham potencial de acrescentar novas características genéticas (Spirito; Vieli; Montalba, 2022), e microbiológicas à agrobiodiversidade vigente.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

A expansão das fronteiras agrícolas para suprir a urgência do mercado dada ao aumento populacional e por demanda por alimentos, além de contribuir para a perda de parentes silvestres das espécies agrícolas, reduziu as variedades consumidas pelos seres humanos. A título de informação, cerca de 10 mil espécies foram usadas na produção de alimentos e forragens desde os primórdios da história, no entanto, passou para apenas 150 culturas na atualidade, sendo que somente 12 culturas agrícolas são responsáveis por fornecer 80% da energia necessária para a sobrevivência humana dos quais o trigo, o arroz, a batata e o milho só fornecem 60% de alimentos estáveis (Ahuja; Jain, 2015).

O processo de domesticação vegetal, iniciado há, aproximadamente, 10 mil anos foi imprescindível para a agricultura moderna ao tornar as cultivares mais produtivas atendendo, dessa forma, a crescente demanda humana por alimentos (Puugganan, 2019). A seleção artificial começou como um procedimento inconsciente, não intencional, responsável pela maior parte das características que distinguem culturas domesticadas de seus parentes silvestres, incluindo a perda da capacidade de dispersão de sementes, períodos de germinação uniformes e mais rápidos, aumento da porção comestível, bem como mudanças em seu hábito reprodutivo, enquanto a transição consciente dessa seletividade ocorreu quando o homem começou a observar e favorecer a multiplicação dos indivíduos que detinham características preferenciais, como a cor do fruto e seu sabor (Heiser, 1988). Tal processo evolutivo, além de submeter as culturas agrícolas a pressões ambientais distintas, estreitamento de base genética devido a ações de seleção intencional, que alterou o metabolismo dos vegetais, também ocasionou mudanças na biodiversidade endofítica dessas espécies, selecionando os microrganismos com melhor potencial adaptativo ao novo ambiente e às mudanças metabólicas sofridas pela planta (Hardoim et al., 2015).

Os parentes silvestres de espécies cultivadas, bem como as variedades crioulas podem abrigar comunidades microbianas pouco exploradas de transmissão vertical ou horizontal que podem desempenhar importante papel no crescimento vegetal, como fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e quelação de ferro (Hardoim et al., 2015); o seu desenvolvimento, ao melhorar a ecofisiologia das hospedeiras e permitir que elas superem estresses abióticos, como a seca (Nagabhyru et al., 2013) e a contaminação por metais (Lee et al., 2021), além de

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

conferir proteção ao receptáculo vegetal contra fitopatógenos ao secretarem, por exemplo, metabólitos secundários voláteis que suprimam ou mitiguem os efeitos negativos dos patógenos na planta (Kottb et al., 2015).

Segundo Gutierrez e Grillo (2022), a partir do processo de domesticação do gênero *Zea*, foram selecionadas características vegetais intimamente associadas ao rendimento de grãos, ocasionando, de maneira não proposital, mau desempenho frente a estresses bióticos e abióticos, quando comparados com os progenitores silvestres dessa cultura. Como já demonstrado por Jacobs et al. (2023), o microbioma de sementes de variedades crioulas exibe maior diversidade endofítica, contrastando com as variedades híbridas que apresentam uma menor e mais uniforme biodiversidade endófita. Tal característica pode ser evidenciada por meio de estudos de *metabarcoding* que realçam uma forte relação entre a diversidade de microbiomas internos e a diminuição no percentual de produtividade das culturas, bem como sua resistência a doenças (Trivedi et al., 2020).

O atual modelo agrícola, focado predominantemente em *commodities* e produtividade, resultou em uma diminuição drástica na diversidade genética e microbiológica das espécies cultivadas (Larson et al., 2014). Essa redução, além de limitar a capacidade das culturas em enfrentar as futuras mudanças climáticas, também compromete a presença quantitativa de microrganismos endofíticos benéficos e essenciais ao desenvolvimento vegetal e a resistência a patógenos. A biodiversidade microbiana presente em sementes de variedades crioulas e parentes silvestres representa um vasto potencial biotecnológico, tanto em termos de aprimoramento da saúde das cultivares, quanto para o desenvolvimento de soluções mais sustentáveis no combate a pragas e doenças agrícolas da atualidade e futuras (Johnston-Monjem; Raizada, 2011).

Diante desse contexto, no caso da cultura do milho, especula-se que os parentes silvestres, que se desenvolvem em ambientes com menor ação humana, e variedades crioulas, que normalmente encontram-se em sistemas agrícolas com uso de adubação orgânica, possuem um microbioma mais diversos frente às variedades que passam por processo de melhoramento formal, com expressivo estreitamento genético, como variedades híbridas transgênicas, as quais são, majoritariamente, desenvolvidas em ambientes com grande entrada de insumos agrícolas. A fim de

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

testar essa hipótese, foi escolhido um microcentro de diversidade de milho, localizado no município de Anchieta, em Santa Catarina, como fonte de germoplasma crioulo de variedades de milho-pipoca, bem como de parentes silvestres. Essa região é conhecida pela forte presença de agricultores familiares que cultivam centenas de variedades locais de milho (Vogt, 2010), transmitidas ao longo de gerações. Algumas dessas sementes, segundo entrevistas com os próprios agricultores, vêm sendo selecionadas, colhidas e plantadas de maneira contínua nos últimos 30 anos, representando uma valiosa parte da cultura e subsistência do local. Além disso, nessa localidade, identificou-se a presença do parente silvestre da cultura, a espécie *Zea Luxurians*, teosinto conhecido popularmente como dente-de-burro (Silva, 2015).

Diante do exposto, este estudo tem como objetivo caracterizar a microbiota residente de sementes crioulas de milho-pipoca, cultivadas em ambientes que recebem adubação orgânica. Além disso, será analisada a microbiota de seu parente silvestre, o Zea luxurians, que se desenvolve em pastagens sem interferência humana. Essas análises serão comparadas à biodiversidade endofítica de uma variedade comercial, um híbrido transgênico. A intenção é observar se o processo de domesticação e melhoramento genético, que estreita a base genética das culturas agrícolas, afetou a diversidade e composição do bacterioma. Caso sejam comprovadas particularidades nas composições endofíticas, essas informações poderão ser úteis para o desenvolvimento de insumos biotecnológicos voltados à promoção de uma agricultura mais sustentável.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

OBJETIVO GERAL

Caracterizar a microbiota residente de sementes crioulas de milho-pipoca (*Zea mays L.*) e de um parente silvestre, comparando-a com a microbiota de uma variedade híbrida transgênica para compreender como a domesticação, o melhoramento vegetal e o cultivo em diferentes ambientes agrícolas, especialmente no que se refere ao uso de insumos, podem ter influenciado a composição das comunidades bacterianas associadas às sementes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter sementes de variedade crioulas de milho-pipoca, híbrida transgênicas e de um parente silvestre da espécie, registrando informações sobre o manejo, origem e características.

Realizar a desinfestação superficial e germinação das sementes em condições controladas.

Extrair e isolar o DNA da microbiota endofítica presente nas radículas das plântulas das variedades testadas.

Amplificar e sequenciar as regiões V3/V4 do gene 16S rRNA para caracterizar as comunidades bacterianas associadas às sementes de cada genótipo a partir de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU's).

Processar os dados de *metabarcoding* utilizando ferramentas de bioinformática para descrever a diversidade alfa e beta, identificar táxons dominantes e avaliar diferenças na composição microbiana entre os genótipos estudados.

Propor microrganismos endofíticos com potencial para promover o crescimento vegetal ou contribuir para a agricultura sustentável, com base em análises taxonômicas.

Propor a utilização de microorganismos, segundo as propriedades encontradas, para síntese de bioprodutos visando uma agricultura mais sustentável.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A DOMESTICAÇÃO VEGETAL: UM PROCESSO HUMANO (IN)CONSCIENTE

O surgimento da agricultura alterou drasticamente a maneira como o homem interage com a natureza. Há, aproximadamente, 10 mil anos, o processo de domesticação de espécies vegetais permitiu aumentar o consumo de grãos e cereais pelas crescentes comunidades humanas (Larson et al., 2014). Essa dinâmica entre o homem e a natureza pode ser dividida, com sugere Darwin (1868) em seu livro “The Variation of animals and plants under domestication”, em duas categorias: a domesticação inconsciente e a consciente ou intencional a partir da ação humana sobre os distintos parentes silvestres que deram origem as atuais espécies cultivadas.

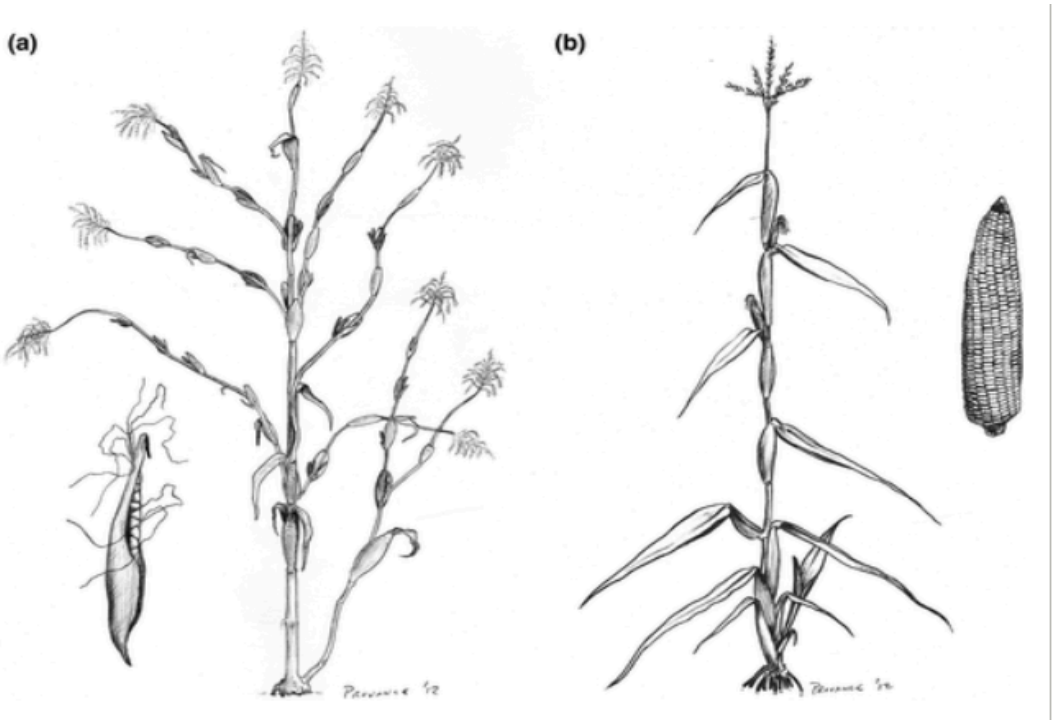
O processo inconsciente da domesticação pode ser entendido como uma ação instintiva e automática cujo objetivo é preservar os indivíduos mais valiosos de uma espécie, que provém alimentos para as comunidades hominídeas em detrimento das menos prerrogativas, não intencionando mudanças na população vegetal (Heiser, 1988). A conscientização desse processo, por outro lado, surge como uma extensão aprimorada do instinto de preservação, mas, agora, guiado por preferências nascidas da observação dos indivíduos que compõem determinada cultura (Zeder et al., 2006). As predileções podem ser referentes a cor da semente ou do fruto, uma vez que esse processo ocasiona alterações intencionais na população que, ao longo do tempo, facilitam e padronizam a obtenção dos alimentos detentores dos caracteres escolhidos por homogeneizar o desenvolvimento da espécie cultivada e favorecer o acesso ao alimento (Puruggnan, 2019). Dessa forma, enquanto a seleção não intencional é responsável pelas características típicas de culturas domesticadas, que as distinguem do progenitor silvestre, como a perda de mecanismos naturais de dispersão das sementes, amadurecimento simultâneo e propágulos maiores, a racionalização dessa prática, traz a predominância de caracteres secundários, promovendo, dessa forma, um processo co-evolutivo das plantas sobre novos ambientes agrícolas, combinando a seleção natural com as preferências das distintas populações humanas (Heiser, 1988).

Entre as espécies cultivadas, o milho *(Z. mays ssp. Mays),* domesticado há sete mil anos no México central, destaca-se como um exemplo pragmático que

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

elucida as modificações ocasionadas por esse processo. Sendo uma cultura quase onipresente na atualidade devido às suas diversas aplicações, desde alimentícias (Rouf Shah; Prasad; Kumar, 2016) até composição de biocombustíveis (Veljkovic et al., 2018), essa cultivar diverge vulgarmente do teosinto, seu ancestral silvestre, tanto em morfologia com caule único, espigas e grãos maiores e mais uniformes (Figura 1) (Stitzer; Ross-Ibarra, 2018), quanto bioquimicamente em relação ao seu maior conteúdo de carboidratos e menor índice proteico (Figura 2) (Flint; Bodnar; Scott, 2009).

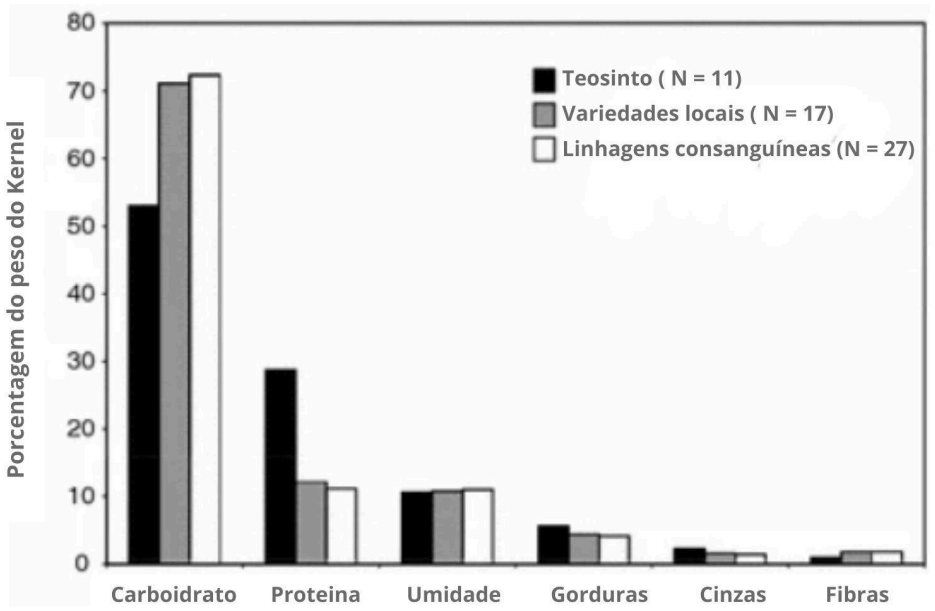
Figura 1 - Comparação morfológica entre teosinto (a) e milho (b)



Fonte: Stitzer; Ross Ibarra, 2018

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

Figura 2 – Comparação conteúdo nutricional teosinto x milho



Fonte: Adaptado de (Flint; Bodnar; Scott, 2009)

A trajetória percorrida pelo teosinto, desde seu centro de origem, no México, até sua instalação, com exemplares semi-domesticados nas Américas Central e do Sul (Costa et al., 2024), acompanharam a migração humana e submeteram a espécie a diferentes pressões ambientais, possibilitando o surgimento de variedades adaptadas aos fatores edafoclimáticos das diversas localidades onde fora cultivado, como a umidade, nutrientes presentes no solo e distintas temperaturas (Buckler; Stevens, 2006). Tais diversidades fenotípicas e metabólicas originaram variedades tradicionais detentoras de características morfológicas e de metabolismo únicas, capazes não só de nutrir a espécie humana, como também tornar-se lar de comunidades microbianas heterogêneas (Johnston-Monje; Raizada, 2011).

2.2 CULTIVANDO A REVOLUÇÃO: MONOCULTIVOS E SEUS IMPACTOS

A prevalência da espécie humana e seu rápido crescimento lançaram luz a amedrontadoras teorias de escassez alimentícia, como a postulada, em 1798, por Thomas Malthus, na qual salientava que a expansão humana ocorria de maneira

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

exponencial, enquanto a produção de alimentos caminhava aritmeticamente, criando um descompasso entre ambas. Este cenário impulsionou, principalmente, iniciativas de pesquisa e desenvolvimento tecnológicos focados no aumento da produção e eficiência agrícola industrial para maximizar a produtividade de safras de monoculturas de grãos de cereais a fim de ajudar os países emergentes a atender às crescentes necessidades de sua população, (Kendall, 2000). Tais esforços culminaram no marco conhecido como Revolução Verde, cujas produções agrícolas conseguiram superar o crescimento populacional com a larga utilização de sementes melhoradas em detrimentos das tradicionais, agrotóxicos, fertilizantes, sistemas de irrigação e a mecanização das colheitas nos monocultivos, quebrando, dessa forma, as teorias malthusianas postuladas (Wik et al., 2008).

A expansão dos monocultivos, apesar de proporcionar o abastecimento da crescente demanda mundial por alimentos, traz grandes desbalanços ecológicos das regiões impactadas pela ação antropogênica (Kaur et al., 2024), uma vez que a produção agrícola diminui a biodiversidade local substituindo vegetações endêmicas por culturas comerciais projetadas geneticamente para o máximo rendimento em curtos períodos (Laurance; Sayer; Cassman, 2014). Essa degradação da paisagem, onde a agricultura é considerada o principal motor de mudança, arrisca o funcionamento de importantes serviços ecológicos, como as dinâmicas de polinização, a purificação da água e a riqueza biótica do solo, uma vez que há simplificação da paisagem a fim de dar espaço ao manejo intensivo da terra a partir da produção de culturas de uma única espécie e variedade (Suarez; Gwozdz, 2023). Esses impactos ambientais repercutem, frequentemente, no âmbito social e econômico, intensificando a desigualdade e influindo sobre os padrões alimentares das comunidades locais.

A substituição de variedades tradicionais por cultivares mais rentáveis do agronegócio, modifica os hábitos alimentares e sociais da população, como observado na produção de abacaxi na Costa Rica, onde há, tanto o aumento da desigualdade econômica devido ao acúmulo de terras por minorias, quanto intensificação da insegurança alimentar local devida à transição das variedades tradicionais para monoculturas de exportação de abacaxi (Shaver et al., 2015). O estreitamento da biodiversidade alimentar ocasionada pela transição do agronegócio representa riscos nutricionais, econômicos, culturais e ecológicos locais, uma vez

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

que a plantação intensiva de monocultivos aumenta as chances de incidências de pragas e fitopatologias (Pingali, 2012), cujas plantas afetadas raramente estão adaptadas às dinamicidades ecológicas locais, pondo em risco a oferta de alimentos da região transacionada.

Diante desse cenário, a dependência crescente dos pacotes tecnológicos (sementes melhoradas e/ou transgênicas, uso excessivo de insumos agrícolas) da Revolução Verde e a consequente perda da biodiversidade agrícola instigaram a busca por novas soluções. A uniformização das culturas, alcançado através da modificação genética, embora eficaz para o aumento da produtividade, tornou os sistemas agrícolas vulneráveis à ocorrência de pragas e doenças, além de limitar a adaptação das culturas às mudanças climáticas (Pingali, 2012). Essa suscetibilidade, associada à degradação das paisagens, lançou luz à importância dos recursos genéticos vegetais como uma valiosa alternativa para restaurar a diversidade nos sistemas agrícolas e fortalecer a resiliência e a plasticidade genética das culturas comerciais frente às adversidades contemporâneas (Gamage et al., 2023).

2.3 DIVERGIR PARA SOBREVIVER: A BUSCA POR RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Se por um lado a adoção de sistemas monoculturais supriu a demanda mundial imediata por alimentos, por outro, essa prática extensiva e de transformação intensa da paisagem causa inúmeros desequilíbrios ambientais, como a contaminação do solo e da água pela larga utilização de agroquímicos, modifica a rizosfera local e favorece o surgimento de resistência fitopatogênica (Fones et al., 2020). Esse modelo de cultivo põe à prova a resistência das culturas comerciais frente a evolução e surgimento de pragas agrícolas e fitopatógenos, podendo causar instabilidade no rendimento das colheitas, uma vez que a monocultura é composta por indivíduos geneticamente uniformes que podem não deter as características necessárias para combater tais doenças (Jacques; Jacques, 2012).

Um dos episódios históricos que retrata a ameaça da instabilidade alimentar ocorreu com a Grande Fome Irlandesa da Batata, quando as plantações de batata “lumper” foram devastadas pela ação do *Phytophthora infestans* que se espalhou da

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

América do Norte para a Europa, em 1845. Essa crise alimentar, que fez milhares de vítimas (Figura 3), ocorreu devido a dependência da população irlandesa dessa variedade de batata que era cultivada por propágulos, ou seja, por clones que não apresentavam variações genéticas para resistir à cepa de *P. infestans* (Yoshida et al., 2013).

Figura 3 - The Famine Memorial, Dublin

Fonte: BBC, News World Europe, 2019

Os terríveis episódios de instabilidade alimentar criados pela expansão da monocultura impulsionaram diversos trabalhos que almejavam mitigar a suscetibilidade vegetal às doenças e pragas emergentes. Dentre diversos nomes, Nikolai Vavilov, botânico soviético, destaca-se por seus escritos sobre a base fitogeográfica do melhoramento de plantas, a lei das séries homólogas na herança da variabilidade e seus estudos sobre a imunidade de plantas de doenças infecciosas.

O primeiro tema relacionada a origem fitogeográfica das plantas, em especial, desenvolveu a ideia de que as plantas cultivadas possuem origens geográficas específicas, ou seja, centros onde se originaram a partir de um parente silvestre que foi domesticado, como no caso do milho, cujo centro de origem está localizado no

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

centro-sul do México (Buckler; Stevens, 2006). Além de relatar a origem das culturas agrícolas, Vavilov também deu destaque aos centros de diversidade que são regiões em que a cultivar sofreu modificações genéticas para se adaptar aos contextos edafoclimáticos locais (Vavilov, 1949). A busca pelos centros de origem das culturas foi de extrema importância para entender a influência da domesticação aliada a adaptabilidade das plantas em diferentes contextos biológicos. Uma vez que essas variações intraespecíficas representam recursos genéticos valiosos para a adaptabilidade e sobrevivência das espécies cultivadas, visto que as modificações podem almejar, desde uma correção estética do alimento, até conferir a ele resistência a pragas agrícolas por meio de melhoramento genético vegetal (Zafar et al., 2020).

Assim como na Irlanda, o Brasil relatou um episódio semelhante em 1989, quando a doença conhecida como “Vassoura-de-bruxa” (WB), foi o motivo da maior crise já ocorrida na cacauicultura nacional. Essa enfermidade, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, produzia deformações, apodrecimento e morte dos meristemas afetados dos cacaueiros (Figura 4), levando a perda completa da planta acometida por este patógeno. Como decorrência, o Brasil, que outrora chegou a ser o segundo maior produtor mundial de cacau, com mais de 400 mil toneladas na década de 1980, teve sua colheita reduzida a cerca de 100 mil toneladas na década de 2000. Os desastrosos impactos se alastraram, tanto na esfera ambiental, visto que o cacau era importante fator para a preservação da floresta Atlântica, quanto econômica, com a queda de receita e o endividamento dos fazendeiros, e social, com o desemprego massivo dos colaboradores que trabalhavam nas fazendas (José Tadeu Arante, agência FAPESP, 2021).

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

Figura 4 - Vassoura de bruxa no cacaueiro

Fonte: Agência FAPESP, 2021

O evento causado por WB impulsionou pesquisas que visavam tornar o cacau mais resistente a partir do cruzamento da variedade comercial Forastero, suscetível ao fungo, com variedades que possuem maior resistência ao *M. perniciosa,* como o Criollo e o Trinitário. Antonio Alves et. al., 2018, selecionaram progenitores que exibiam maior resistência ao fitopatógeno, como a genitor EET 233 que originou progênies altamente resistentes a WB, quando comparadas ao controle. Este e vários outros trabalhos fomentados pela Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) e o Centro de Pesquisa do Cacau (CEPEC) focaram no desenvolvimento de híbridos interclonais que, ao passo que mantivessem as características comerciais desejáveis, também expressassem resistência à WB. Tal exemplo nos mostra a importância da conversação da variabilidade genética para uso em programas de melhoramento.

O extenso cultivo de poucas variedades agrícolas, apesar de trazer rendimento, cria um cenário de insegurança alimentar, pois a similaridade genética dos indivíduos os torna suscetíveis aos desequilíbrios ambientais que surgem. Por esse motivo, faz-se imprescindível o conhecimento e aplicação dos recursos genéticos vegetais na agricultura almejando ampliar as bases genéticas dos cultivos, mitigando o risco de instabilidade alimentar.

2.4 MELHORAMENTO GENÉTICO VEGETAL

O conhecimento sobre os centros de origem e diversidade trazido por Vavilov

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

forneceu os fundamentos para os programas de melhoramento genético vegetal, que necessitam de ampliação de base genética que podem ser incluídas ou substituídas em uma cultivar de interesse comercial, uma vez que os recursos genéticos vegetais são a fração da biodiversidade com uso real ou potencial (Veiga; Queiroz, 2021). Por isso, podem ser empregadas em programas de melhoramento vegetal a fim de transferir uma determinada característica de interesse a uma cultivar de importância comercial para corrigir algum aspecto que prejudique ou impeça sua comercialização (Veiga; Queiroz, 2021).

A variabilidade genética das variedades de uma espécie cultivada surge tanto a partir de resposta a pressões ambientais sofridas pela planta, como às condições nutricionais do solo, estresse hídrico e fitopatógeno (Revilla; Oliveira; Tracy, 2021), bem como da seleção com base em preferências humanas. A seleção realizada pelos agricultores responsáveis por sua conservação altera as frequências genéticas e gênicas de uma população ao selecionar as plantas mais aptas a lidar com o contexto agrícola praticado, que, normalmente de agroecológico ou orgânico (Bridgewater; Rotherham; Rozzi, 2019).

Um exemplo notável no Brasil que pode ser utilizado como fonte genética para programas de melhoramento é o microcentro de diversidade de Anchieta, localizado em Santa Catarina. A região abriga uma rica variedade de recursos genéticos vegetais, com destaque para o milho comum e o milho pipoca, sendo este caracterizado por sua estatura menor, de colmo mais fino, menor número de folhas (Carpentieri-Pípolo et al., 2002), cujo grão possui uma fina cápsula que envolve o endosperma funcionando como uma espécie de parede rígida que se rompe quando com o aumento da pressão interna (Corrêa et al., 2001).

Essa área, conhecida pelo forte plantio de variedades tradicionais e agricultura familiar, desempenha um papel crucial na conservação da diversidade genética, uma vez que abriga centenas de variedades crioulas que são mantidas e selecionadas por gerações.

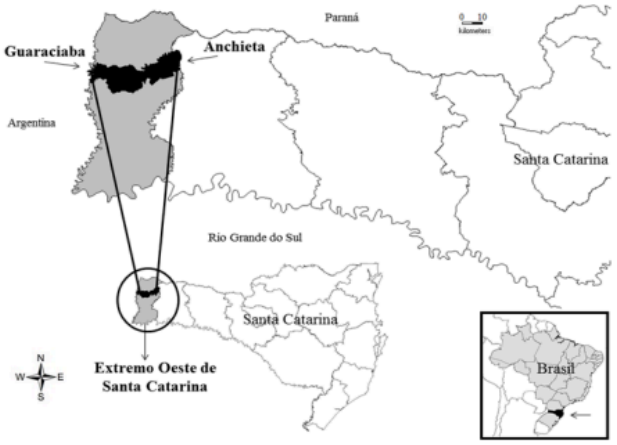
2.4. ANCHIETA E O MICROCENTRO DE DIVERSIDADE DE MILHO

Segundo o conceito desenvolvido por Nikolai Vavilov (1949), um microcentro

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

de diversidade é uma pequena parte de um grande centro de diversidade, no qual há coexistência de variedades tradicionais (crioulas), linhagens silvestres e formas domesticadas. No Brasil, foi identificado um microcentro de diversidade de milho, localizado no extremo oeste do Estado de Santa Catarina, em Anchieta e Guaraciaba, no sul do país (Figura 5). De acordo com Costa (2020), os microcentros de diversidade abrangem áreas geograficamente restritas, onde há um significativo acúmulo de biodiversidade. Nesta região, os agricultores, por meio do manejo familiar, resgatam e conservam a agrobiodiversidade dessa cultura. Além de usar o milho para alimentação humana e animal, construindo, dessa maneira, uma cultura e economia regional baseadas nessa cultivar.

Figura 5 - Localização dos municípios de Anchieta e Guaraciaba no Extremo Oeste de Santa Catarina, Sul do Brasil, conhecidos como microcentro de diversidade de milho.



Fonte: Silva, 2015.

Segundo Costa (2020), as variedades tradicionais presentes no microcentro da diversidade demonstram alto potencial de produção de grãos e adaptação aos fatores edafoclimáticos e estresse biológicos regidos por fungos, bactérias e pragas agrícolas, além de serem fontes naturais de metabólitos secundários, como antocianinas, carotenóides e compostos fenólicos. Em Anchieta, também há presença da espécie *Zea Luxurians,* o parente silvestre das variedades de milho crioulo da região que é comumente usado como pastagem para o gado. Nesta localidade, existe a organização Cooperativa Anchieta que busca promover o uso sustentável da agrobiodiversidade local ao incentivar o intercâmbio de recursos genéticos e preservação dos mesmos dentro das comunidades familiares (Alves et

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

al., 2004). A Figura 6 ilustra parte da biodiversidade presente neste município que é guardada por essa cooperativa em parceria com os agricultores.

Figura 6 – Variedades tradicionais de milho coletados de Anchieta/SC

Fonte: Autoria própria, 2024

Além do manejo genético realizado a partir das seleções feitas pelos agricultores, outro fator que tem se mostrado crucial para o desenvolvimento das plantas e sua capacidade adaptativa ao ambiente é a presença de uma microbiota endofítica diversificada (Navya; Babu, 2023). Esse recrutamento de microorganismos que se alojam nos tecidos vegetais podem desempenhar um papel fundamental na saúde das variedades tradicionais de milho, como as encontradas e Anchieta, atuando, dessa forma e simbiose com as plantas para aumentar sua resiliência frente aos estresses bióticos e abióticos do meio (Cankar et al., 2005).

Esses fatores, somados ao manejo genético realizado pelos agricultores, reforçam a hipótese de que as sementes crioulas e silvestres conservam uma simbiose exclusiva com sua microbiota endofítica (Jacques.; Jacques, 2012). Essa relação é sustentada tanto pelos fatores genéticos das variedades locais, quanto pela dinâmica de manejo mais tradicional. Além disso, acredita-se que as sementes crioulas e silvestres do milho possuam uma microbiota endofítica residente diferente das sementes de milho melhoradas, como as híbridas (Jacobs, 2023). Essa diferença pode ser atribuída ao processo de estreitamento da base genética da variedade híbrida, mas também ao seu cultivo em ambientes com grande disponibilidade de recursos orgânicos e irrigação controlada (Suarez; Gwozdz,

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

2023).

2.5 A MICROBIOTA ENDOFÍTICA E SUAS VANTAGENS

As plantas abrigam uma vasta diversidade microbiana, com fungos, protozoários, vírus e bactérias, que podem ser tanto epífitos quanto endofíticos (Newman; Cragg, 2015). Microorganismos epífitos habitam a superfície foliar das plantas. Enquanto os endofíticos colonizam os tecidos vegetais internos assintomáticamente, sem se expandir exteriormente ou formar estruturas anômalas. Esses microrganismos desempenham um papel crucial no desenvolvimento e desempenho de seu hospedeiro, melhorando a absorção de nutrientes, como também aumentando a resistência a estresses ambientais e contra fitopatógenos (Yuan; Zhang; Lin, 2010).

A associação entre microrganismos e plantas hospedeiras, conhecido como holobioma reflete o entendimento de que o fenótipo da planta não depende unicamente de sua interação com o ambiente (Akhtar et al., 2024). O fenótipo é resultante de uma complexa equação formada pelo seu genótipo, pela microbiota residente e pela plasticidade genética do hospedeiro capaz de responder aos estímulos ambientais (Pascale et al., 2020).

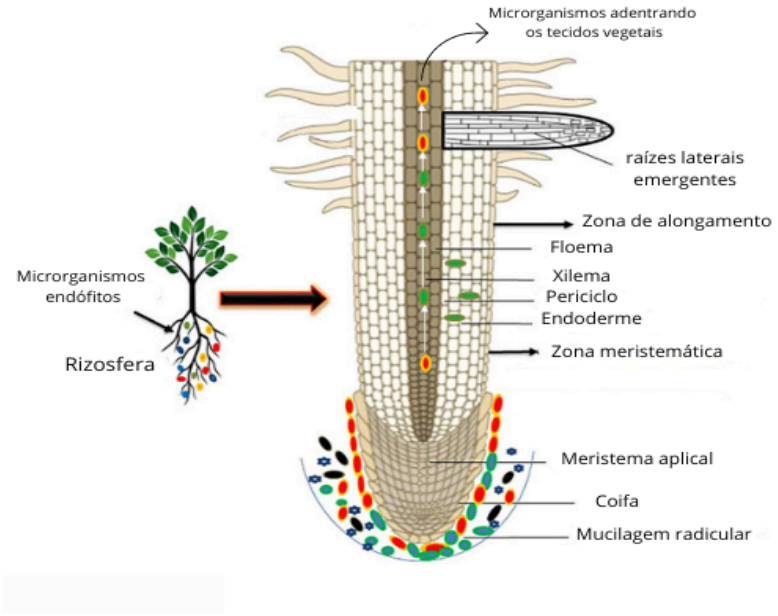
Os microrganismos endofíticos vêm despertando interesse de diversos pesquisadores, desde a década de 1940, por realizarem diferentes interações ecológicas, estarem onipresentes na natureza e se associarem a quase 300 mil espécies de plantas conhecidas (Kumar et al., 2020). Os organismos endófitos são considerados não patogênicos para a espécie vegetal, pois não causam sintomas negativos e auxiliam a hospedeira em seu desenvolvimento (Sharma; Kansal; Singh, 2018).

As plantas possuem interações com vasto número de comunidades microbianas, tanto pela microbiota herdade a partir de seus progenitores, quanto pela interface solo-raiz na qual a hospedeira pode liberar exsudatos radiculares, como ácidos orgânicos, aminoácidos e proteínas que norteiam o recrutamento de microrganismos edáficos, sendo estes a microbiota residente no solo, a partir de aberturas inatas à vegetal ou as causadas pelo atrito da raiz com o solo. Essas aberturas permitem a entrada dos microrganismos dando início à colonização dos tecidos vegetais (Figura 7) (Kandel; Joubert; Doty, 2017). Assim como uma planta

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

pode ser colonizada por endofíticos já existentes no substrato em que está fixada, as comunidades microbiológicas podem ser passadas verticalmente para as próximas gerações a partir das sementes que portam a microbiota interior recebida de seus progenitores (Cankar; Kraigher; Ravnikar; Rupnik, 2005)

Figura 7– Esquema da colonização de endofíticos a partir da rizosfera



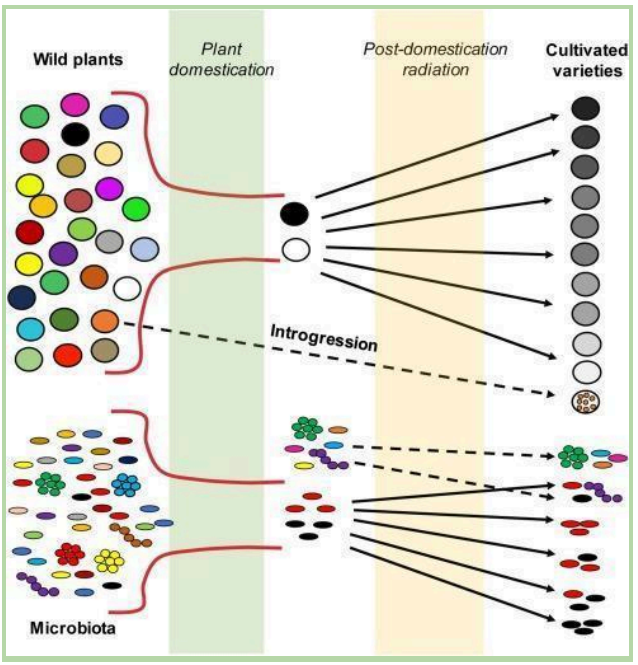
Fonte: Adaptado de (Kumar et al., 2020)

Diferentes espécies vegetais podem abrigar comunidades microbianas distintas de acordo com características estruturais e bioquímicas de cada genótipo (Schlaeppi; Bulgarelli, 2015). Essa variação da composição do microbioma também é observada ao longo da domesticação e do melhoramento vegetal. Uma vez que, anteriormente a esses processos, os parentes silvestres encontravam-se à mercê de relações ecológicas simbióticas e predatórias, sem a intervenção humana (Kumar; Gera, 2014) Estudos sobre comunidades de endofíticos demonstram que o genótipo das plantas influencia na colonização dos microrganismos, visto que as diferentes versões alélicas dentro de uma mesma espécie controlam a composição e a quantidade de exsudatos radiculares liberados no ambiente que atraem diferentes quantidades e diversidades microbianas que habitam a rizosfera (Yeoh et al., 2017). A seleção de genótipos específicos para alimentação humana, restringiu a biodiversidade presente na microbiota residente das cultivares (Figura 8), acarretando o estreitamento da biodiversidade genética e perda de alelos capazes

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

de atrair diferentes comunidades microbianas (Martinez-Romero et al., 2020).

Figura 8 - Diferentes genótipos de plantas silvestres (a esquerda), selecionados pela domesticação (centro), resultando em cultivares domesticadas (a direita) e seus efeitos na microbiota vegetal



Fonte: Martinez-Romero et al., 2020.

O modelo agrícola atual, ademais de limitar a biodiversidade usada na agricultura, faz uso intensivo de agrotóxicos para controlar pragas agrícolas e fitopatógenos, promovendo drástica alteração na microbiota do solo, empobrecendo a biodiversidade atuante na colonização endofítica dos tecidos vegetais. Tal fenômeno tem resultados negativos, por exemplo, em variedades de milho tratadas com defensivos e fertilizantes agrícolas (Nettles et al., 2016), ao afetar diretamente a comunidade oxidante de metano, do solo e endofítica, diminuindo a variabilidade intraplantar dessas comunidades bacterianas submetidas ao manejo intensivo (Da Costa Stuart; Stuart; Pimentel, 2018).

Como se sabe nos relatos descritos, faz-se imprescindível a conservação de sementes crioulas, sobretudo do milho, e de suas comunidades endofíticas (Wnag et al., 2024). Essa ação garante a continuação da transmissão horizontal e vertical de espécimes microbiológicos com potencial biotecnológico para a criação e comercialização de bioinssumos potencializadores do desempenho vegetal (Vejan et al., 2016) e embasa um modelo agrícola mais sustentável.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

2.6. ANÁLISE *METABARCODING* DA MICROBIOTA ENDOFÍTICA

As associações entre plantas e comunidades endófitas ganharam destaque recentemente graças ao advento do sequenciamento de alto rendimento e suas aplicações que permitem desvendar o conteúdo de comunidades inteiras a custos acessíveis para a pesquisa de base (Parks et al., 2017). No campo da biodiversidade genética, o *metabarcoding* de DNA foi amplamente reconhecido como uma estratégia eficaz de identificação simultânea de táxons a partir de amostras ambientais, como água, solo e materiais com múltiplos organismos (Milazzo et al., 2021). Essa abordagem combina métodos de amplificação por PCR de regiões específicas do DNA tidas como *barcodes* genéticos, com o sequenciamento de nova geração (NGS), permitindo, dessa forma, identificar as espécies presentes na amostra (Pasakinskien et al., 2024). No caso de microrganismos, sequências conservadas como o gene 16S rRNA bacteriano e a região ITS fúngica são amplamente empregadas como alvos de amplificação (Liotti et al., 2019). O gene 16S rRNA, em particular, é utilizado por apresentar regiões altamente conservadas entre todas as bactérias, intercaladas com regiões hipervariáveis que permitem a diferenciação entre diferentes gêneros e espécies. Essa característica torna o 16S rRNA uma ferramenta essencial para a identificação, classificação e análise da diversidade bacteriana em comunidades complexas, sem a necessidade de cultivo prévio dos microrganismos. No presente trabalho, a escolha do gene 16S rRNA como marcador molecular possibilitou a caracterização da composição da microbiota associada às variedades de milho estudadas, permitindo comparações quanto à estrutura e às funções microbianas presentes em cada genótipo.

O *metabarcoding* viabiliza a identificação simultânea de diversos táxons presentes em uma amostra, tornando o processamento de dados mais ágil e eficiente. Em relação a espécies microbianas, essa técnica proporciona uma análise detalhada da dinamicidade populacional desses organismos, ademais de permitir quantificar a abundância relativa de diferentes grupos (Milazzo et al., 2021). A alta sensibilidade e precisão atreladas ao *metabarcoding* torna possível identificar, em alguns casos, a espécie, tornando-a uma ferramenta primordial para o estudo de comunidades biológicas complexas (Parks et al., 2017).

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

No campo agrícola, essa metodologia tem se mostrado excepcionalmente útil na identificação e caracterização de microbiomas associados a sementes de diversas culturas, em especial o milho (Johnston-Monje; Raizada, 2011). Pesquisas revelam que as sementes são ecossistemas complexos habitados por uma variedade de microrganismos, cujos filos mais comumente encontrados são *Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes* (Alibrandi et al., 2010).

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

3 METODOLOGIA

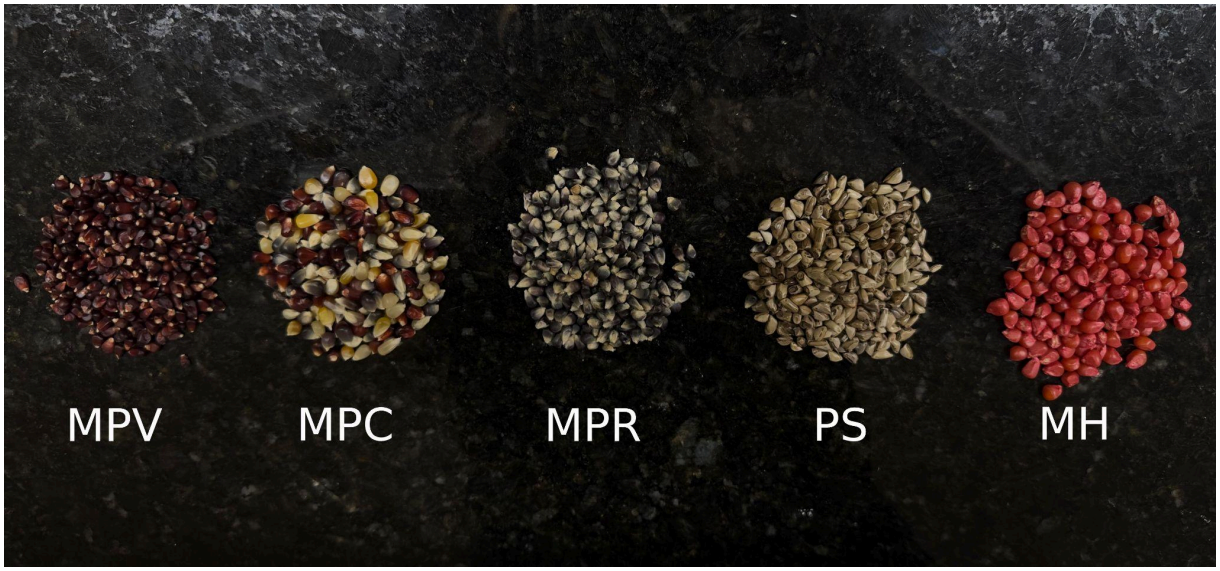
3.1 OBTENÇÃO DO GERMOPLASMA VEGETAL

A coleta de Germoplasma de Milho foi realizada no Município de Anchieta, Santa Catarina. A cidade e a região foram reconhecidas como um microcentro de diversidade da espécie *Zea mays* (SILVA, 2015) e (ALVES et al., 2004). Nos dias 16 e 17 de março de 2024, durante o Festival Cultural do Milho Crioulo, realizado pela Secretaria de Turismo do município, em parceria com a cooperativa dos agricultores locais (Cooper Anchieta), realizou a coleta e obtenção das variedades crioulas de milho-pipoca, juntamente com o Teosinto. A coleta das sementes foi comunicada ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) por meio do cadastro de acesso 83527850015.

Na ocasião, foram coletadas as variedades de milho-pipoca Vermelha, caracterizado pelos grãos de cor vermelho rubi (MPV), pertencente ao agricultor Celestino Draszvisk, a variedade milho-pipoca Roxa caracterizado pelos grãos de cor preta (MPR), pertencente ao agricultor William Vezani e a variedade milho-pipoca Colorida (MPC) caracterizada pelos grãos de cores sortidas (vermelho, branco, preto e amarelo) pertencente ao agricultor Agostinho Dalla Vechio. Coletou-se também o parente silvestre (PS) da cultura, a espécie *Zea Luxurians*, teosinto conhecido popularmente como dente-de-burro (SILVA, 2015) e o milho hibrido (MH), como ilustrado na Figura 9. Os agricultores descreveram o Teosinto como uma planta anual, com estrutura dística, ou seja, com espigas organizadas em duas fileiras opostas ao longo do eixo principal da espiga, e com coloração variada, incluindo tons de cinza, multicolorido, branco, marrom, preto, amarelo e roxo. Seu uso principal ocorre como forragem, principalmente como pastagem para gado leiteiro. Outras características relevantes foram mencionadas, como resistência a pragas e doenças, tolerância à seca, a altas e baixas temperaturas, além de sua utilidade em práticas tradicionais e artesanais.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

Figura 9 - Sementes de milhos-pipoca crioulos e teosinto coletados em Anchieta e o milho híbrido



Fonte: autoria própria, 2025

O milho transgênico SX 3197 TR, foi adquirido da Baspan, marca registrada do grupo Basso Pancotte, com o lote 238243312. Com validade até maio de 2025, os grãos são dentados, com coloração amarela alaranjada e apresentam como características uma pureza mínima de 95% e uma germinação mínima de 85%. A variedade apresentou o evento transgênico responsável por conferir resistência ao glifosato.

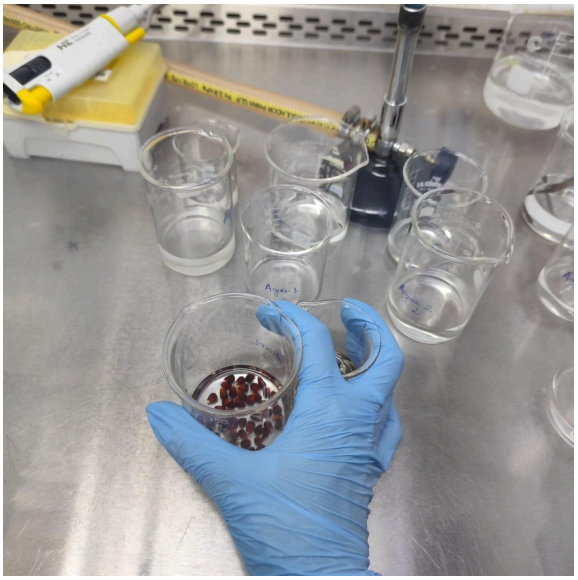
Todas as sementes das variedades adquiridas, após aquisição, foram armazenadas em geladeira (4 °C) no Departamento de Laboratórios de Ensino (DELABEN) na Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA).

3.2. DESINFESTAÇÃO E GERMINAÇÃO DAS SEMENTES

Em fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas externamente utilizando um protocolo de limpeza de Barra et al. (2016), com modificações. De maneira geral, realizou-se lavagens sucessivas nas sementes, por imersão, em diferentes beckers estéreis contendo álcool 75% por 5 minutos, hipoclorito a 2,5% por 5 minutos e 3 lavagens consecutivas em água destilada estéril por 2 minutos cada um, com rotação constante das sementes em cada etapa de lavagem (Figura 9).

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

Figura 10 - Protocolo de lavagem das sementes, beckers contendo álcool 70%, hipoclorito e água destilada estéril

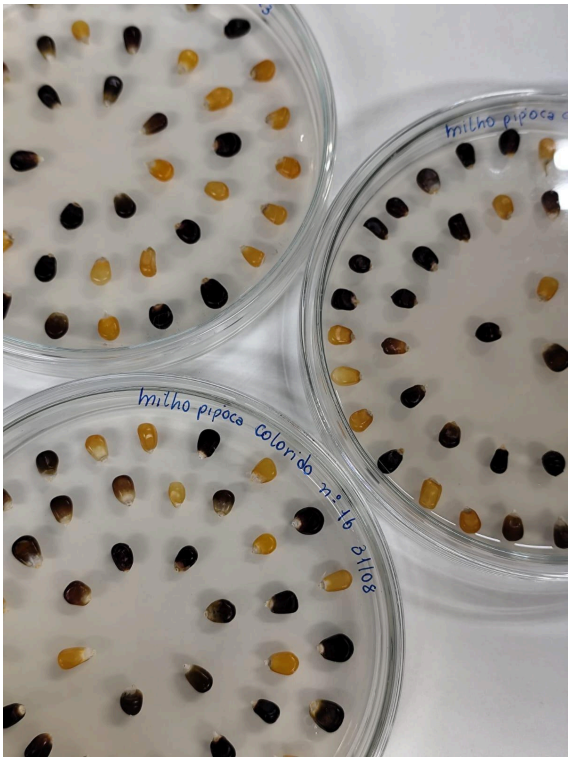


Fonte: Autoria própria, 2025

As sementes foram transferidas para placas de petri estéreis contendo papel filtro igualmente higienizado para secagem. Adicionalmente, alíquotas de 100 µL de água do último enxágue foram inoculadas em placas de Petri contendo meio ágar Luria-Bertani, incubadas a 25 ºC durante todo o período de germinação das sementes, para confirmar a ausência de bactérias epífitas nas sementes. Com posterior transferência, com auxílio de pinça de metal imersa em álcool 75%, para os meios de germinação compostos de agar água contidos em placas de petri com dimensões de 20 x 100 mm e identificadas com a repetição e a variedade tratada (Figura 10). Utilizou-se 45 sementes por genótipo para germinação. Após a identificação, as placas foram vedadas com parafilme e incubadas em BOD na temperatura de 25°C, com fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas de escuro até a germinação e alongamento da primeira radícula. A excisão e a coleta dos compartimentos de sementes foram realizadas com bisturis e pinças limpas com etanol 70% (vol/vol) e esterilizados por chama.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

Figura 11 - Placas de petri com meio ágar: água e as sementes tradicionais



Fonte: Autoria própria, 2025

3.3. EXTRAÇÃO DE DNA DA MICROBIOTA RADICULAR

A extração de DNA das radículas foi realizada segundo o protocolo adaptado de Johnston-Monje e Raizada (2011) e Nanfack et al. (2024). As radículas foram submetidas à maceração com incorporação de nitrogênio líquido. Utilizou-se pistilo e cadilho higienizados com álcool e hipoclorito e secos em estufa a 70°C. Os macerados foram transferidos para microtubos de 2mL em quantidades equivalentes com auxílio de balança analítica e espátula, com posterior identificação da repetição e variedade. Todas as variedades de milho utilizadas foram feitas em triplicata. Seguidamente a esse processo, o DNA radicular foi extraído utilizando o protocolo padrão disponibilizado no kit para extração e purificação de DNA DNeasy PowerSoil da QIAGEN, que garante a extração de DNA dos microrganismos da microbiota

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

endofítica das radículas (HARO, et al., 2021). O DNA extraído e purificado foi medido utilizando sistema NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) a fim de averiguar a quantidade de DNA presente em cada extrato purificado, selecionando apenas aqueles que apresentaram a relação de absorbância A260/A280 de ~1,8 destinado à análise molecular.

3.4. SEQUENCIAMENTO *METABARCODING*

A biblioteca de amplicons do gene 16S rRNA foi construída seguindo as especificações do sistema Illumina MiSeq, conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. As sequências amplificadas corresponderam às regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA, conforme descrito por Klindworth et al. (2013). Os *primers* utilizados foram: 16S amplicon PCR *forward* 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3' e 16S amplicon PCR *reverse* 5'-GTCTCGTGGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'.

3.5 PROCESSAMENTO DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO

Os dados gerados pelo *metabarcoding* foram submetidos a um pré-processamento e controle de qualidade para garantir a confiabilidade das leituras brutas, assegurando que o conjunto final de dados refletisse com precisão a abundância e a diversidade da microbiota presente nas amostras. As regiões de baixa qualidade foram filtradas utilizando o pacote DADA2, implementado na linguagem de programação R (Allali, et al., 2017). As unidades taxonômicas operacionais (OTUs) de alta qualidade, juntamente com os índices estatísticos associados, foram geradas com o auxílio dos pacotes Phyloseq (Patil; Narayan; Gopalkrisna, 2021) e Metacoder (Masson et al., 2020).

Para avaliar a diversidade beta entre as diferentes condições, foram calculadas as distâncias de Bray-Curtis por meio da função adonis2 do pacote Vegan (Munakata et al., 2021). A análise de coordenadas principais (PcoA) foi realizada utilizando a função ordinate do Phyloseq. A abundância diferencial das OTUs entre os grupos foi analisada por meio da técnica ANCOM-BC (Análise de

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

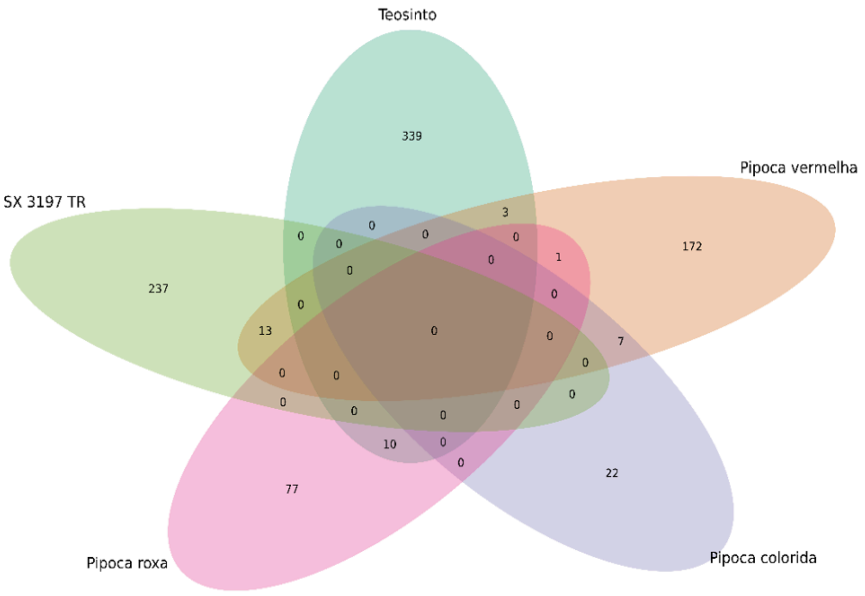
Composições de Microbiomas com Correção de Viés), conforme proposto por Lin e Peddada (2020).

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

4 RESULTADOS

No Diagrama de Venn (Figura 11), pode-se observar a quantidade de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) únicas e compartilhadas entre as diferentes variedades crioulas de milho-pipoca (Roxa, Vermelha e Colorida), o parente silvestre (Teosinto) e a variedade híbrida transgênica (SX 3197 TR). O diagrama ilustra que cada variedade de milho apresenta um conjunto único e distinto de OTUs, sem que haja um compartilhamento entre os cinco genótipos estudados. O teosinto destaca-se com a maior quantidade de OTUs únicas (339), seguido pelo híbrido com 237 OTUs únicas, conseguinte as variedades tradicionais de milho-pipoca Vermelha (172), Roxa (77) e a Colorida com 22 OTUs exclusivas.

Figura 12 - Diagrama de *Venn* representando o número de OTUs exclusivas e compartilhadas entre a microbiota radicular de três variedades crioulas de milho-pipoca (Vermelha, Roxa e Colorida), um parente silvestre da espécie (Teosinto – *Zea luxurians*) e uma variedade híbrida transgênico (SX 3197 TR).



Fonte: autoria própria, 2025

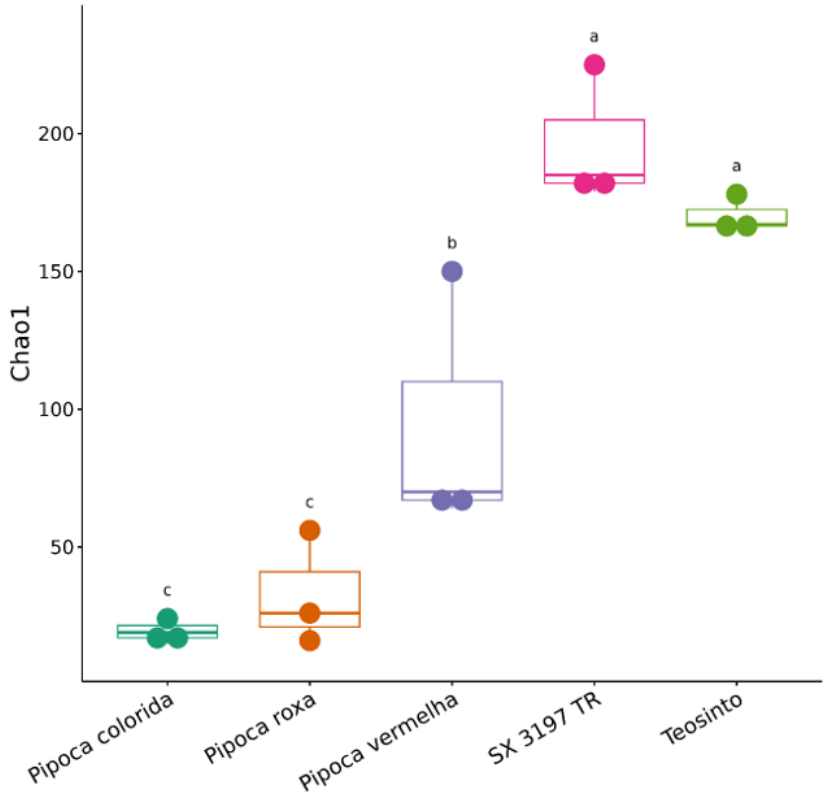
Algumas OTUs encontram-se compartilhadas entre duas ou mais variedades, como apresentado nas 3 OTUs comuns entre o Teosinto e a variedade MPV, como também as 7 OTUs compartilhadas pela MPC e a MPV, seguidamente de compartilhamentos entre o Teosinto e a MPR (10 OTUs), a MPR e a MPV (1 OTUs),

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

a Transgênica e a MPV (13 OTUs).

Os índices de alfa diversidade (Figura 12) indicam diferenças significativas na diversidade microbiana entre os cinco genótipos avaliados, cuja maior diversidade pode ser observada no teosinto e na variedade transgênica, atribuindo-se a letra “a”, sendo que ambos os valores superam significativamente aqueles obtidos pelas variedades crioulas de milho-pipoca. O MPV exibe uma diversidade inferior ao primeiro grupo, recebendo a letra “b”, enquanto MPR e MPC possuem os menores valores, recebendo a classificação “c” no gráfico.

Figura 13 - Histograma com índices de alfa diversidade das variedades crioulas de milho-pipoca (Vermelha, Roxa e Colorida) do parente silvestre da espécie (Teosinto – *Zea luxurians*) e uma variedade híbrida transgênico (SX 3197 TR)



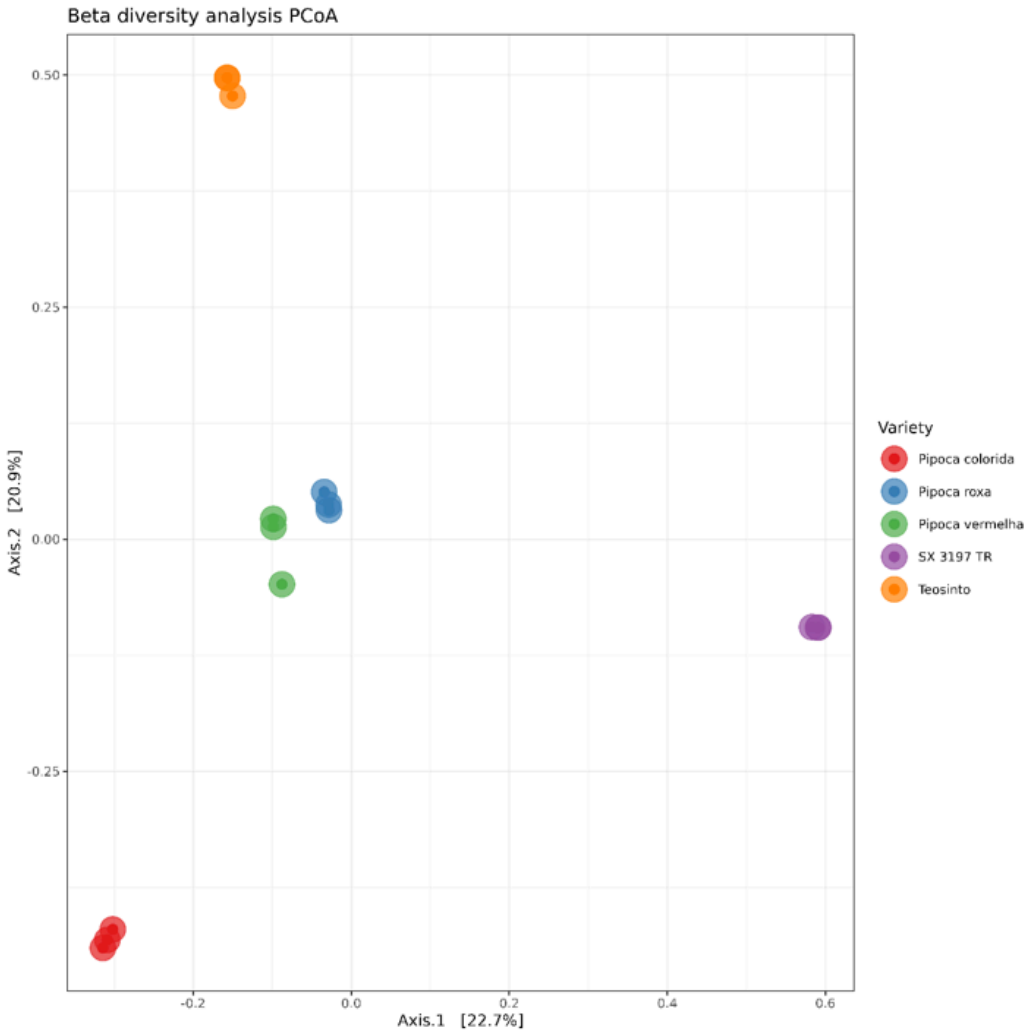
Fonte: autoria própria, 2025

A beta diversidade dos microrganismos endofíticos, representada por meio da análise de coordenadas principais (PCoA) (Figura 13), possibilita observar uma aproximação entre as variedades de MPR e MPV, mas mais afastada da MPC. O PS e o MH distanciaram-se de variedades crioulas de milho-pipoca. Os valores das duas primeiras coordenadas principais correspondem a 22,7% e 20,9%,

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

respectivamente.

Figura 14 - Análise de coordenadas principais (PCoA) demonstrando a beta diversidade da microbiota radicular das variedades crioulas de milho-pipoca (Vermelha, Roxa e Colorida), do parente silvestre da espécie (Teosinto – *Zea luxurians*) e da variedade híbrida (SX 3197 TR) segundo os valores de dissimilaridade.



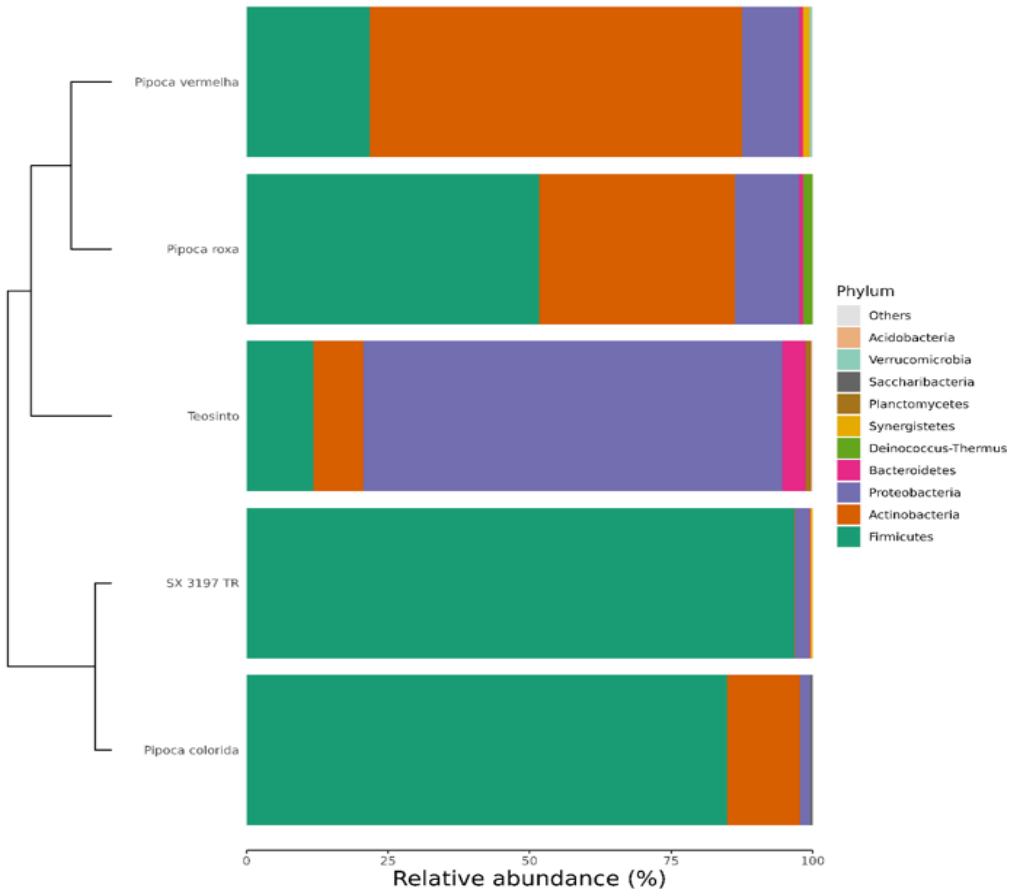
Fonte: autoria própria, 2025

A abundância relativa dos filos bacterianos pode ser observada na Figura 14 a partir do dendograma e dos gráficos de barra acoplados a ele. Considerando filo, percebe-se a formação de dois grupos, isto é, aquele formado por MPV, MPR e PS e o outro composto pela variedade MH e pelo MPC. De maneira geral, a variedade SX 3197 TR (MH) e o MPC possuem predominância do filo Firmicutes, representando a maior parte da microbiota dessas variedades, com abundância relativa próxima de 75%. Em relação ao outro grupo, ao MPR e ao MPV apresentam uma comunidade bacteriana com distribuição mais equilibrada entre os filos Firmicutes e

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

Proteobacteria, sendo o primeiro ainda o de maior abundância frente aos outros filos. O PS, em contrapartida, possui uma composição microbiana mais diversificada, com Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria em proporções mais expressivas, além de filos com abundância menor, como o Bacteroidetes e Planctomycetes.

Figura 15 - Dendograma e gráfico de barras representando a abundância relativa dos principais filos bacterianos encontrados nos genótipos das variedades crioulas de milho-pipoca (Vermelha, Roxa e Colorida), do parente silvestre da espécie (Teosinto – *Zea luxurians*) e da variedade híbrida (SX 3197 TR).



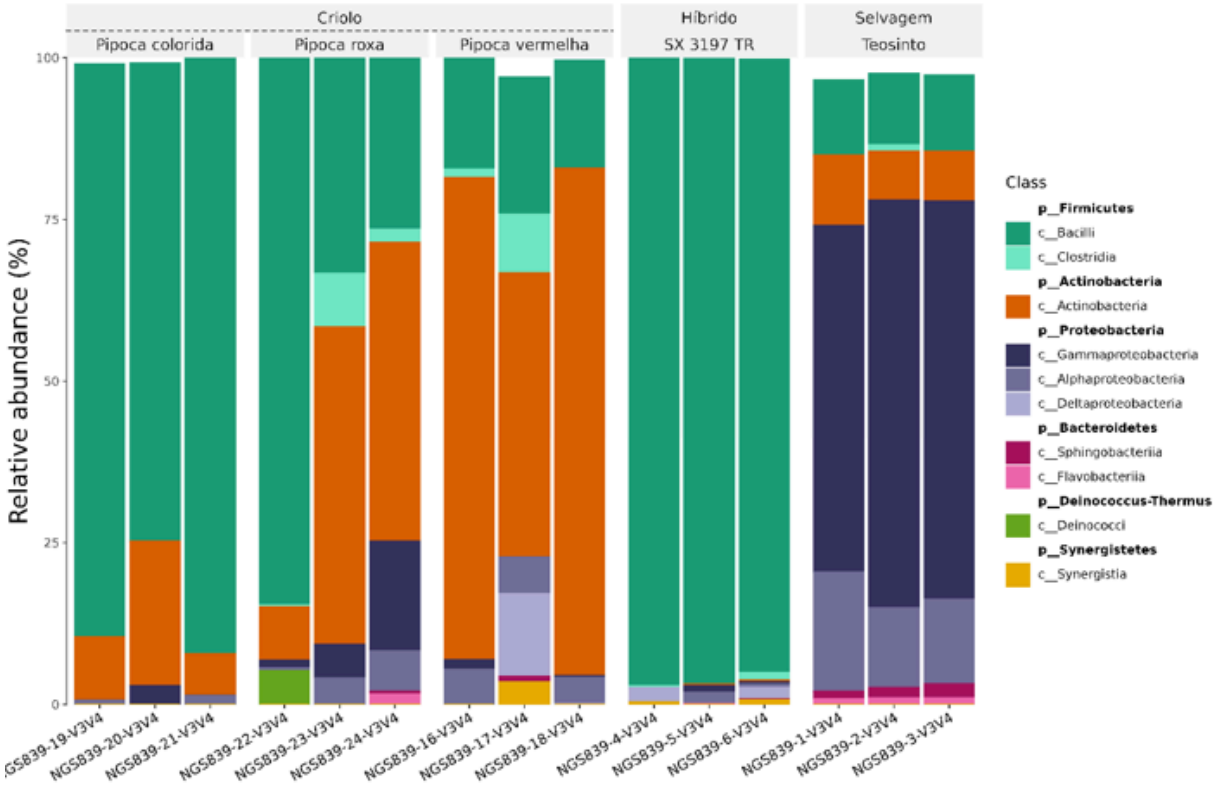
Fonte: autoria própria, 2025

A abundância relativa das principais classes bacterianas encontra-se na Figura 15. Firmicutes composto predominantemente pela classe *Bacilli* foi aquela presente no MPC e no MH em maior abundância. Actinobacteria foi a classe mais contundente entre as variedades crioulas, com baixa presença no MH. Proteobacteria representada em abundância pelas classes *Gamma e Alpha* foi mais abundante nas amostras de PS, enquanto a presença dessa classe é observada com menor abundância nas variedades crioulas. De maneira geral, o PS possui uma

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

distribuição de abundância mais densa de Proteobactérias Gamma e Alpha, com relativa presença de Actinobactérias e Firmicutes. As variedades crioulas, além da predominância de actinobactérias, também exibem outras classes em quantidades mais relevantes, como *Deltaproteobacteria e Synergistia* na variedade MPV e *Deinococci* no MPR.

Figura 16 - Abundância relativa das principais classes bacterianas associadas às amostras radiculares das variedades crioulas de milho-pipoca (Vermelha, Roxa e Colorida), do parente silvestre da espécie (Teosinto – *Zea luxurians*) e da variedade híbrida (SX 3197 TR)



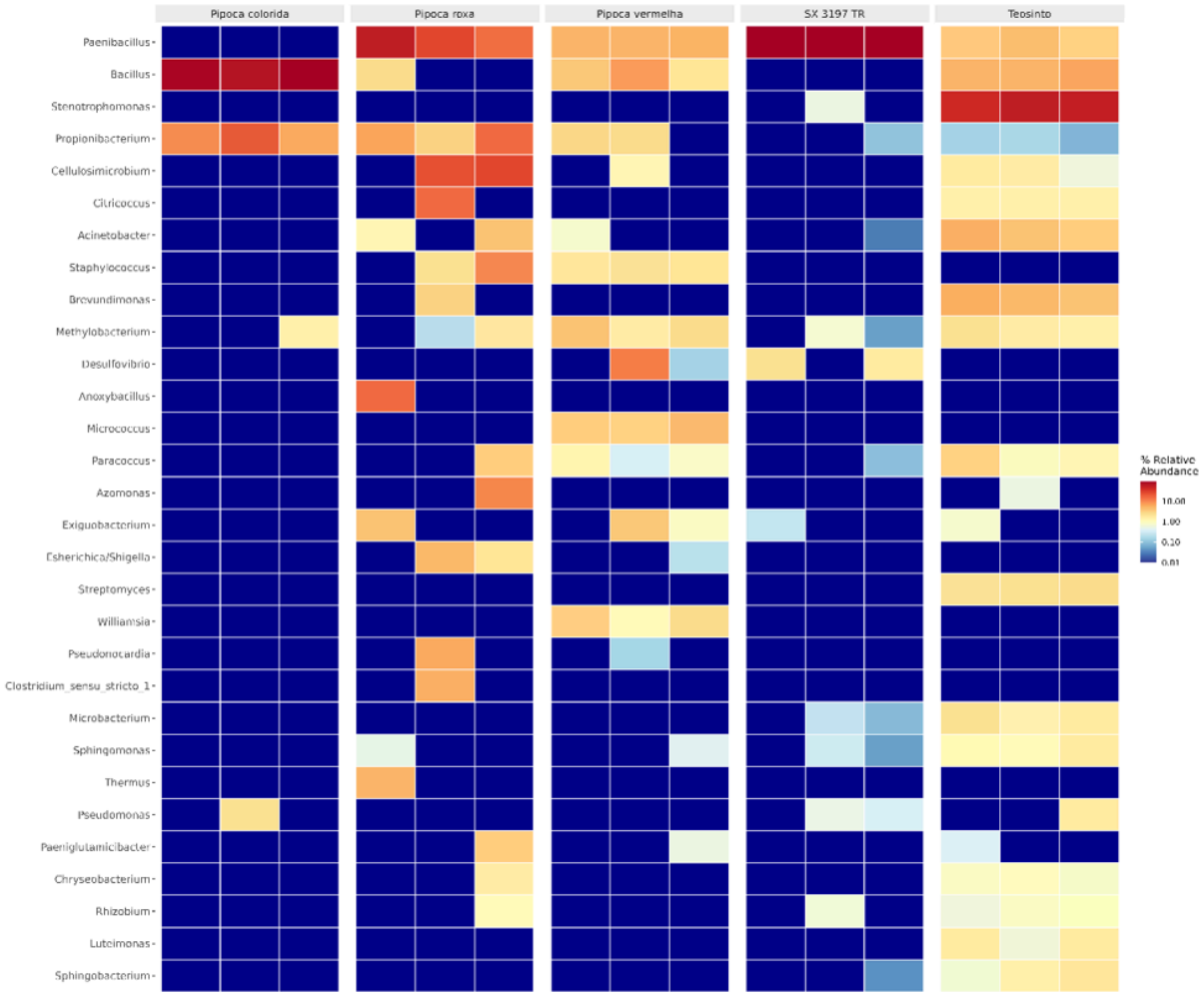
Fonte: autoria própria, 2025

Os 30 principais gêneros bacterianos mais abundantes encontram-se representados na Figura 16, cujas colorações estão associadas a diferentes porcentagens, sendo a coloração vermelha 10%, azul de 0% e amarela intermédio entre 0% a 10%. De forma geral, observa-se que o PS apresenta o gênero mais abundante composto por *Stenotrophomonas, Bacillus, Peanibacillus, Brevundimonas, Acinetobacter*, entre outros gêneros. Evidentemente, o PS também apresenta destaque para outros gêneros, como Cellulosimicrobium, Citricoccus, Methylobacterium, Microbacterium, Sphingomonas e Sphingobacterium, O MPC tem sua microbiota composta majoritariamente por *Bacillus* e *Propionibacterium*, mas

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

também por *Methylobacterium* e *Pseudomonas*. O MPR por *Peanibacillus*, Cellulosimicrobium e Propionibacterium, ademais de *Acinetobacter, Citricoccus, Staphylococcus, Esherichica/Shigella* e *Pseudonocardia*. Enquanto o MPV por *Paenibacillus, Bacillus, Micrococus e Methylobacterium* e por outros, como *Williamsia, Paracoccus, Staphylococcus e Desulfovibrio*. Sendo a variedade MH por *Paenibacillus, Desulfovibrio, Methylobacterium e Microbacterium.*

Figura 17 - Abundância relativa dos 30 principais gêneros bacterianos associados às raízes dos diferentes genótipos milho-pipoca crioula (Vermelha, Roxa e Colorida), do parente silvestre da espécie (Teosinto – *Zea luxurians*) e da variedade híbrida (SX 3197 TR)



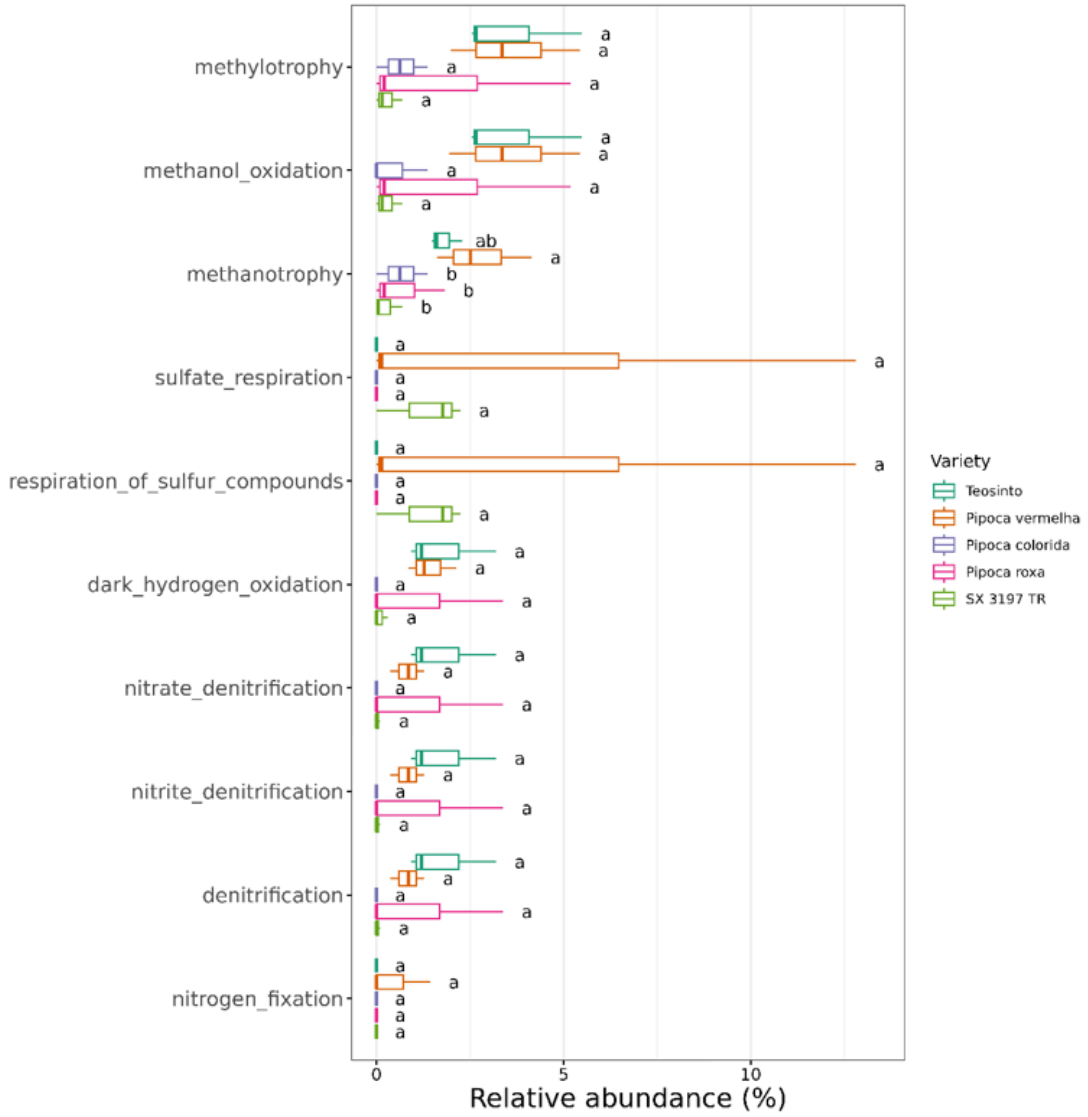
Fonte: autoria própria, 2024

Em relação a Anotação Funcional de Taxa Procariótica da microbiota (Figura 17), apenas com exceção de metanotrofia, todos os genótipos avaliados não apresentaram diferenças estatísticas para a média de abundância para as funções

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

metilotrófica, oxidação de metanol, respiração de sulfato, respiração de composto de enxofre, oxidação de hidrogênio escuro, desnitrificação de nitrato e nitrito desnitrificação e fixação de nitrogênio. A funcionalidade de metanotrofia, em que os microrganismos utilizam metano como fonte primária de carbono e energia, o MPV, juntamente com o PS, apresentaram maior abundância relativa e se destacam em relação às outras variedades.

Figura 18 - Anotação Funcional de Taxa Procariótica (FAPROTAX) da microbiota radicular de três genótipos de milho-pipoca crioulas de milho-pipoca (Vermelha, Roxa e Colorida), do parente silvestre da espécie (Teosinto – *Zea luxurians*) e da variedade híbrida (SX 3197 TR)



Fonte: autoria própria, 2025

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

5 DISCUSSÃO

5.1 DIVERSIDADE E IMPACTO DA DOMESTICAÇÃO E DO MELHORAMENTO GENÉTICO NA MICROBIOTA ENDOFÍTICA DAS VARIEDADES AVALIADAS

As variedades de milho avaliadas possuem microbiotas endofíticas singulares. A ausência de OTUs compartilhadas entre as variedades crioulas de milho-pipoca, o híbrido transgênico e o parente silvestre teosinto comprovam que as comunidades microbianas divergem e são influenciadas por fatores como a base genética e o ambiente em que são cultivadas. O PS refere-se a uma variedade que não sofre, ou sofreu pouca ação de seleção humana no processo de manutenção da variedade, que possui seu método de dispersão de sementes natural e é propagado em ambientes agrícolas sem insumos; as variedades de milho-pipoca são variedades de polinização aberta manejadas de acordo com as preferências dos agricultores, normalmente sob condições de cultivo agroecológicos; e por último, o MH que se caracteriza como uma variedade homogênea geneticamente, descende do cruzamento de indivíduos homozigotos, sendo cultivada em ambientes com alta entrada de insumos agrícolas. Em relação ao ambiente de cultivo, a título de exemplo, o PS se desenvolve em condições nas quais as pressões adaptativas são mais intensas, ou seja, há necessidade de adequação metabólica a diferentes períodos de irrigação, a dinâmicas ecológicas mais intensas, como incidência de pragas e doenças, e menor seletividade humana.

O elevado número de OTUs únicas observado no PS (339) sugere uma microbiota mais diversificada, possivelmente devido a sua adaptação em ambientes naturais que sofreram menos influência da domesticação e, nos quais, os fatores adaptativos bióticos e abióticos atuaram de maneira mais significativa, de modo a favorecer uma diversidade microbiana ampliada. Pode-se explicar esse fenômeno através da necessidade do PS de desenvolver relações simbióticas mais complexas para garantir sua sobrevivência frente aos estresses naturais, como a variação da umidade, ataques de pragas e patógenos, sem a proteção de insumos agrícolas.

Sob outro enfoque, a variedade MH, apesar de apresentar 237 OTUs exclusivas, retrata uma microbiota adaptada a sistemas agrícolas mais controlados. Os insumos agrícolas tendem a reduzir a pressão seletiva natural sobre os vegetais, devido a irrigação constante, uso de fertilizantes e agrotóxicos. Como resultado, a

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

microbiota endofítica do MH, pode estar mais voltada a garantir um rápido crescimento e desenvolvimento da planta do que às necessidades adaptativas a extremas variações ambientais. Ela tem OTUS específicas e em grande número, mas menor diversificação taxonômica, como *Firmicutes* apresentado em aproximadamente 80% da abundância relativa de filos, seguido por Proteobacteria e, em porcentagens menos significativas, *Bacteroidetes, Planctomycetes* e *Synergistetes*.

As variedades crioulas de milho pipoca, por sua vez, apresentam menor quantidade de OTUS, em relação ao PS e a MH. Esse é um fato curioso pois se trata de variedades de polinização aberta, de base genética ampla e, nessa condição, espera-se encontrar maior quantidade de OTUs. Deve-se investigar no futuro o processo de seleção praticada pelos agricultores e as práticas de manejo aplicadas, dado que não foi possível obter tais dados *a priori*. O que se percebe, de maneira geral, que apesar do menor número de OTUs do MPV (172 OTUs únicas), do MPR com 77 e do MPC que possui apenas 22 OTUs únicas, essas variedades detém maior diversificação taxonômica em nível de classe e gênero. As variações observadas entre as diferentes microbiotas endofíticas estudadas espelham uma complexa rede de interações microrganismo-hospedeiro regida tanto pelas questões adaptativas quanto pela característica genética das variedades e sua plasticidade adaptativa frente às condições ambientais distintas.

Assumindo a ótica de conservação dos recursos genéticos, as particularidades evidenciadas nas microbiotas endofíticas ressaltam a importância da preservação *ex situ* e *in situ on farm* das variedades tradicionais e teosinto. A singularidade da diversidade microbiana associada a cada fenótipo de milho estudado, evidencia o papel crucial dessas variedades na manutenção de comunidades microbianas, adaptadas aos diferentes contextos agrícolas e ambientais.

5.2 ABUNDÂNCIA RELATIVA, DIVERSIDADE TAXONÔMICA DO MICROBIOMA ENDOFÍTICO

5.2.1 - Análise taxonômica: filos bacterianos

O parente silvestre apresenta predominância dos filos Proteobacteria e Firmicutes, com presença de Actinobacteria, Bacteroidetes e Planctomycetes. De

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

acordo com Rivera Hernandez, Geovanny et al. (2024), proteobactérias estão relacionadas a produção de fitohormônios estimulantes de crescimento, como auxinas, além de produzirem enzimas líticas e suprirem a incidência de fitopatógenos quando presentes na microbiota endofítica. Firmicutes, segundo Hashmi; Bindschedler; Junier (2020), também estão relacionados ao crescimento vegetal atuando como biofertilizantes e são capazes de promover fitorremediação na interação planta-solo para absorção de metais pesados, além de biocontrole contra pragas e patógenos. As actinobactérias, atuam na supressão de doenças, podem ser usadas como biopesticidas e moduladores de crescimento (Shivlata; Satyanarayana, 2017).

Por outro lado, os Bacteroidetes e Planctomycetes tem papéis na ciclagem global de nutrientes e defendem o hospedeiro contra estresses bióticos e abióticos (Pan; Raaijmakers; Carrión, 2023) e regulam as vias biogeoquímicas referentes ao ciclo do carbono e nitrogênio (Kalam; Anirban, 2022), respectivamente. A presença significativa desses filos, que regulam o crescimento vegetal e que proporcionam proteção contra estresses bióticos e abióticos, aumentando a aptidão do hospedeiro, pode explicar a resistência e adaptabilidade do PS a ambientes dominados por pressões naturais, com maior incidência de pragas e fitopatógenos e variações nas ofertas hídricas e de nutrientes. Essas interações favorecem sua sobrevivência em diferentes contextos edafoclimáticos ao longo do processo de domesticação.

Assim como o PS, as variedades crioulas, que devem manter algum grau de características adaptativas, refletem as ações da seleção natural somadas à seleção humana durante o processo da domesticação, como a predominância de Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria em sua microbiota. Essas variedades tradicionais, cultivadas por gerações em Anchieta, adaptaram-se às condições ambientais e de plantio dessa localidade, o que pode ser evidenciado pela presença do filo Synergistetes, conhecido por ser resistente a altas temperaturas e condições extremas (Danilyan et al., 2023). Essa adaptação é especialmente presente nas variedades de MPV, uma vez que o milho enfrenta períodos de seca durante seu cultivo no município de Anchieta, em Santa Catarina (Martins et al., 2010).

A variedade crioula deMPR, além de alguns filos presentes no PS, a exceção de Planctomycetes, exibem o filo Deinococcus-Thermus, conhecidos por sua resistência à radiação ionizante e estresse oxidativo, com produção de proteínas de reparo do DNA (Tian; Hua, 2010). Essa característica pode auxiliar no desempenho

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

geral do hospedeiro ao longo dos meses de cultivo até a fase de colheita de que forma. Já a microbiota do MPC tem presença de Saccharibacteria, cujos efeitos simbióticos auxiliam na decomposição de hidrocarbonetos presentes na rizosfera e, dessa forma, na biodisponibilidade de nutrientes para aproveitamento de outras espécies bacterianas existentes na microbiota do hospedeiro (Starr et al., 2018).

Em contraste, o MH possui um perfil de microbiota, aparentemente, projetado, mesmo que de forma involuntária, para uma produção maior e mais rápida. Nesse sentido, argumenta-se que os filos Firmicutes e Proteobacteria mais abundantes presentes em tal variável promovem principalmente o crescimento do hospedeiro e sua proteção contra absorção abundante de metais pesados (Hashmi; Bindschedler; Junier, 2020) e não há foco em garantir a resistência natural da cultivar a pragas ou fitopatógenos, visto a menor quantidade de Synergistetes Bacteriodetes e Planctomycetes. Essa microbiota pode refletir um tipo de manejo em que as condições ambientais são mais controladas, como a aplicação de fertilizantes químicos e irrigação, o que acarreta uma maior dependência de fatores externos para promover seu crescimento. Ao contrário das variedades crioulas de milho-pipoca e do PS, que apresentaram com uma microbiota mais especializada em resistir a fatores abióticos e bióticos, a variedade Híbrida transgênico tem tendência ao rápido crescimento e a alta produtividade, muitas vezes às custas de uma menor resiliência inata.

5.2.2 - Análise taxonômica: classes bacterianas

O PS possui predominância das classes *Alpha* e *Gammaproteobacteria.* As bactérias pertencentes a essas classes estabelecem relações simbióticas com a planta. Dentre essas relações, destacam-se a fixação de nitrogênio (Pini et al., 2011), a produção de antibióticos (Yang et al., 2024) e a degradação enzimática de carbono (Wang et al.,2024). Além da presença de *Sphingobacteriia* relacionadas a resistência a doenças fúngicas (Xu et al., 2020). Essas atividades são comumente associadas a potencialização do crescimento do hospedeiro e a resistência a estresses bióticos presentes no meio.

Paralelamente ao PS, as variedades crioulas também apresentam classes específicas de cada fenótipo, como *Deltaproteobacteria e Synergistia* no MPV, em que a primeira classe demonstra potencial de fixação de nitrogênio, especialmente em ambientes anaeróbios (Masuda et al.,2024), e a segunda está envolvido na

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

degradação de poluentes orgânicos sob condições anaeróbicas (Tawfik; Alhajeri; Nasr, 2024). Essa capacidade degradativa pode melhorar a tolerância do hospedeiro aos estresses ambientais, como na presença de solos contaminados ou pobres em oxigênio. Já a variedade crioula de MPR, além da presença de *Gammaproteobacteria,* exibe a classe *Flavobacteriia,* relacionado a proteção das plantas contra várias doenças causadas por bactérias e fungos através da produção de compostos orgânicos voláteis (Seo et al., 2024).

A variedade crioula de MPC, em contraponto, apresenta, as classes *Bacilli*, *Gammaproteobactéria* e *Actinobacteria* relacionadas, em geral ao crescimento do hospedeiro, à proteção contra patógenos bacterianos e fúngicos (Shivlata; Satyanarayana, 2017), biodisponibilidade de carbono por meio da degradação enzimática (Wang et al.,2024) e tolerância ao estresse ambiental (Figueiredo et al., 2009). O MH, em contraste com o PS e as variedades crioulas, apresenta predominância de *Bacilli* e *Clostridia*, cujas principais influências se dão na promoção do rápido crescimento do hospedeiro (Olanrewaju et al., 2021), enquanto classes relacionadas a resistência a patógenos ou estresses abióticos não estão presente de forma expressiva.

5.2.3 - Análise taxonômica dos principais gêneros bacterianos e anotação funcional diferenciada entre as variedades analisadas

Os gêneros *Stenotrophomonas, Bacillus, Acinetobacter e Brevundimonas* encontram-se de forma mais proeminente na análise de abundância de gêneros na microbiota do PS. *Stenotrophomonas* tem sido associado a uma emergente fonte de biofertilizantes e biopesticidas para uso em sistemas agrícolas, como substituto dos fertilizantes sintéticos (Kumar, et al., 2023). Enquanto *Bacillus* e *Acinetobacter*, como agentes endofíticos, têm sido empregados na promoção do crescimento de seu hospedeiro (Liu et al., 2023; Zhao; Wang; Zhao, 2014). As *Brevundimonas* podem ser usadas como bioinoculantes e promotores de crescimento vegetal a partir de sua capacidade de fixação de nitrogênio (Kumar; Gera, 2014).

A variedade crioula de MPC, assim como o PS, tem majoritariamente a presença de *Bacillus* em sua microbiota, além de *Propionibacterium* em que algumas espécies são relacionadas a prevenção de mutações causadas por agentes químicos e por radiação UV (Vorobjeva et al., 2004). Já na variedade MPR existe os gêneros *Paenibacillus* e *Cellulosimicrobium*, em que o primeiro associando-se a

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

produção de lipopeptídeos que têm sido descritos como agentes antimicrobianos na composição de produtos orgânicos para controle de patógenos vegetais (Olishevska; Nickzad; Deziel, 2019) e o segundo, pode ser relacionado com a degradação de celulose presente no meio para liberação e ciclagem de nutrientes do solo (Bao et al., 2019).

A variedade MPV, além de Peanibacillus e Bacillus, também apresenta abundância de *Micrococus* e *Methylobacterium.* Sendo que ambos os gêneros são associados a resistência a estresses ambientais (Patel et al., 2021) e promoção do crescimento e alargamento celular da parte aérea e da raiz das plantas (Grossi et al., 2020). No MH, de maneira mais expressiva, encontram-se os gêneros *Paenibacillus* e *Desulfovibrio*, em que o último é associado a ambientes anaeróbicos e conhecido por sua capacidade de reduzir sulfatos ao utilizar compostos de enxofre como parte de seu metabolismo (Demin et al., 2024).

Observou-se a funcionalidade metanotrofia na microbiota na variedade MPV e no PS em porcentagem diferencial das demais variedades estudadas. Tal característica está intimamente relacionada ao ciclo do carbono e a mitigação de gases do efeito estufa, o que sugere importantes implicações para potencializar estratégias de sustentabilidade agrícola (Aimen; Khan; Kanwal, 2018). A significativa presença desses microrganismos, nas duas variedades em comparação com as demais testadas, que quando isolados sugere um potencial biotecnológico singular que pode ser explorado para desenvolvimento de bioinsumos agrícolas capazes de modular a captura de carbono no solo ou até mesmo para redução de emissões de metano nos sistemas agrícolas (Guerrero-Cruz et al., 2021).

5.3 ANOTAÇÃO FUNCIONAL

Observou-se a funcionalidade metanotrófica na microbiota das variedades MPV e PS em porcentagem diferenciada das demais variedades estudadas. Tal característica está intimamente relacionada ao ciclo do carbono e à mitigação de gases do efeito estufa, uma vez que os microrganismos metanotróficos utilizam o metano, gás cuja capacidade de retenção de calor supera a do dióxido de carbono, como fonte de energia para seus processos metabólicos, convertendo-o em dióxido de carbono e água. Dessa maneira, diminui a incidência do metano na atmosfera terrestre (Rani et al., 2024).

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

Esses microrganismos despertam grande interesse para aplicações industriais e ambientais devido às suas características microbiológicas e metabólicas singulares. Eles podem ser empregados em engenharia bioquímica, biorremediação de poluentes como hidrocarbonetos halogenados, biotransformação de substratos orgânicos, como a produção de álcoois quirais, além da mitigação de gases de efeito estufa por meio da conversão do metano (Gonzalez-Gutierrez et al., 2022).

Os microrganismos metanotróficos oxidam o metano a fim de aproveitar essa energia sob condições óxicas e anóxicas, utilizando diferentes aceptores de elétrons para viabilizar a metabolização do composto (Knief, 2015). Como único sumidouro biológico natural de metano, os metanotróficos desempenham um papel crucial no ciclo global do carbono.

A maior presença de microrganismos metanotróficos na microbiota endofítica da variedade MPV e do PS destaca seu potencial para aplicações biotecnológicas no contexto agrícola. Esses microrganismos, ao metabolizar o metano absorvido a partir do solo ou da rizosfera, reduzem a emissão desse potente gás de efeito estufa, contribuindo para a mitigação do aquecimento global (Knief, 2015; Gonzalez-Gutierrez et al., 2022). Além disso, a oxidação do metano dentro dos tecidos vegetais pode estimular a produção de compostos que favorecem o crescimento das plantas, sugerindo um papel duplo na promoção da sustentabilidade agrícola e no aumento da produtividade. Diante disso, os microrganismos metanotróficos endofíticos emergem como recursos estratégicos para o desenvolvimento de bioinsumos voltados à redução de impactos ambientais e à promoção de práticas agrícolas mais eficientes (Bao et al., 2014; Guerrero-Cruz et al., 2021).

A presença significativa desses microrganismos nas duas variedades, em comparação com as demais testadas, indica um potencial biotecnológico promissor. Quando isolados, esses microrganismos podem ser explorados para o desenvolvimento de bioinsumos agrícolas, capazes de modular a captura de carbono no solo e contribuir para a redução das emissões de metano em sistemas agrícolas (Guerrero-Cruz et al., 2021). Essa funcionalidade sugere implicações relevantes para potencializar estratégias de sustentabilidade agrícola (Aimen; Khan; Kanwani, 2018).

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

5.4 LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS

A análise da microbiota endofítica em sementes crioulas de milho e do parente silvestre revela uma dimensão complexa e promissora para a biotecnologia agrícola. Algumas limitações ressaltam a necessidade de investigações mais abrangentes para elucidar a contribuição funcional das comunidades microbianas identificadas, especialmente considerando o papel estratégico que elas podem desempenhar na agricultura sustentável. Embora o estudo tenha identificado a diversidade taxonômica dessas comunidades microbianas, a funcionalidade específica dos microrganismos ainda permanece pouco explorada, limitando o entendimento sobre como esses organismos influenciam o desenvolvimento e a resiliência das culturas agrícolas

Por fim, a representatividade das amostras de germoplasma, alinhadas a uma profunda caracterização das condições de cultivo e manejo das variedades, utilizadas no estudo é outro aspecto que precisa ser ampliado. A diversidade genética das amostras é crucial para a robustez das análises microbiológicas, já que diferentes genótipos podem hospedar microbiotas distintas, com características únicas. Ampliar a coleta de germoplasma para incluir uma variedade maior de genótipos de milho crioulos, silvestres e outras formas melhoradas de milho, além de transgênicos, provenientes de diferentes regiões geográficas e condições ambientais, é fundamental para capturar toda a variabilidade genética e ecológica da espécie. Tal procedimento poderá revelar interações simbióticas exclusivas de determinados genótipos, juntamente com os seus ambientes, abrindo caminho para descobertas relevantes para a biotecnologia agrícola.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

6 CONCLUSÕES

A análise da microbiota endofítica das diferentes variedades de milho estudadas propõem uma relação estreita entre a diversidade microbiana, o processo de domesticação e as condições de cultivo. A hipótese inicial, de que a domesticação e o melhoramento genético, juntamente como cultivos com diferentes entradas de insumos, afetam a diversidade e a funcionalidade da microbiota endofítica foi reforçada pelos resultados obtidos.

O teosinto, por estar sujeito a pressões seletivas naturais, apresentou a microbiota mais diversificada e com elevados números de OTUs, com alta abundância de filos bacterianos associados à resistência a estresses bióticos e abióticos. As variedades crioulas de milho-pipoca, mesmo com menores números de OTUS, mantiveram classes de bactérias com características adaptativas, com a presença de microrganismos potencialmente benéficos para a sustentabilidade agrícola. Em contrapartida, a microbiota do milho híbrido transgênico, elevado em número de OTUS, porém concentrada em menor número de níveis taxonômicos, pode ter relação com a base genética estreita e refletiu o seu manejo em ambiente de cultivo mais controlado, com menor necessidade de resistência a fatores ambientais adversos, mas com maior eficiência na promoção do crescimento vegetal a curto prazo.

A ausência de OTUs compartilhadas entre as variedades analisadas reforça o argumento que fatores como base genética, manejo agrícola e condições ambientais influenciam diretamente a composição da microbiota endofítica. A diversidade microbiana encontrada nos diferentes genótipos analisados ressalta a importância da conservação da diversidade genética do milho e de seu microbioma, visto que algumas variedades, como o teosinto e as crioulas, podem representar fontes valiosas de microrganismos benéficos para o desenvolvimento de bioinsumos e estratégias agrícolas mais sustentáveis.

Abre-se perspectivas para investigações futuras, especialmente no aprofundamento da funcionalidade dos microrganismos endofíticos, bem como no isolamento destes, e na ampliação da representatividade de germoplasma de estudos. A compreensão detalhada dessas interações pode contribuir para o desenvolvimento de tecnologias agrícolas inovadoras, promovendo a resiliência das

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

culturas frente às mudanças climáticas e à redução do uso de insumos químicos.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

REFERÊNCIAS

AHUJA, M. R.; JAIN, S. Mohan (Ed.). **Genetic diversity and erosion in plants. Springer**, 2015.

AIMEN, A., Khan, M. S., & Kanwani, F. (2018). **Applications of Methanotrophs for Sustainable Environment.** Applied Biochemistry and Biotechnology, 186(2), 527-546.

AKHTAR, Nosheen et al. Holobiomes: **Structure and Functions. In: Plant Holobiome Engineering for Climate-Smart Agriculture**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024. p. 1-14.

ALLALI, Imane et al. **A comparison of sequencing platforms and bioinformatics pipelines for compositional analysis of the gut microbiome**. BMC microbiology, v. 17, p. 1-16, 2017.

ALMEIDA SILVA, N.; MALAQUIAS COSTA, F.; BERNARDI OGLIARI, J. **Conservação, diversidade e distribuição de variedades locais de milho e seus parentes silvestres no extremo Oeste de Santa Catarina, Sul do Brasil**. 2015. Tese de Doutorado. Tesis Doctorando en Recursos Genéticos Vegetales. Florianópolis, Brasil. Universidad Federal de Santa Catalina.

ALIBRANDI, Pasquale et al. **Diversity and structure of the endophytic bacterial communities associated with three terrestrial orchid species as revealed by 16S rRNA gene metabarcoding**. Frontiers in microbiology, v. 11, p. 604964, 2020.

ALVES, A.C. et al. Variedades locais de milho e a agricultura familiar do Extremo Oeste Catarinense. In: CANCI, A.; VOGT, G.A.; CANCI, I.J. **A diversidade das espécies crioulas em Anchieta: diagnóstico, resultados de pesquisa e outros apontamentos para a conservação da agrobiodiversidade**. São Miguel do Oeste: Mclee, 2004, p. 67-85.

ANDRÉ, Rafael Vidal. **Diversidade das populações locais de milho de Anchieta e Guaraciaba, Oeste de Santa Catarina: múltiplas abordagens para sua compreensão**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

BAO, Yuanyuan et al. **Bacterial communities involved directly or indirectly in the anaerobic degradation of cellulose**. Biology and Fertility of Soils, v. 55, p. 201-211, 2019.

BAO, Z., et al. (2014). **Methanotrophic bacteria alter microbial community structure and function in rice roots**. Microbial Ecology, 68(3), 639–649.

BARRA, Patricio J. et al. **Formulation of bacterial consortia from avocado (Persea americana Mill.) and their effect on growth, biomass and superoxide dismutase activity of wheat seedlings under salt stress**. Applied Soil Ecology, v. 102, p. 80-91, 2016.

BRIDGEWATER, P.; ROTHERHAM, I. D.; ROZZI, R. **A critical perspective on the concept of biocultural diversity and its emerging role in nature and heritage conservation**. Pessoas e Natureza, v. 1, n. 3, p. 291–304, 2019.

BUSBY, Posy E.; PEAY, Kabir G.; NEWCOMBE, George. **Common foliar fungi of Populus trichocarpa modify Melampsora rust disease severity.** New Phytologist, v. 209, n. 4, p. 1681-1692, 2016.

BUCKLER, Edward S.; STEVENS, Natalie M. Maize origins, domestication, and selection. In: Darwin's harvest: **New approaches to the origins, evolution, and conservation of crops.** Columbia University Press, 2006. p. 67-90.

CAMARGO, Antônio Pedro. **Investigação metagenômica dos microbiomas de plantas adaptadas à limitação nutricional,** 2021. Tese de Doutorado. [s.n.].

CANKAR, Katarina et al. **Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce** (Picea abies L. Karst). FEMS microbiology letters, v. 244, n. 2, p. 341-345, 2005.

CARPENTIERI-PÍPOLO, V.; TAKAHASHI, H. W.; ENDO, R. M.; PETEK, M. R.; SEIFERT, A. L. **Correlações entre caracteres quantitativos em milho-pipoca.** Horticultura Brasileira, Brasília, v. 20, n. 4, p. 551-554, 2002.

COBO-DÍAZ, José Francisco et al. **Combined metabarcoding and co-occurrence network analysis to profile the bacterial, fungal and Fusarium communities and**

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

their interactions in maize stalks. Frontiers in Microbiology, v. 10, p. 261, 2019.

CORRÊA, PAULO CESAR; MACHADO, PATRÍCIA FONTES; ANDRADE, ET de. **Cinética de secagem e qualidade de grãos de milho-pipoca**. Ciência e Agrotecnologia, v. 25, n. 1, p. 134-142, 2001.

COSTA, Flaviane Malaquias. **Padrões de dispersão e conservação da diversidade genética do milho (Zea mays ssp. mays) nas terras baixas da América do Sul**. 2020. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

COSTA, Flaviane Malaquias et al. **Archaeological findings show the extent of primitive characteristics of maize in South America.** Science Advances, v. 10, n. 36, p. eadn1466, 2024.

COUTIÑO, E. B.; VÁZQUEZ, C. G.; TORRES, M. B.; SALINAS, M. Y. **Calidad de grano, tortillas e botanas de variedades de maíz de la raza comiteco**, 2008.

DASH, B. et al. **Verrucomicrobia in soil: An agricultural perspective**. In: FRONTIERS IN SOIL AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. CRC Press, 2020. p. 37-46.

DA COSTA STUART, Andressa Katiski; STUART, Rodrigo Makowiecky; PIMENTEL, Ida Chapaval. **Effect of agrochemicals on endophytic fungi community associated with crops of organic and conventional soybean (Glycine max L. Merril).** Agriculture and Natural Resources, v. 52, n. 4, p. 388-392, 2018.

DE ABREU, A. G.; PADUA, J. G.; BARBIERI, R. L. **Conservação e uso de recursos genéticos vegetais para a alimentação e a agricultura no Brasil: 2012 a 2019**. 2022.

DE BOEF, W. S.; STHAPIT, B. R.; UPADHAYA, M. P.; SHRESTHA, P. K. **Estratégias de conservação em unidades de produção familiares.** In: DE BOEF, W. S.; THIJSSEN, M. H.; OGLIARI, J. B.; STHAPIT, B. R. (eds). Biodiversidade e agricultores: fortalecendo o manejo comunitário. Porto Alegre: L & PM, 2007, p. 45-52.

DE LIMA, B. C. et al. **Diversidade genética em acessos de milho crioulo**.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 10, p. 82712-82726, 2020.

DEMIN, Konstantin A. et al. **Sulfate-reducing bacteria unearthed: ecological functions of the diverse prokaryotic group in terrestrial environments**. Applied and Environmental Microbiology, v. 90, n. 4, p. e01390-23, 2024.

FALEIRO, F. G. et al. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro - desafios da pesquisa**. In: Maracujá: germoplasma e melhoramento genético, v. 1, p. 186-210, 2005.

FIGUEIREDO, José Edson Fontes et al. **Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus Bacillus isolated from tropical maize (Zea mays L.)**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 40, p. 522-534, 2009.

FONES, Helen N. et al. **Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens**. Nature Food, v. 1, n. 6, p. 332-342, 2020.

GAMAGE, Ashoka et al. **O papel da agricultura orgânica para alcançar a sustentabilidade na agricultura**. Sistema Agrícola, v. 1, n. 1, p. 100005, 2023.

GOEDERT, C.O.; WETZEL, M.M.V.S.; COSTA, I.R.S. et al. **Rede de bancos de recursos genéticos. Brasília**, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 43 p. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 69.

GROSSI, Cecilia Eugenia María et al. Methylobacterium sp. 2A **is a plant growth-promoting rhizobacteria that has the potential to improve potato crop yield under adverse conditions**. Frontiers in plant science, v. 11, p. 71, 2020.

GUTIÉRREZ FLORES, Carina. **Filogeografía y estructura genética poblacional del cardón Pachycereus pringlei en el Noroeste de México**. 2015.

HARDOIM, Pablo R. et al. **The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes**. Microbiology and molecular biology reviews, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HASHMI, Isha; BINDSCHEDLER, Saskia; JUNIER, Pilar. **Firmicutes. In: BENEFICIAL MICROBES IN AGRO-ECOLOGY.** Academic Press, 2020. p. 363-396.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

HAZELL, Peter BR. Transforming agriculture: **The green revolution in Asia**. 2009.

HEISER, Charles B. **Aspects of unconscious selection and the evolution of domesticated plants**. Euphytica, v. 37, p. 77-81, 1988.

HODGKIN, Toby; BORDONI, Paul. **Climate change and the conservation of plant genetic resources**. Journal of Crop Improvement, v. 26, n. 3, p. 329-345, 2012.

JACOBS, SARAH HENAUT. **O microbioma residente do milho e seu potencial biotecnológico**, 2023.

JACOBS, Sarah Henaut et al. **Análise metagenômica do bacterioma residente de Zea mays L.** In: Congresso Fluminense de Pós-Graduação-CONPG. 2023.

JACQUES, Peter J.; JACQUES, Jessica Racine. **Monocropping cultures into ruin: the loss of food varieties and cultural diversity**. Sustainability, v. 4, n. 11, p. 2970-2997, 2012.

JOHNSTON-MONJE, D.; RAIZADA, M. N. **Plant and Endophyte relationships: nutrient management.** Comprehensive biotechnology, 2nd edn. Academic, Burlington, p. 713-727, 2011.

KALAM, Sadaf; ANIRBAN, B. A. S. U.; PODILE, Appa Rao. **Difficult-to-culture bacteria in the rhizosphere: The underexplored signature microbial groups.** Pedosphere, v. 32, n. 1, p. 75-89, 2022.

KANDEL, Shyam L.; JOUBERT, Pierre M.; DOTY, Sharon L. **Bacterial endophyte colonization and distribution within plants**. Microorganisms, v. 5, n. 4, p. 77, 2017.

KAUFMANN, M. P. **Resgate, conservação e multiplicação da agrobiodiversidade crioula: um estudo de caso sobre a experiência dos guardiões das sementes crioulas de Ibarama (RS).** 2014. 116 f. Dissertação (Mestrado em Extensão Rural) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

KHAMPHASAN, P.; LOMTHAISONG, K.; HARAKOTR, B.; SCOTT, M. P.; LERTRAT, K.; SURIHARN, B. **Effects of Mass Selection on Husk and Cob Color in Five Purple Field Corn Populations Segregating for Purple Husks**. Agriculture, v. 10,

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

n. 8, p. 311, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.3390/agriculture10080311. Acesso em: 02 fev. 2025.

KLEPKA, V.; FERREIRA, M. S.; CREPALDE, R. dos S. **O saber de comunidades tradicionais acerca do uso e preservação de sementes crioulas**. Revista Educação e Emancipação, São Luís, v. 14, n. 2, p. 318-347, 2021.

KOTTB, Metwally et al. **Trichoderma volatiles effecting Arabidopsis: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi**. Frontiers in microbiology, v. 6, p. 156172, 2015.

KUHNEN, S. et al. **Metabolic fingerprint of Brazilian maize landraces silk (stigma/styles) using NMR spectroscopy and chemometric methods.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 58, n. 4, p. 2194-2200, 2010.

KUMAR, Abhishek et al. **Stenotrophomonas in diversified cropping systems: friend or foe?**. Frontiers in Microbiology, v. 14, p. 1214680, 2023.

KUMAR, Ajay et al. **Entry, colonization, and distribution of endophytic microorganisms in plants**. In: Microbial endophytes. Woodhead Publishing, 2020. p. 1-33.

KUMAR, Varun; GERA, Rajesh. **Isolation of a multi-trait plant growth promoting Brevundimonas sp. and its effect on the growth of Bt-cotton**. 3 Biotech, v. 4, p. 97-101, 2014.

KLINDWORTH, Anna et al. **Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies**. Nucleic acids research, v. 41, n. 1, p. e1-e1, 2013.

Knief, C. (2015). **Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on pmoA as molecular marker**. Frontiers in Microbiology, 6, 1346.

LAURANCE, William F.; SAYER, Jeffrey; CASSMAN, Kenneth G. **Agricultural expansion and its impacts on tropical nature**. Trends in Ecology & Evolution, v. 29, n. 2, p. 107-116, 2014.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

LEE, Kendall et al. **Interaction between grasses and Epichloë endophytes and its significance to biotic and abiotic stress tolerance and the rhizosphere**. Microorganisms, v. 9, n. 11, p. 2186, 2021.

LI, Yunshi et al. **Plant phenotypic traits eventually shape its microbiota: A common garden test**. Frontiers in Microbiology, v. 9, p. 2479, 2018.

LIOTTI, Rhavena Graziela et al. **Characterization and comprehensive analysis of the ecological interaction networks of bacterial communities in Paullinia cupana var. sorbilis by 16S rRNA gene metabarcoding**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 35, p. 1-15, 2019.

LIU, Hongwei et al. **Values of indoor plants: diversity, colonization and benefits of endophytic bacteria**. Frontiers in Microbiology, v. 8, p. 2552, 2017.

LIU, Yongchuang et al. H**arnessing native Bacillus spp. for sustainable wheat production**. Applied and Environmental Microbiology, v. 89, n. 2, p. e01247-22, 2023.

LLOYD, Alan et al. **Advances in the regulatory model of MYB–bHLH–WD repeat (MBW) pigments: addition of a WRKY factor and co-option of a MYB anthocyanin for betalain regulation**. Plant and Cellular Physiology, v. 58, n. 9, p. 1431-1441, 2017.

LOBELL, D. B.; SCHLENKER, W.; COSTA-ROBERTS, J. **Climate trends and global crop production since 1980**. Science, Washington, D. C., v. 333, n. 6042, p. 616-620, 2011. DOI: 10.1126/science.1204531.

MARTINS, Sergio Roberto et al. **Mudanças climáticas e vulnerabilidade na agricultura: Desafios para desenvolvimento de estratégias de mitigação e adaptação.** Revista Brasileira de Ciências Ambientais (RBCIAMB), n. 17, p. 17-27, 2010.

MASSON, Anne-Sophie et al. **Deep modifications of the microbiome of rice roots infected by the parasitic nematode Meloidogyne graminicola in highly infested fields in Vietnam**. FEMS Microbiology Ecology, v. 96, n. 7, p. fiaa099, 2020.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

MASUDA, Yoko et al. **Global soil metagenomics reveals distribution and predominance of Deltaproteobacteria in nitrogen-fixing microbiome**. Microbiome, v. 12, n. 1, p. 95, 2024.

MAXTED, N.; GUARINO, L.; MYER, L. et al. **Towards a methodology on farm conservation of plant genetic resources**. Genetic Resources and Crop Evolution, The Netherlands, v. 49, p. 31-46, 2002.

MILAZZO, Carla et al. **High-throughput metabarcoding characterizes fungal endophyte diversity in the phyllosphere of a barley crop.** Phytobiomes Journal, v. 5, n. 3, p. 316-325, 2021.

MUNAKATA, Yuka et al. **Composition and functional comparison of vetiver root endophytic microbiota originating from different geographic locations that show antagonistic activity towards Fusarium graminearum**. Microbiological Research, v. 243, p. 126650, 2021.

NAGABHYRU, Padmaja et al. **Tall fescue endophyte effects on tolerance to water-deficit stress**. BMC biologia vegetal, v. 13, p. 1-17, 2013.

NAVYA, Botlagunta; BABU, Subramanian. **Comparative metataxonamic analyses of seeds and leaves of traditional varieties and hybrids of cucumber (Cucumis sativus L.) reveals distinct and core microbiome**. Heliyon, v. 9, n. 9, 2023.

NETTLES, Rachel et al. **Influence of pesticide seed treatments on rhizosphere fungal and bacterial communities and leaf fungal endophyte communities in maize and soybean. Applied soil ecology,** v. 102, p. 61-69, 2016

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. **Endophytic and epiphytic microbes as "sources" of bioactive agents**. Frontiers in chemistry, v. 3, p. 34, 2015.

OLANREWAJU, Oluwaseyi Samuel et al. **Genome mining of three plant growth-promoting Bacillus species from maize rhizosphere**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 193, n. 12, p. 3949-3969, 2021.

OLISHEVSKA, Snizhana; NICKZAD, Arvin; DÉZIEL, Eric. **Bacillus and Paenibacillus secreted polyketides and peptides involved in controlling human**

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

and plant pathogens. Applied microbiology and biotechnology, v. 103, p. 1189-1215, 2019.

OLSEN, Kenneth M.; WENDEL, Jonathan F. **A bountiful harvest: genomic insights into crop domestication phenotypes.** Annual Review of Plant Biology, v. 64, n. 1, p. 47-70, 2013.

PARKS, Donovan H. et al. **Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life.** Nature microbiology, v. 2, n. 11, p. 1533-1542, 2017.

PATEL, Palak et al. **Plant growth promoting traits of marine Micrococcus sp. with bio-control ability against Fusarium in chickpea plant**. Vegetos, v. 34, n. 1, p. 94-101, 2021.

PATIL, Basavaprabhu L.; NARAYAN, Karthik S.; GOPALKRISHNA, Amulya M. **Diversity profiling of seed associated endophytic microbiome in important species of Caricaceae family.** Microbiology Research, v. 12, n. 4, p. 779-792, 2021

PASCALE, Alberto et al. **Modulation of the root microbiome by plant molecules: the basis for targeted disease suppression and plant growth promotion**. Frontiers in plant science, v. 10, p. 1741, 2020.

PAŠAKINSKIENĖ, Izolda et al. **Diversity of endophytic fungi and bacteria inhabiting the roots of the woodland grass, Festuca gigantea (Poaceae)**. Diversity, v. 16, n. 8, p. 453, 2024.

PETRONI, Katia; PILU, Roberto; TONELLI, Chiara. **Anthocyanins in corn: a wealth of genes for human health**. Planta, v. 240, p. 901-911, 2014.

PIMENTA NETO, Antônio Alves et al. **Selection of cocoa progenies for resistance to witches' broom**. Tropical Plant Pathology, v. 43, p. 381-388, 2018.

PINGALI, Prabhu L. **Green revolution: impacts, limits, and the path ahead. Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 31, p. 12302-12308, 2012.

PURUGGANAN, Michael D. **Evolutionary insights into the nature of plant**

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

domestication. Current Biology, v. 29, n. 14, p. R705-R714, 2019.

RANI, Anju et al. **Methanotrophy: a biological method to mitigate global methane emission**. Microbiology Research, v. 15, n. 2, p. 634-654, 2024.

RAMÍREZ REYNOSO, Omar et al. **Quality of cob and grain in creole corn of the Costa Chica, Guerrero**. Revista mexicana de ciencias agrícolas, v. 11, n. SPE24, p. 239-246, 2020.

REVILLA, Pedro; OLIVEIRA, Adriana M.; TRACY, William F. **Pesquisa de milho doce ao redor do mundo 2015-2020**. Agronomia, v. 11, n. 3, p. 534, 2021.

ROUF SHAH, Tajamul; PRASAD, Kamlesh; KUMAR, Pradyuman. **Maize—A potential source of human nutrition and health: A review**. Cogent Food & Agriculture, v. 2, n. 1, p. 1166995, 2016.

SALINAS, M. Y.; CRUZ, C. F. J.; DÍAZ, O. S. A. y CASTILLO, G. F. **Granos de maíces pigmentados de Chiapas, características físicas, contenido de antocianinas y valor nutracéutico**. Revista Fitotecnia Mexicana, v. 35, n. 1, p. 33-41, 2012.

SEO, Hyojun et al. **The Plant-Associated Flavobacterium: A Hidden Helper for Improving Plant Health.** The Plant Pathology Journal, v. 40, n. 3, p. 251, 2024.

SHARMA, Manju; KANSAL, Rekha; SINGH, Dinesh. **Endophytic microorganisms: their role in plant growth and crop improvement**. In: Crop improvement through microbial biotechnology**.** Elsevier, 2018. p. 391-413.

SHAVER, Irene et al. **Social and ecological outcomes of agricultural intensification in Costa Rica and the future of biodiversity conservation in tropical agricultural regions.** Global Environmental Change, v. 32, p. 74-86, 2015.

SHIVLATA, L.; SATYANARAYANA, Tulasi. **Actinobacteria in agricultural and environmental sustainability**. Agro-Environmental Sustainability: Volume 1: Managing Crop Health, p. 173-218, 2017

SILVA, Maria Luiza Ribeiro Bastos et al. **Diversidade da microbiota endofítica na cultura da palma (Opuntia spp. e Nopalea spp.) no Semiárido de Pernambuco.**

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

Pesquisa Agropecuária Pernambucana, v. 19, n. 1, p. 3-10, 2014.

SINGH, Raksha; GOODWIN, Stephen B. **Exploring the corn microbiome: A detailed review on current knowledge, techniques, and future directions.** PhytoFrontiers™, v. 2, n. 3, p. 158-175, 2022.

SINGH, R. P. et al. **Varietal replacement rate: Prospects and challenges for global food security.** Global Food Security, v. 25, p. 100324, 2020.

SPIRITO, F.; VIELI, L.; MONTALBA, R. **Advancing towards an understanding of the relationship between culture and agrobiodiversity. A case study in Mapuche territory, southern Chile.** NJAS: Impact in Agricultural and Life Sciences, v. 94, n. 1, p. 1-23, 2022.

STITZER, Michelle C.; ROSS-IBARRA, Jeffrey. **Maize domestication and gene interaction**. New Phytologist, v. 220, n. 2, p. 395-408, 2018.

SUAREZ, Andres; GWOZDZ, Wencke. **On the relation between monocultures and ecosystem services in the Global South: A review**. Biological Conservation, v. 278, p. 109870, 2023.

STARR, Evan P. et al. **Stable isotope-informed genome-resolved metagenomics reveals that Saccharibacteria utilize microbially-processed plant-derived carbon**.Microbiome, v. 6, p. 1-12, 2018.

SHIVLATA, L.; SATYANARAYANA, Tulasi. **Actinobacteria in agricultural and environmental sustainability**. Agro-Environmental Sustainability: Volume 1: Managing Crop Health, p. 173-218, 2017.

TAWFIK, Ahmed; ALHAJERI, Nawaf S.; NASR, Mahmoud. **Synergistic interaction of biochar, Phragmites australis, and rhizosphere microorganisms for enhanced 1, 4-dioxane biodegradation**. Journal of Water Process Engineering, v. 66, p. 105964, 2024.

TEIXEIRA, Flavia França; DOS SANTOS TRINDADE, Roberto. **Recursos genéticos de milho: importância e uso no melhoramento.** Revista Ifes Ciência, v. 7, n. 3, p. 01-22, 2021.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

TIAN, Bing; HUA, Yuejin. **Carotenoid biosynthesis in extremophilic Deinococcus–Thermus bacteria**. Trends in Microbiology, v. 18, n. 11, p. 512-520, 2010

VAVILOV, Nikolaĭ Ivanovich. **The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants**. 1949.

VALLOIS, A.C.C. **Conservação e uso de recursos fitogenéticos**. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 15., 1998, Piracicaba, SP. Anais Piracicaba: Esalq, 1998. p. 13-17.

VEIGA, R. F. A.; QUEIRÓZ, M. A. (Eds.). **Recursos Fitogenéticos: a base da agricultura sustentável no Brasil**. UFV, 2015.

VEJAN, Pravin et al. **Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. Molecules**, v. 21, n. 5, p. 573, 2016.

VELJKOVIĆ, Vlada B. et al. **Biodiesel production from corn oil: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 91, p. 531-548, 2018.

VOGT, Gilcimar Adriano. **A diversidade de variedades locais de milho em Anchieta, Santa Catarina**. Agropecuária Catarinense, v. 23, n. 1, p. 58-63, 2010.

VOGT, G. A. **A dinâmica do uso e manejo de variedades locais de milho em propriedades agrícolas familiares**. 2005. 127 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

WANG, Jiamin et al. **Conservation and Diversity of Seed-Associated Endophytes in Zea.** Molecular Microbiology Research, v. 14, 2024.

WANG, Zhikang et al. **Restoration via the aggregate spray-seeding technique affected the soil proteobacteria on an uninhabited island: Community structure, metabolic function, nutritional type, and life strategy**. Global Ecology and Conservation, v. 53, p. e03009, 2024.

WIK, Mette; PINGALI, Prabhu; BROCAI, Sumiter. **Global agricultural performance: past trends and future prospects**, 2008.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56

WOOLEY, John C.; GODZIK, Adam; FRIEDBERG, Iddo. **A primer on metagenomics**. PLoS Computational Biology, v. 6, n. 2, p. e1000667, 2010.

XU, Lian et al. **Complete genome sequence of Sphingobacterium psychroaquaticum strain SJ-25, an aerobic bacterium capable of suppressing fungal pathogens.** Current Microbiology, v. 77, p. 115-122, 2020.

YEOH, Yun Kit et al. **Evolutionary conservation of a core root microbiome across plant phyla along a tropical soil chronosequence**. Nature Communications, v. 8, n. 1, p. 215, 2017.

YUAN, Zhi-lin; ZHANG, Chu-long; LIN, Fu-cheng. **Role of diverse non-systemic fungal endophytes in plant performance and response to stress: progress and approaches**. Journal of plant growth regulation, v. 29, p. 116-126, 2010.

ZAFAR, Muhammad Mubashar et al. **Insect resistance management in Bacillus thuringiensis cotton by MGPS (multiple genes pyramiding and silencing)**. Journal of Cotton Research, v. 3, p. 1-13, 2020.

ZHAO, Lei; WANG, Fei; ZHAO, Jiao. **Identification and functional characteristics of chlorpyrifos‐degrading and plant growth promoting bacterium Acinetobacter calcoaceticus.** Journal of basic microbiology, v. 54, n. 5, p. 457-463, 2014.

ZEDER, Melinda A. et al. **Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology**. TRENDS in Genetics, v. 22, n. 3, p. 139-155, 2006.

Versão Final Homologada
28/04/2025 10:56