



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACNV)**

BIOTECNOLOGIA

**DIVERSIDADE MICROBIANA ENDOFÍTICA EM SEMENTES CRIOULAS DE
MILHO (*Zea mays* L.) E DE UM PARENTE SILVESTRE DA ESPÉCIE: UMA
ANÁLISE COMPARATIVA COM UMA VARIEDADE TRANSGÊNICA**

JULIA BENINI DOS SANTOS CARDOSO

Foz do Iguaçu
2025

**DIVERSIDADE MICROBIANA ENDOFÍTICA EM SEMENTES CRIOULAS DE MILHO
(*Zea mays L.*) E DE UM PARENTE SILVESTRE DA ESPÉCIE: UMA ANÁLISE
COMPARATIVA COM UMA VARIEDADE TRANSGÊNICA**

JULIA BENINI DOS SANTOS CARDOSO

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

JULIA BENINI DOS SANTOS CARDOSO

**DIVERSIDADE MICROBIANA ENDOFÍTICA EM SEMENTES CRIOULAS DE MILHO
(*Zea mays L.*) E DE UM PARENTE SILVESTRE DA ESPÉCIE: UMA ANÁLISE
COMPARATIVA 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. Nathalia Correa Chagas De Souza
UNILA

Dra. Thâmara Figueiredo Menezes Cavalcanti
UENF

Me Sarah Henaut Jacobs
UENF

Foz do Iguaçu, 04 de fevereiro de 2025.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Joseni dos Santos, que sempre sonhou os meus sonhos comigo, toda a gratidão pelo amor, pelas palavras de incentivo e apoio, pela confiança, encorajamento e força que, como uma mulher forte e independente, me ensinou a lutar pelos meus objetivos.

Ao meu pai, Fábio Cardoso e à minha madrasta Luciene Lima meus agradecimentos pelo lar, pelo carinho e pela torcida dedicada a mim durante esses anos de graduação. Aos meus irmãos, Isabella Rojas, Fábio Benini e Pedro Benini, meus agradecimentos pelo aconchego e pela oportunidade de dividir a vida com pessoas tão especiais.

À minha família, tanto aqueles de sangue quanto aqueles que meu coração escolheu, meus agradecimentos por sempre me apoiarem, vibrarem e torcerem por mim. Por me ensinarem sobre fé, amor e sobre a felicidade de voltar para casa. Vocês são parte de quem eu sou.

Aos meus queridos orientadores, Prof. Dr. Samuel Henrique Kamphorst e Prof^a. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos, agradeço pelo momento em que nossas vidas se cruzaram. Acredito que há pessoas que são colocadas em nosso caminho para marcar nossa vida e vocês marcaram a minha trajetória acadêmica com muito amor e dedicação. Agradeço por todo conhecimento a mim transmitido e por todo apoio e atenção, não apenas durante o período de orientação, mas durante toda a graduação. Vocês são exemplos inspiradores de professores e cientistas. Estendo os meus agradecimentos a Thaynara Carvalho, pelo suporte concedido durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos que a UNILA me deu, principalmente Ingrid Perdomo e Lívia Padilha, meus agradecimentos por traçarmos essa caminhada juntas, com muito companheirismo e carinho. Me transborda de alegria ter dividido esses anos tão especiais da minha vida com vocês. Aos amigos da minha cidade natal, principalmente Bruno Proença e Fábio Henrique, agradeço pela torcida que, mesmo de longe, se fez muito presente e por compartilharem da boa sensação de estar em casa.

À Universidade Federal da Integração Latino-Americana, faltam-me palavras para expressar todo meu agradecimento pela oportunidade de receber uma

educação gratuita e de excelência. É enriquecedora e transformadora a experiência de fazer parte da integração latino-americana.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), principalmente a Sarah Jacobs, Rafael Ribeiro e Prof. Thiago Venâncio, meus agradecimentos pela parceria na análise de dados.

Aos agricultores de Anchieta, verdadeiros guardiões de uma biodiversidade excepcional, meu sincero agradecimento por viabilizarem esta pesquisa. A generosidade em compartilhar conhecimentos e a dedicação à preservação dos milhos crioulos são inspiradoras.

*“Aquele que aprende e não coloca em prática é como
aquele que ara e não semeia”.*
Saadi

RESUMO

Este estudo investigou a diversidade microbiana das sementes de diferentes genótipos de milho, analisando o impacto da domesticação, do melhoramento genético e das práticas agrícolas sobre a microbiota. A hipótese foi de que a diversidade microbiana diminuiria conforme o aumento do nível de domesticação e a intensificação do uso de insumos no cultivo. Para testar essa hipótese, foram analisadas as radículas das plântulas germinadas de Teosinto (*Zea Luxurians*), parente silvestre do milho, três variedades crioulas (Colorido, Amarelão e Rajado) e do híbrido transgênico SX 3197 TR por meio de sequenciamento da região 16S rRNA. O Teosinto apresentou a maior diversidade microbiana, destacando-se como reservatório genético e microbiológico. Dentre as variedades crioulas, o milho Colorido mostrou maior diversidade em níveis taxonômicos superiores, sugerindo uma maior interação ecológica favorável à manutenção de microrganismos benéficos. Já as variedades Amarelão e Rajado apresentaram perfis mais próximos ao do milho transgênico, indicando que práticas agrícolas, como o maior uso de fertilizantes, podem estar reduzindo a variabilidade microbiana. O milho transgênico SX 3197 TR apresentou um número elevado de OTUs, mas menor diversidade em níveis taxonômicos superiores, sugerindo que grupos específicos de bactérias prosperam sob manejo intensivo. A composição da microbiota variou entre os genótipos, com predominância dos Filos Proteobacteria e Actinobacteria para o Teosinto. Já as variedades cultivadas apresentaram predominância de Firmicutes, indicando possíveis impactos do manejo agrícola sobre a estrutura microbiana. Gêneros como *Bacillus*, *Stenotrophomonas* e *Paenibacillus* foram identificados no Teosinto e em algumas variedades crioulas, sugerindo um potencial para aplicações biotecnológicas, como o desenvolvimento de bioinsumos agrícolas. A ausência de OTUs compartilhadas entre os genótipos reforça a singularidade da microbiota de cada variedade e destaca a importância da conservação da diversidade genética do milho para manter a microbiota associada a ele. A domesticação e o melhoramento genético, bem como os distintos ambientes agrícolas de cultivo podem influenciar a microbiota das sementes, com possíveis consequências para a adaptação e a resiliência das plantas em diferentes sistemas agrícolas. É necessário ampliar os estudos sobre o papel funcional das bactérias, incluindo seu isolamento, para explorar seu potencial em bioestimulantes agrícolas.

Palavras-chave: domesticação; melhoramento genético; microbiota; milho; diversidade; variedades crioulas.

RESUMEN

Este estudio investigó la diversidad microbiana de semillas de diferentes genotipos de maíz, analizando el impacto de la domesticación, el mejoramiento genético y las prácticas agrícolas en el microbiota. La hipótesis era que la diversidad microbiana disminuiría a medida que aumentara el nivel de domesticación y se intensificara el uso de insumos en el cultivo. Para probar esta hipótesis, se analizaron las raicillas de plántulas germinadas de teosinte (*Zea Luxurians*), un pariente silvestre del maíz, tres variedades locales (Colorido, Amarelão y Rajado) y el híbrido transgénico SX 3197 TR mediante la secuenciación de la región de ARNr 16S. El teocintle presentó la mayor diversidad microbiana, destacándose como reservorio genético y microbiológico. Entre las variedades locales, el maíz Colorido mostró una mayor diversidad en niveles taxonómicos más altos, lo que sugiere una mayor interacción ecológica favorable al mantenimiento de microorganismos beneficiosos. Las variedades Amarelão y Rajado presentaron perfiles más cercanos a los del maíz transgénico, lo que indica que las prácticas agrícolas, como el mayor uso de fertilizantes, pueden estar reduciendo la variabilidad microbiana. El maíz transgénico SX 3197 TR mostró una gran cantidad de OTU pero una menor diversidad en niveles taxonómicos más altos, lo que sugiere que grupos específicos de bacterias prosperan bajo un manejo intensivo. La composición del microbiota varió entre genotipos, con predominio del Phyla Proteobacteria y Actinobacteria para el Teosinte. Las variedades cultivadas mostraron predominio de Firmicutes, lo que indica posibles impactos del manejo agrícola en la estructura microbiana. Se han identificado géneros como *Bacillus*, *Stenotrophomonas* y *Paenibacillus* en el teosinte y algunas variedades locales, lo que sugiere un potencial para aplicaciones biotecnológicas, como el desarrollo de bioinsumos agrícolas. La ausencia de OTU compartidas entre genotipos refuerza la singularidad del microbiota de cada variedad y resalta la importancia de conservar la diversidad genética del maíz para mantener el microbiota asociado a él. La domesticación y la mejora genética, así como los diferentes entornos de cultivo agrícola, pueden influir en el microbiota de las semillas, con posibles consecuencias para la adaptación y resiliencia de las plantas en diferentes sistemas agrícolas. Es necesario ampliar los estudios sobre el papel funcional de las bacterias, incluido su aislamiento, para explorar su potencial en bioestimulantes agrícolas.

Palabras clave: domesticación; mejoramiento genético; microbiota; maíz; diversidad; variedades locales.

ABSTRACT

This study investigated the microbial diversity of seeds of different corn genotypes, analyzing the impact of domestication, genetic improvement and agricultural practices on the microbiota. The hypothesis was that microbial diversity would decrease as the level of domestication increases and the use of inputs in cultivation intensifies. To test this hypothesis, the radicles of germinated seedlings of Teosinte (*Zea Luxurians*), a wild relative of corn, three landraces (Colorido, Amarelão and Rajado) and the transgenic hybrid SX 3197 TR were analyzed by sequencing the 16S rRNA region. Teosinte showed the greatest microbial diversity, standing out as a genetic and microbiological reservoir. Among the landraces, Colored corn showed greater diversity at higher taxonomic levels, suggesting a greater ecological interaction favorable to the maintenance of beneficial microorganisms. The Amarelão and Rajado varieties presented profiles closer to those of transgenic corn, indicating that agricultural practices, such as the greater use of fertilizers, may be reducing microbial variability. The transgenic corn SX 3197 TR presented a high number of OTUs, but lower diversity at higher taxonomic levels, suggesting that specific groups of bacteria thrive under intensive management. The composition of the microbiota varied among genotypes, with a predominance of the Proteobacteria and Actinobacteria phyla for Teosinte. The cultivated varieties presented a predominance of Firmicutes, indicating possible impacts of agricultural management on the microbial structure. Genera such as *Bacillus*, *Stenotrophomonas* and *Paenibacillus* were identified in Teosinte and in some landraces, suggesting a potential for biotechnological applications, such as the development of agricultural bioinputs. The absence of OTUs shared among genotypes reinforces the uniqueness of the microbiota of each variety and highlights the importance of conserving the genetic diversity of corn to maintain the microbiota associated with it. Domestication and genetic improvement, as well as different agricultural cultivation environments, can influence seed microbiota, with possible consequences for plant adaptation and resilience in different agricultural systems. It is necessary to expand studies on the functional role of bacteria, including their isolation, to explore their potential as agricultural biostimulants.

Keywords: domestication; genetic improvement; microbiota; maize; diversity; creole varieties.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Evolução do milho a partir do teosinto: mudanças estruturais na espiga do milho ao longo do tempo.	16
Figura 2 - Características morfológicas da planta (A) e da espiga (B) do teosinto e do milho.	16
Figura 3 - Localização dos municípios de Anchieta e Guaraciaba, extremo Oeste de Santa Catarina, Sul do Brasil, local conhecido como um microcentro de diversidade do milho.	19
Figura 4 - Principais características relacionadas à montagem e manutenção do microbioma nas plantas: uma comparação entre um parente silvestre e uma variedade domesticada de milho.	20
Figura 5 - Genótipos diversos (em cores diferentes) de plantas silvestres (esquerda) filtrados por domesticação, tipos domesticados (meio), diversificação por radiações de plantas domesticadas (direita) e possíveis efeitos na microbiota vegetal.	21
Figura 6 - Genótipos de milho utilizados no estudo. Da esquerda para direita encontra-se o Teosinto, os milhos Colorido, Amarelão e Rajado, e a variedade híbrida transgênica SX 3197 TR.	24
Figura 7 - Diagrama de Venn mostrando o número de OTUs exclusivas e compartilhadas entre a microbiota de três variedades crioulas de milho (Colorido, Rajado e Amarelão), um parente silvestre da espécie (Teosinto) e uma variedade híbrida transgênica SX 3197 TR.	28
Figura 8 - Histogramas mostrando índices de alfa diversidade das radículas de três variedades crioulas de milho (Colorido, Rajado e Amarelão), um parente silvestre da espécie (Teosinto) e uma variedade híbrida transgênica (SX 3197 TR).	29
Figura 9 - Análise de coordenadas principais (PCoA) mostrando a beta diversidade da microbiota radicular de três variedades crioulas de milho (Colorido, Rajado e Amarelão), um parente silvestre da espécie (Teosinto) e uma variedade híbrida transgênica SX 3197 TR.	30
Figura 10 - Dendrograma ilustrando a abundância relativa dos principais filos bacterianos encontrados em três variedades crioulas de milho (Colorido, Rajado e Amarelão), um parente silvestre da espécie (Teosinto) e uma variedade híbrida transgênica SX 3197 TR.	31
Figura 11 - Heatmap da abundância relativa dos 30 principais táxons OTUs dominantes em nível de classe em três variedades crioulas de milho (Colorido,	

Rajado e Amarelão), um parente silvestre da espécie (Teosinto) e uma variedade híbrida transgênica SX 3197 TR 33

Figura 12 - Heatmap da abundância relativa dos 30 principais táxons OTUs dominantes em nível de gênero em três variedades crioulas de milho (Colorido, Rajado e Amarelão), um parente silvestre da espécie (Teosinto) e uma variedade híbrida transgênica SX 3197 TR. 35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
OBJETIVO GERAL	14
2 DESENVOLVIMENTO	15
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1.1 Domesticação de Plantas: Processo e Impactos	15
2.1.2 Conservação dos Recursos Genéticos Vegetais	17
2.1.3. Microbiota Endofítica: Papel e Interdependência no Ecossistema Planta- Microrganismo.....	19
2.1.4 Abordagens de <i>Metabarcoding</i> na Identificação de Táxons Microbianos	22
2.2 METODOLOGIA	24
2.2.1 Obtenção do Germoplasma de Milho.....	24
2.2.2 Desinfestação e Germinação das Sementes	25
2.2.3 Extração do DNA da Microbiota Endofítica	26
2.2.4. <i>Metabarcoding</i>	26
2.2.5 Processamento de Dados de Sequência	27
3 RESULTADOS	28
4 DISCUSSÃO	36
4.1 Diversidade Microbiana nos Diferentes Genótipos Estudados.....	36
4.2 Abundância Relativa de Filos e Classes Bacterianas	37
4.3 Relação entre Microbiota e Fenótipos Vegetais: Perspectivas e Usos Práticos	38
4.4 Impacto da Domesticação e do Melhoramento Genético na Microbiota Endofítica das Variedades de Milho Estudadas	40
4.5 Limitações do Estudo e Perspectivas.....	42
5 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

Ao longo de aproximadamente 10.000 anos, as espécies vegetais foram selecionadas e adaptadas para atender às necessidades alimentares e de produção dos seres humanos. Esse processo gradual e contínuo de seleção resultou em mudanças significativas nas características genéticas, fenotípicas e ecológicas das plantas, impactando não apenas a diversidade genética, mas também as interações com os microrganismos associados a elas, assim como o microbioma, que desempenhou um papel fundamental na evolução da agricultura e das sociedades humanas. (VEASEY *et al.*, 2011; BRISSON *et al.*, 2019)).

A microbiota bacteriana estabelece diversos tipos de interações com as plantas, que variam desde a simbiose até o parasitismo, ambas com potencial para beneficiar a agricultura por meio de produtos biotecnológicos (SIERRA, 2020). Essas bactérias exercem influência direta no crescimento vegetal por meio de mecanismos como a fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de fitormônios e indução de resistência a estresses, enquanto também contribuem indiretamente para o controle biológico de fitopatógenos (ISHIZAWA, 2017). Por exemplo, bactérias endofíticas como *Herbaspirillum seropedicae* demonstraram capacidade de promover o crescimento em várias espécies vegetais e de mitigar os efeitos do estresse hídrico em milho (LEANDRO, 2016).

Os microrganismos endofíticos podem ser encontrados em diferentes compartimentos da planta, incluindo a parte aérea, as raízes e as sementes. Nesse contexto, estudos destacam a influência significativa das bactérias endofíticas presentes nas sementes, tanto no crescimento das plantas, quanto no controle de fitopatógenos (GARCIA, KNAAK e FIUZA, 2016). Além disso, a microbiota das sementes é impactada pelo melhoramento genético das plantas, dado o contínuo processo de estreitamento de base genética das cultivares desenvolvidas, e pelo cultivo em ambientes com alta entrada de insumos agrícolas (GUTIERREZ e GRILLO, 2022). A caracterização e comparação das comunidades bacterianas de sementes de genótipos contrastantes, como parentes silvestres e variedades melhoradas de milho, pode ajudar a entender a estrutura e a dinâmica do holobioma vegetal, definido como a associação entre o organismo e seu microbioma (AGLER *et al.*, 2016).

As interações entre plantas e microrganismos são complexas e requerem pesquisas para preencher lacunas científicas, bem como para explorar novas possibilidades que contribuam para uma agricultura sustentável. Durante o processo de domesticação, a

diferenciação entre os microbiomas de plantas silvestres e cultivadas pode ser atribuída a variações ambientais e genéticas, que influenciam as interações planta-microbioma (CONTRERAS-LIZA, 2021). A redução na diversidade genética e nas características morfológicas das plantas cultivadas, bem como o cultivo constante em ambientes com abundância de adubos e agrotóxicos, em comparação com seus parentes silvestres, que vivem em ambientes com baixa interferência humana, pode afetar a composição e as funções não apenas dos microrganismos endofíticos, mas de todo o microbioma associado, influenciando a capacidade das plantas de resistir a estresses bióticos e abióticos (GUTIERREZ e GRILLO, 2022). Nesse contexto, lança-se a hipótese de que sementes de variedades modernas, tais como, uma híbrida transgênica, normalmente cultivada em ambientes com alta entrada de insumos, quando comparadas com variedades crioulas (cultivares tradicionais), majoritariamente manejadas por agricultores familiares em ambientes com adubação orgânica e/ou ausente, ou com algum parental silvestre do milho, que se desenvolve em ambientes com baixa interferência humana, apresentam a diversidade do microbioma afetada, resultando em menor diversidade de endofíticos residente nas sementes, dada a baixa necessidade de interagir com patógenos e pragas, e buscar aporte nutricional.

Para testar essa hipótese, dirigiu-se a um microcentro de diversidade da cultura, a cidade de Anchieta, em Santa Catarina, para coletar genótipos de milho crioulos conservados pelos agricultores familiares ao longo de gerações em ambientes com adubação orgânica e/ou ausente. Nesse local, identificou-se a presença do parente silvestre da cultura, a espécie *Zea Luxurians*, teosinto conhecido popularmente como dente-de-burro (SILVA *et al.*, 2015), cujo cultivo ocorre áreas marginais àquelas cultivadas ou em ambientes com baixa interferência humana. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo investigar se o processo de domesticação e o melhoramento genético, caracterizados pelo estreitamento da base genética das culturas agrícolas e pelo cultivo em ambientes com maior interferência humana, afetaram a diversidade e a composição do bacterioma residente das sementes de milho cultivadas, comparando-as com variedades crioulas e com o parente silvestre da cultura. Tais informações, se comprovadas particularidades na composição de endofíticos, poderão ser úteis para o desenvolvimento de insumos biotecnológicos aplicáveis em uma agricultura mais sustentável.

OBJETIVO GERAL

Caracterizar e comparar a diversidade bacteriana endofítica residente nas sementes de milho (*Zea mays L.*) de três variedades crioulas e de um parente silvestre (*Zea Luxurians*), em comparação com uma cultivar híbrida transgênica, visando um entendimento integrador da composição das comunidades bacterianas que podem ter sido influenciadas pelos processos de domesticação e melhoramento vegetal, dado o processo de estreitamento da base genética e diferenças nos ambientes de cultivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter sementes de milho crioulas, transgênica e silvestre, registrando informações sobre o manejo, origem e características das variedades coletadas.

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

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, por meio de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), as comunidades bacterianas associadas às sementes de cada genótipo.

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

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

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Domesticação de Plantas: Processo e Impactos

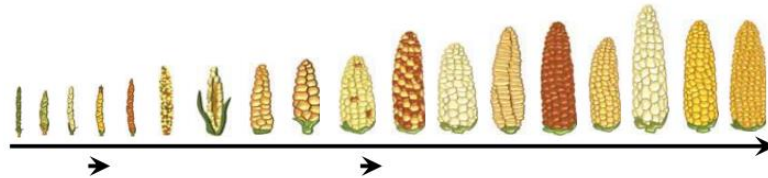
Originária do latim, a palavra "domesticar" tem sua etimologia associada à ideia de trazer para o "*domus*", o lar. A domesticação de espécies vegetais, iniciada há aproximadamente 10.000 anos, emerge como um processo de seleção, buscando adaptar uma determinada espécie ao ambiente moldado pelo homem, com foco em características de interesse (CLEMENT *et al.*, 2024). Esse processo foi fundamental para a agricultura moderna, tornando as plantas mais produtivas para atender às necessidades alimentares humanas.

Há milênios, sociedades de caçadores-coletores implementavam a domesticação como prática agrícola de forma autônoma em diversas regiões do mundo (JORGE, 2004). O processo de domesticação de plantas, caracterizado por sua natureza gradual e contínua, modificou ao longo do tempo as características das plantas, acarretando importantes repercussões ecológicas. À medida que a domesticação progride, a seleção realizada pelos humanos não apenas reduz a diversidade genética das espécies, mas também impacta na sua ecologia, fisiologia e fenótipo, conferindo instabilidade ao ambiente de cultivo e gerando interdependência entre a espécie e os cuidados humanos para a sua sobrevivência (PURUGGANAN, 2019).

A domesticação do milho ilustra claramente essa interação entre as plantas e as civilizações, principalmente os Maias e os Astecas, que se tornaram dependentes da cultura para suprir necessidades alimentares (COSTA, 2020). Nesse processo, as variedades de milho cultivadas também passaram a depender dos humanos para sobreviver, devido a características perdidas e/ou adquiridas na domesticação (MOLIN, 2012). Datada entre 7 e 10 mil anos atrás, a domesticação do milho transformou essa planta na principal espécie vegetal domesticada na América, devido à intensa seleção natural realizada pelos povos indígenas. De forma resumida, acredita-se que o milho tenha se originado a partir do teosinto, uma gramínea muito semelhante ao milho, porém com uma espiga muito pequena e grãos facilmente dispersos. As duas espécies são capazes de cruzar naturalmente e gerar descendentes férteis (UDRY e DUARTE, 2000). Na Figura 1, pode-se observar a transformação da estrutura da espiga do milho desde a sua evolução a partir do teosinto.

Notoriamente, as principais características transformadas estiveram relacionadas ao número de fileiras por espigas, bem como ao número e tamanhos dos grãos destas.

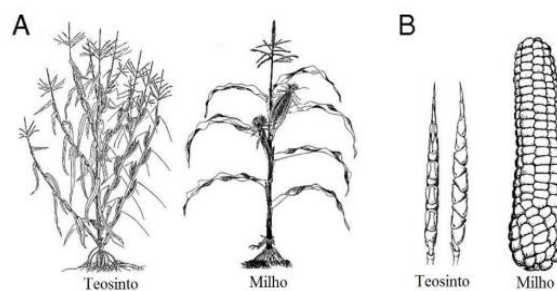
Figura 1 - Evolução do milho a partir do teosinto: mudanças estruturais na espiga do gênero *Zea* ao longo do tempo.



Fonte: Costa, 2020. Adaptado de Kistler et al., 2018.

O milho (*Zea mays* L. ssp. *mays*) é uma gramínea da família Poaceae, pertencente ao gênero *Zea* (SILVA, 2015). O gênero *Zea* é composto por cinco espécies que incluem o milho e seus parentes silvestres, chamados também de teosinte ou teosinto: *Z. mays*, *Z. diploperennis*, *Z. perennis*, *Z. luxurians* e *Z. nicaraguensis* (COSTA, 2020). Na Figura 2, encontram-se demonstradas as características morfológicas da planta e da espiga tanto do teosinto quanto do milho, onde pode-se perceber, de forma contundente, a redução no número de perfilhos da planta do teosinto, bem como o aumento do tamanho das espigas no milho domesticado.

Figura 2 - Características morfológicas da planta (A) e da espiga (B) do teosinto e do milho.



Fonte: Costa, 2020. Adaptado de Yang et al., 2019 e Doebley et al., 1990.

Utilizando mecanismos genéticos como, principalmente, deriva genética, mutações e processos de hibridação, a domesticação de plantas intensificou-se com o aumento populacional, resultando em uma significativa perda da diversidade genética nas culturas que passaram por tal processo, bem como a alteração da paisagem e das formas de cultivo (VEASEY et al., 2011). A domesticação levou a um processo de estreitamento da base genética devido ao processo de seleção; isto é, com o número reduzido de plantas

selecionadas para compor as sementes do próximo ciclo, parte dos alelos é perdida, bem como as frequências gênicas são alteradas. A redução da base genética é ainda mais acentuada pelo melhoramento genético formal, visto que as principais variedades utilizadas são híbridas, resultante do cruzamento de linhagens homocigóticas; por consequência, obtém-se a uniformidade genética.

Devido ao cultivo de plantas em ambientes mais tecnificados, com maior uso de insumos agrícolas, e aos desafios ambientais crescentes, tais como mudanças climáticas, poluição, escassez de recursos naturais e desmatamento, há a necessidade de aumentar a variabilidade genética de variedades modernas para que possam tolerar situações de estresse ou ataque de patógenos. Isso tem levado à busca de genes em espécies de plantas silvestres, bem como nas variedades crioulas, que são variedades tradicionais desenvolvidas e mantidas por agricultores ao longo das gerações, sem o uso de melhoramento genético formal (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 2020). É nos recursos genéticos vegetais que residem fontes promissoras para a prospecção de produtos biotecnológicos, os quais têm o potencial de impulsionar o desenvolvimento de estratégias sustentáveis para enfrentar os desafios ambientais e as questões decorrentes do aumento populacional, trazendo benefícios significativos para sociedade.

2.1.2 Conservação dos Recursos Genéticos Vegetais

Na atualidade, cujo modelo de agricultura é baseado na uniformidade genética e em ambientes agrícolas com excesso de aporte nutricional e agrotóxicos, a busca por genes em plantas silvestres e nas variedades crioulas, visando à ampliação da base genética no melhoramento, deve-se às ações de conservação dos recursos genéticos vegetais. Esses recursos constituem uma parte crucial da biodiversidade, com aplicação atual ou potencial para a humanidade. A conservação desses recursos surge como uma atividade estratégica, destinada a enfrentar os desafios presentes e futuros, assegurando a sustentabilidade da agricultura, a produção de alimentos para a crescente população global, a redução da pobreza e a garantia da segurança alimentar (BRASIL, 2020).

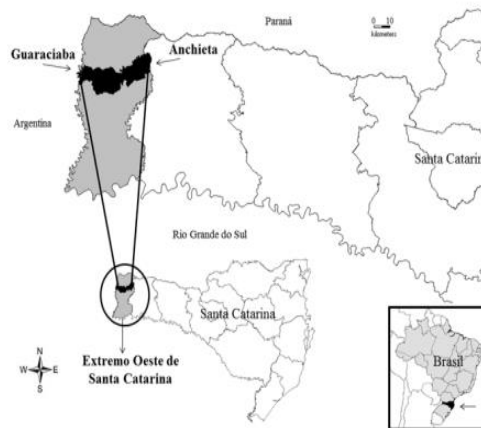
Dentre as estratégias para conservar os recursos genéticos vegetais, a conservação *in situ* possibilita a contínua evolução da espécie com o meio. Esta é definida, de acordo com a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), como a preservação dos ecossistemas e dos habitats naturais, bem como a manutenção e a reconstituição de populações viáveis de espécies em seus ambientes naturais e, no caso de espécies domesticadas e cultivadas, nos ambientes onde desenvolveram seus caracteres distintos

(BRASIL, 1992). No caso do milho, cujo centro de origem é o México, a conservação *in situ* é realizada nesse país, bem como em diversos outros locais do mundo, como os centros de diversidade, onde o milho domesticado desenvolveu suas características distintivas (TEIXEIRA e TRINDADE, 2021). Assim como a conservação *in situ* a conservação permite que as espécies cultivadas continuem seu processo evolutivo, ao mesmo tempo em que garantem a segurança alimentar de seus agricultores, visto que essas variedades são cultivadas por pequenos agricultores, comunidades locais e populações indígenas, na maioria das vezes (SANTONIERI e BUSTAMANTE, 2016).

Além dos métodos de conservação dentro dos habitats naturais, há a conservação *ex situ*, que consiste na manutenção fora do habitat natural de uma representatividade da biodiversidade com importância científica, econômica ou social (BRASIL, 2020). Este método visa manter a viabilidade de recursos genéticos em bancos de germoplasma, culturas de tecidos e/ou criogenia, por exemplo. Apesar de interromper os processos evolutivos, são métodos eficazes na conservação de genes por longos períodos e na conservação dos recursos genéticos em espaços reduzidos (SANTONIERI e BUSTAMANTE, 2016). A estratégia *ex situ* deve ser encarada com um *backup* de segurança da diversidade conservada *in situ* e *in situ on farm*, uma vez que as duas estratégias são complementares.

Quanto a espécie-alvo da pesquisa, o milho conta com a conservação de seus recursos genéticos, tanto *in situ*, *in situ on farm*, quanto *ex situ* ao redor do mundo. No Brasil, a Embrapa Milho e Sorgo desempenha um papel importante na conservação *ex situ*. A Instituição mantém o Banco Ativo de Germoplasma de Milho, cujo objetivo é manter a variabilidade genética da cultura e fornecer aos programas de melhoramento germoplasma que represente de forma adequada essa diversidade (TEIXEIRA *et al.*, 2006). No caso da conservação *in situ on farm*, foi identificado um microcentro de diversidade da cultura, localizado no Sul do país, na região do extremo oeste do Estado de Santa Catarina. Os microcentros de diversidade são assim denominados devido a áreas geográficas muito restritas, nas quais há uma acumulação significativa da diversidade (COSTA, 2020). Naquela região, que compreende aos municípios de Anchieta e Guaraciaba (Figura 3), os agricultores realizam o resgate, a conservação e o manejo da agrobiodiversidade, além de usarem o milho na alimentação humana e animal, desempenhando uma função social de extrema relevância cultural.

Figura 3 - Localização dos municípios de Anchieta e Guaraciaba, extremo Oeste de Santa Catarina, Sul do Brasil, local conhecido como um microcentro de diversidade do milho.



Fonte: Silva, 2015.

O potencial de atuação em programas de melhoramento genético foi observado nas variedades locais de Anchieta e Guaraciaba, principais municípios do microcentro de diversidade. De acordo com Costa (2020), as variedades locais conservadas naquele local apresentam elevado potencial produtivo e adaptativo, principalmente diante de estresses bióticos causados por fungos, bactérias, insetos e outros organismos biológicos, além de serem fontes naturais de carotenoides, antocianinas e compostos fenólicos. No local, são encontradas populações de teosinto, da espécie *Zea luxurians*, que estão presentes na região desde 1949 para fins forrageiros (SILVA et al., 2015).

Arelada às variedades locais conservadas no microcentro de diversidade, acredita-se que as sementes crioulas e silvestres do milho possuam uma microbiota endofítica residente, ou seja, microrganismos que habitam o interior das plantas. É possível que essa microbiota seja diferente da encontrada em sementes de milho melhoradas, como as híbridas, devido ao processo de estreitamento de base genética e ao cultivo em ambiente com adubação orgânica reduzida ou inexistente. A microbiota está intimamente ligada ao desempenho da planta, o que significa que as interações entre a planta e microrganismos podem fornecer vantagens adaptativas ao meio em que são cultivadas (HANEY et al., 2015).

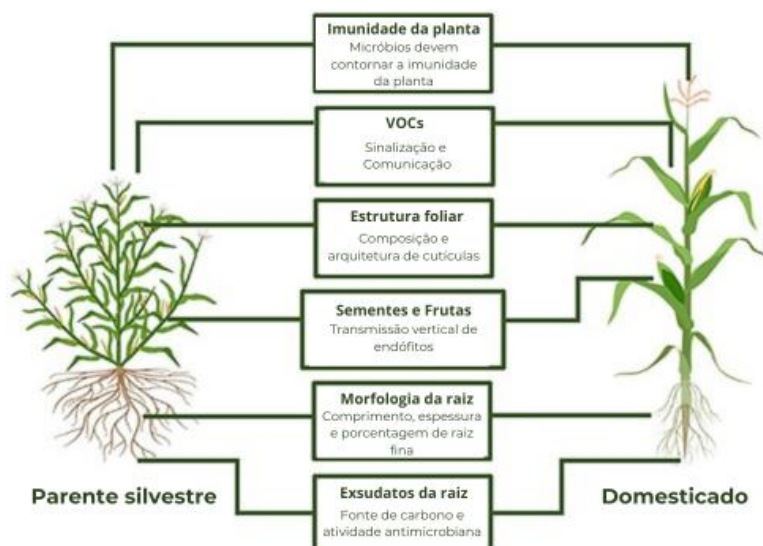
2.1.3. Microbiota Endofítica: Papel e Interdependência no Ecossistema Planta-Microrganismo

Sabe-se que todas as plantas vivas são hospedeiras de uma grande diversidade de microrganismos, incluindo fungos, bactérias, protozoários, vírus e arqueias, sejam estes

epifíticos ou endofíticos. Microrganismos epifíticos são definidos como microrganismos que vivem e se reproduzem na superfície foliar das plantas. Diferentemente dos epifíticos, os microrganismos endofíticos referem-se àqueles capazes de colonizar os tecidos internos da planta de forma assintomática, sem apresentar crescimento estendido para fora das plantas nem promover a formação de estruturas anômalas. No entanto, esses microrganismos associados, desempenham funções essenciais no desenvolvimento da planta, como fornecimento de nutrientes, auxílio na absorção de água, aumento da tolerância a estresses ambientais e defesa contra pragas (VIEIRA, 2015).

O conjunto de microrganismos que vivem em associação com as plantas recebe o nome de microbiota. A partir do microbioma, podemos afirmar que o fenótipo de uma planta não é determinado apenas pela sua resposta ao meio ambiente, mas também pela genética, pela microbiota associada, pela sua relação com o meio ambiente e pelas interações entre os membros do ecossistema (CONTRERAS-LIZA, 2021). Embora os microrganismos possam ser herdados por meio de sementes, rizomas, estacas e insetos, uma parte importante do microbioma é proveniente do ambiente circundante. Além de variações ambientais, variações genéticas desempenham um papel importante na estrutura dos microbiomas, visto que a seleção natural e os melhoristas de plantas atuam nessas variações (GUTIERREZ e GRILLO, 2022). Na Figura 4, é possível observar características que sofreram influência da manutenção do microbioma e que foram afetadas pelo processo de domesticação, a saber, a imunidade vegetal, a estrutura foliar, a morfologia radicular, entre outras.

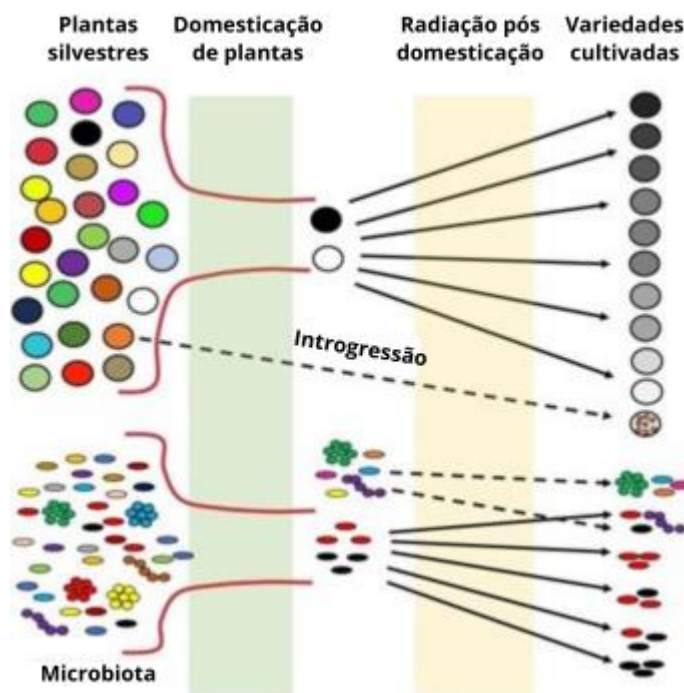
Figura 4 - Principais características relacionadas à montagem e manutenção do microbioma nas plantas: uma comparação entre um parente silvestre e uma variedade domesticada de milho.



Fonte: Adaptado de Gutierrez e Grillo, 2022.

Antes da domesticação, os parentes silvestres das plantas cultivadas evoluíram em associação com uma ampla variedade de microrganismos, que participavam de interações patogênicas, predatórias, comensais e mutualísticas (CONTRERAS-LIZA, 2021). Com a seleção de apenas alguns genótipos para o cultivo humano e em ambientes alterados por práticas agrícolas, observaram-se consequências, como perturbações negativas no microbioma das plantas (MARTINEZ-ROMERO *et al.*, 2020). Na Figura 5, é possível observar a diminuição na microbiota vegetal após as plantas passarem pelo processo de domesticação, indicando que a seleção de alguns genótipos causou perturbações, como a diminuição da microbiota residente, isto é, o conjunto de microrganismos que habitam de forma estável as superfícies e os tecidos internos das plantas, desempenhando funções essenciais no desenvolvimento e na proteção vegetal (EMBRAPA, 2025).

Figura 5 - Genótipos diversos (em cores diferentes) de plantas silvestres (esquerda) filtrados por domesticação, tipos domesticados (meio), diversificação por radiações de plantas domesticadas (direita) e possíveis efeitos na microbiota vegetal.



Fonte: Adaptado de Martinez-Romero *et al.*, 2020.

Durante o processo de domesticação e melhoramento de plantas, há uma considerável diminuição no tamanho efetivo da população vegetal, resultando na perda da diversidade genética devido aos efeitos fundadores e à deriva genética. Isso pode ocasionar a perda de alelos cruciais para as interações entre planta e microbioma, devido

aos gargalos associados à domesticação. Assim, embora os microbiomas vegetais não tenham sido alvo direto de seleção durante os processos de domesticação e do melhoramento vegetal, a diferenciação entre os microbiomas de plantas silvestres e cultivadas pode surgir devido às alterações induzidas pela domesticação nos fenótipos que influenciam as interações entre o hospedeiro e o microbioma (GUTIÉRREZ e GRILLO, 2022).

Com base no entendimento anterior, surge a hipótese de que a domesticação e o melhoramento, juntamente com a alteração dos ambientes agrícolas devido à alta entrada de insumos, possam ter impactado a estrutura da composição e as funções da microbiota associada, influenciando as interações planta-microbioma. Isso é corroborado pela observação de que plantas cultivadas, frequentemente, apresentam características inferiores às de seus progenitores silvestres em interações com o meio ambiente, tais como resistência a pragas e patógenos, tolerância à seca e aquisição de nutrientes, interações essas que são mediadas pelo microbioma (GUTIERREZ e GRILLO, 2022). Embora ainda haja poucos estudos sobre as alterações microbianas decorrentes da domesticação e seleção, os microbiomas contrastantes presentes nas sementes de parentes silvestres e de cultivares modernas têm despertado interesse. Essa compreensão pode orientar o desenvolvimento de soluções biotecnológicas para agricultura e contribuir para a conservação e restauração de microrganismos benéficos, promovendo a indução de tolerância ao estresse biótico e abiótico (CONTRERAS-LIZA, 2021). Nesse aspecto, as sementes abrigam uma diversidade de microrganismos que compõem o microbioma, sendo essa de grande interesse devido a possibilidade de transmissão vertical de endófitos para a progênie (JOHNSTON-MONJE e RAIZADA, 2011).

2.1.4 Abordagens de *Metabarcoding* na Identificação de Táxons Microbianos

Nos últimos anos, a análise de DNA ambiental e de DNA obtido a partir de amostras compostas por múltiplos organismos têm ganhado destaque em estudos voltados à biodiversidade (BOHMANN *et al.*, 2022). No âmbito da biodiversidade genética, o *metabarcoding* de DNA consolidou-se como a estratégia amplamente utilizada, destacando-se pela capacidade de identificar, de maneira direcionada e econômica, diversos táxons simultaneamente a partir de amostras ambientais, como solo, água e amostras contendo múltiplos organismos (BÁLINT *et al.*, 2014). Essa metodologia combina a amplificação por PCR de regiões específicas do DNA, conhecidas como *barcodes* genéticos, com o sequenciamento de nova geração (NGS) para identificar as espécies

presentes em uma amostra. No caso de microrganismos, genes altamente conservados, como o 16S rRNA para bactérias e o ITS para fungos, são frequentemente utilizados como alvos para amplificação (HEBERT *et al.*, 2003).

O *metabarcoding* permite a identificação simultânea de múltiplos táxons dentro de uma única amostra, agilizando o processamento e aumentando a eficácia na obtenção de dados. Quando aplicado em espécies microbianas, o *metabarcoding* oferece uma visão detalhada da dinâmica da população microbiana, além de determinar a abundância relativa de diferentes populações (MÉRIEUX NUTRISCIENCES, 2023). A técnica também se destaca pela alta sensibilidade e especificidade na identificação de espécies, configurando-se uma ferramenta poderosa para análises de comunidades biológicas complexas (COGHLAN *et al.*, 2012). Para a organização dos dados gerados por essa abordagem, são empregadas Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), que representam agrupamentos de sequências de DNA com alta similaridade e são amplamente utilizadas como unidades de organização taxonômica funcional em estudos de comunidades microbianas. Tradicionalmente, sua definição é baseada em um limiar de similaridade de aproximadamente 97% para o gene 16S rRNA em bactérias e arqueias, o que corresponde, de forma aproximada, ao nível de espécie (WEI *et al.*, 2021).

A técnica de *metabarcoding* tem gerado resultados importantes na identificação e caracterização de microbiomas associados a sementes de diversas espécies agrícolas, especialmente no milho (LIU *et al.*, 2013). Estudos demonstram que sementes são habitats complexos que abrigam comunidades microbianas diversas, sendo as bactérias dos filos Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes e os gêneros *Pantoea*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Sphingomonas* predominantes em 62 espécies de plantas (JOHNSTON-MONJE *et al.*, 2021). Assim como em outras culturas agrícolas, dados com base no sequenciamento e no isolamento, demonstram que as bactérias das sementes de milho também são dominadas por Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes, além da maioria dos fungos serem do filo Ascomycota (WALLACE, 2022).

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Obtenção do Germoplasma de Milho

A coleta de germoplasma de milho foi realizada no dia 16 de março de 2024, no Município de Anchieta, Santa Catarina. A cidade e a região foram reconhecidas como um micro-centro de diversidade da espécie *Zea mays* (SILVA, 2015). Antes da coleta de sementes, esta ação foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), por meio do número de Cadastro nº AE399EB. Em conjunto com as atividades de coleta das sementes, foi aplicado um questionário sobre os aspectos de manejo e conservação das variedades crioulas de milho. De maneira sucinta, utilizaram-se cinco genótipos de milho: o parente silvestre *Zea Luxurians*, as variedades crioulas Colorido, Rajado e Amarelão, e a cultivar híbrida transgênica SX 3197 TR, conforme exposto na Figura 6.

Figura 6 - Genótipos de milho utilizados no estudo. Da esquerda para direita encontra-se o Teosinto, os milhos Colorido, Amarelão e Rajado, e a variedade híbrida transgênica SX 3197 TR.



Fonte: Autoria própria, 2025.

O milho Colorido encontra-se cultivado pelo agricultor Deugênio Albertam, no município de Anchieta, em uma área de aproximadamente 7 mil metros quadrados, utilizando de 12 a 15 quilos de sementes para semeadura. Ele cultiva essa variedade há cerca de 7 anos, sem o uso de produtos químicos, sendo ele o responsável pelo plantio, colheita e armazenamento das sementes. A variedade teve origem a partir de uma doação de um vizinho e é usada tanto para alimentação animal, quanto para consumo familiar. O milho Amarelão, cultivado pelo agricultor Léo Chenet, também em Anchieta, é uma variedade de grãos dentados e coloração amarela. Ele cultiva a variedade há cerca de 40 anos, utilizando ureia e cama de aviário como adubos, empregando aproximadamente meio

quilo de sementes na semeadura. Ele é responsável pelos cuidados com a plantação e seleciona as melhores espigas para serem armazenadas. A semente foi adquirida em uma feira de trocas de sementes e é destinada ao consumo da família. Já sobre o milho Rajado, não foi possível obter informações sobre seu manejo, pois o agricultor responsável não foi encontrado, e as sementes foram fornecidas pela cooperativa local, a Cooper Anchieta.

Assim como o milho Rajado, as sementes de Teosinto foram fornecidas pela Cooper Anchieta. No entanto, o estudo realizado por Silva *et al.* (2015) informa que essa planta, localmente conhecido como “dente de burro”, possui ocorrência registrada na região desde 1949. O Teosinto apresenta origens diferentes, dependendo do agricultor que o cultiva. Alguns agricultores adquiriram sementes por meio de compra de outros agricultores, outros manejam plantas que ocorrem ou ocorriam nas suas propriedades, provavelmente desenvolvidas através da dispersão natural. 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. Contudo, 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.

O milho transgênico SX 3197 TR, foi adquirido da Baspan, marca registrada do grupo Basso Pancotte, com o Lote 238243312. Esse híbrido foi geneticamente modificado para desenvolver resistência ao glifosato. 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%.

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

2.2.2 Lavagem e Germinação das Sementes

As sementes foram lavadas seguindo o protocolo de Barra *et al.* (2016) e Acuña *et al.* (2023), com adaptações. Em fluxo laminar estéril, 45 sementes por genótipo foram imersas em etanol 75% por 2 minutos, seguidas de uma imersão em solução de hipoclorito de sódio (2,5 v/v) por mais 2 minutos e, posteriormente, enxaguadas três vezes com água destilada estéril por 5 minutos, sendo todas as etapas realizadas sob constante rotação

manual. Adicionalmente, alíquotas de 100 µL de água do último enxágue foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani, incubadas a 25 °C durante todo o período de germinação das sementes, para confirmar a ausência de bactérias epífitas nas sementes. Caso fossem detectados microrganismos, as repetições eram descartadas.

A germinação de 45 sementes por genótipo foi conduzida em placas de Petri 90x15 mm, contendo meio ágar-água, preparado de acordo com as instruções do fabricante. Este processo de germinação foi realizado em triplicata (três repetições) em placas de Petri individuais. As placas foram alocadas em Incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), onde permaneceram em condições controladas de luz (12 horas claro/escuro), a uma temperatura constante de 25 °C até o alongamento da primeira radícula para excisar os compartimentos das sementes, ou seja, cotilédones e eixos embrionários. A excisão e a coleta dos compartimentos de sementes foram realizadas com bisturis e pinças limpos com etanol 70% (v/v) e esterilizados.

2.2.3 Extração do DNA da Microbiota Endofítica

A extração de DNA das radículas das plântulas foi realizada por meio do protocolo estabelecido por Johnston-Monje e Raizada (2011) e Nanfack *et al.* (2024), com adaptações. As radículas foram submetidas à maceração, em almofariz e pistilo estéreis, com nitrogênio líquido. Os macerados foram transferidos para tubos plásticos estéreis de 2 mL e usados para extração de DNA com um kit DNeasy PowerSoil de acordo com as instruções do fabricante (Qiagen, Inc., Germantown, MD, EUA), conforme Acuña *et al.* (2023). Em seguida, o DNA foi quantificado para determinar sua concentração e pureza utilizando 1 µL de amostra no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), sendo selecionados somente os extratos que apresentavam uma relação de absorbância A260/A280 de ~ 1,8 para a análise molecular.

2.2.4. Metabarcoding

A biblioteca de *amplicons* do gene 16 S rRNA foi realizada conforme descrito no kit do sistema Illumina MiSeq e de acordo com o protocolo de serviço. As sequências de genes específicos alvos amplificados corresponderam às regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA, de acordo com Klindworth *et al.* (2013), sendo: 16S *amplicon* PCR *forward primer* 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3' e 16S *amplicon* PCR *reverse primer* 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-

3'.

2.2.5 Processamento de Dados de Sequência

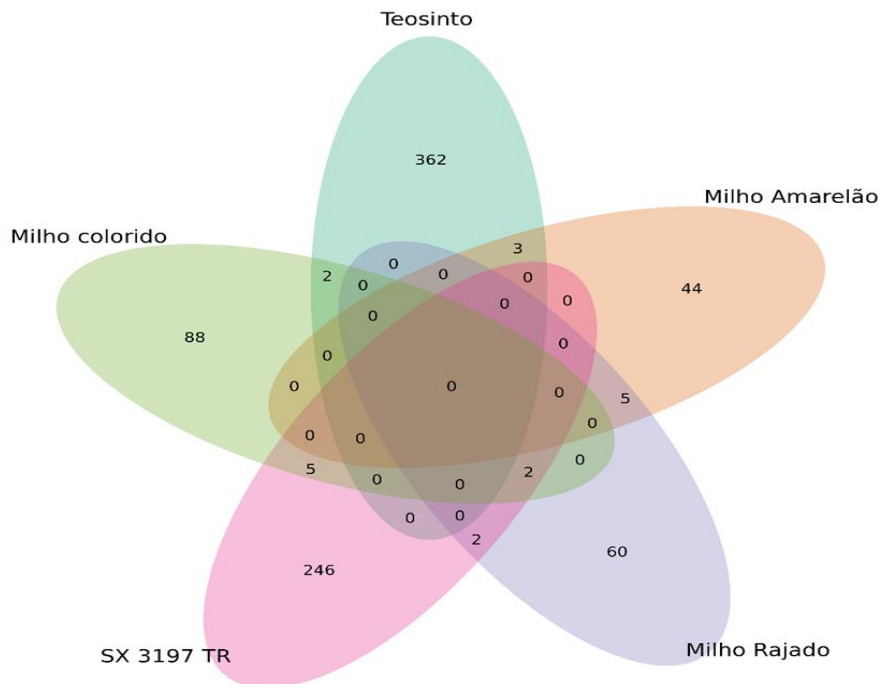
Os dados obtidos do *metabarcoding* foram submetidos a pré-tratamento e controle de qualidade das leituras brutas para garantir um conjunto de dados de alta qualidade que refletisse a real abundância e diversidade da microbiota presente na amostra. Regiões de baixa qualidade foram removidas utilizando o pacote DADA2 através da linguagem de programação R (CALLAHAN *et al.*, 2016). As unidades taxonômicas operacionais de alta qualidade resultantes (OTUs e índices estatísticos) foram estimadas utilizando os pacotes Phyloseq e Metacoder. Para descrever a diversidade beta entre as condições, as distâncias de Bray-Curtis foram calculadas usando a função *adonis2* do Vegan. A análise de coordenadas principais (PcoA) foi realizada usando a função *ordinate* do Phyloseq. A abundância diferencial de OTUs foi avaliada entre os diferentes grupos usando a análise de composições de microbiomas com correção de viés (ANCOM-BC) (LIN e PEDADDA, 2020).

3 RESULTADOS

Os dados obtidos por meio de técnica de *metabarcoding* da microbiota endofítica residente das três variedades crioulas de milho (Colorido, Rajado e Amarelão), de um parente silvestre (Teosinto) da espécie e de uma variedade híbrida transgênica (SX 3197 TR) foram representados por meio de diagramas de Venn, histogramas de alfa diversidade, análises de coordenadas principais (PCoA), dendrogramas de abundância relativa e *heatmaps*.

Conforme apresentado no Diagrama de *Venn* (Figura 7), observa-se a quantidade de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) únicas e compartilhadas entre a microbiota radicular das três variedades crioulas, um parente silvestre e uma variedade híbrida transgênica SX 3197 TR. O diagrama demonstra que não houve comunidades microbianas compartilhadas entre todos os genótipos analisados. O Teosinto apresentou o maior número de OTUs exclusivos (362), seguido pelo milho Transgênico SX 3197 TR (246). As variedades crioulas, Rajado, Amarelão e Colorido, exibiram menor quantidade de OTUs exclusivos, com 60, 44 e 88 respectivamente.

Figura 7 - Diagrama de Venn mostrando o número de OTUs exclusivas e compartilhadas entre a microbiota de três variedades crioulas de milho (Colorido, Rajado e Amarelão), um parente silvestre da espécie (Teosinto) e uma variedade híbrida transgênica SX 3197 TR.



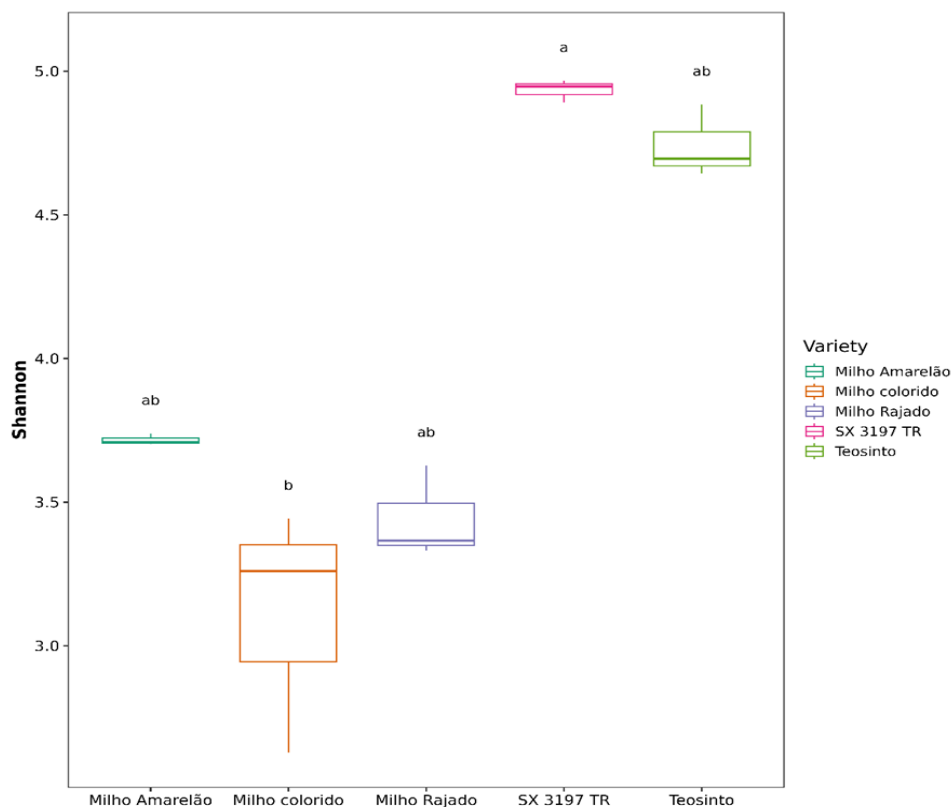
Fonte: Autoria própria, 2025.

Algumas OTUs foram compartilhadas entre duas ou mais variedades

simultaneamente (Figura 7). Identificou-se 2 OTUs comuns entre o Teosinto e o milho Colorido, 3 OTUs comuns entre Teosinto e milho Amarelão, 5 OTUs comuns entre milho Amarelão e milho Rajado, 2 OTUs comuns entre milho Transgênico SX 3197 TR e milho Rajado e 5 OTUs comuns entre milho Transgênico SX 3197 TR e milho Colorido. Além disso, foram observadas 2 OTUs compartilhadas entre as variedades de milho Colorido, milho Rajado e milho Transgênico SX 3197 TR.

Quanto ao número de OTUs, evidenciados pelos histogramas na Figura 8, observa-se que o milho Transgênico SX 3197 TR apresenta o maior número, embora não seja estatisticamente diferente do Teosinto, do milho Rajado e do milho Amarelão. Por fim, esses três últimos não diferem estatisticamente do milho Colorido.

Figura 8 - Histogramas mostrando índices de alfa diversidade das radículas de três variedades crioulas de milho (Colorido, Rajado e Amarelão), um parente silvestre da espécie (Teosinto) e uma variedade híbrida transgênica (SX 3197 TR).

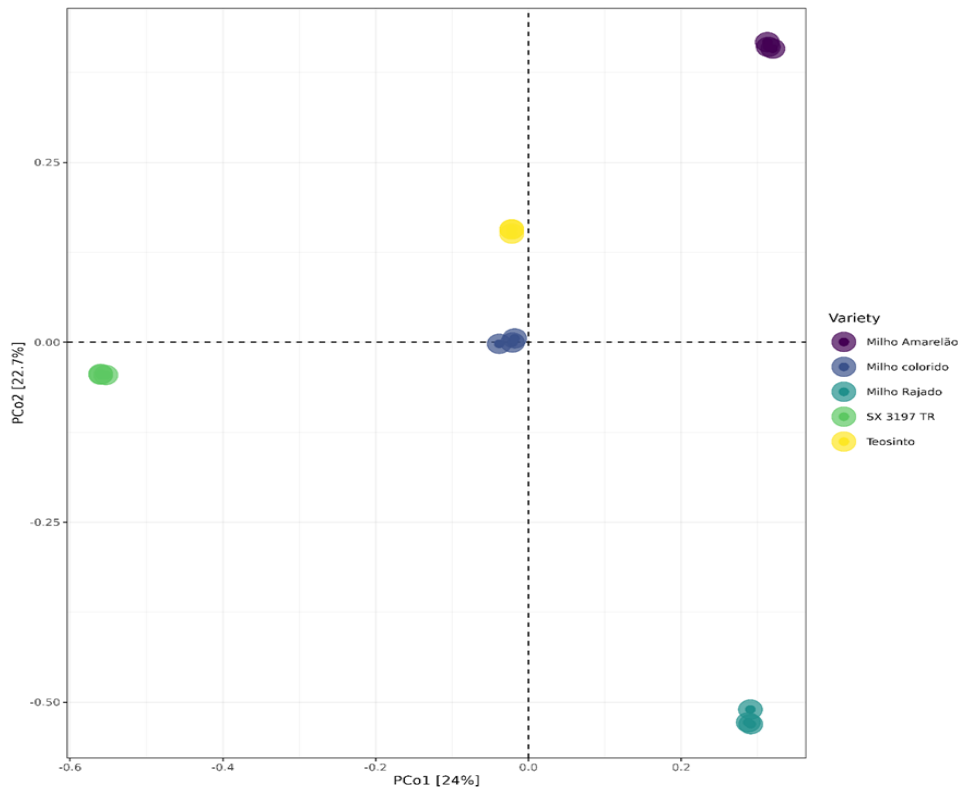


Fonte: Autoria própria, 2025.

Utilizando a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) (Figura 9), avaliou-se a distribuição da composição microbiana das sementes. Os eixos PCo1 e PCo2 explicam, respectivamente, 24,0% e 22,7% da variação total observada na composição microbiana. Cada ponto representa uma amostra individual de uma variedade, sendo que a proximidade entre pontos indica maior similaridade microbiana, enquanto distâncias maiores sugerem

diferenças significativas.

Figura 9 - Análise de coordenadas principais (PCoA) mostrando a beta diversidade da microbiota bacteriana de três variedades crioulas de milho (Colorido, Rajado e Amarelão), um parente silvestre da espécie (Teosinto) e uma variedade híbrida transgênica SX 3197 TR.



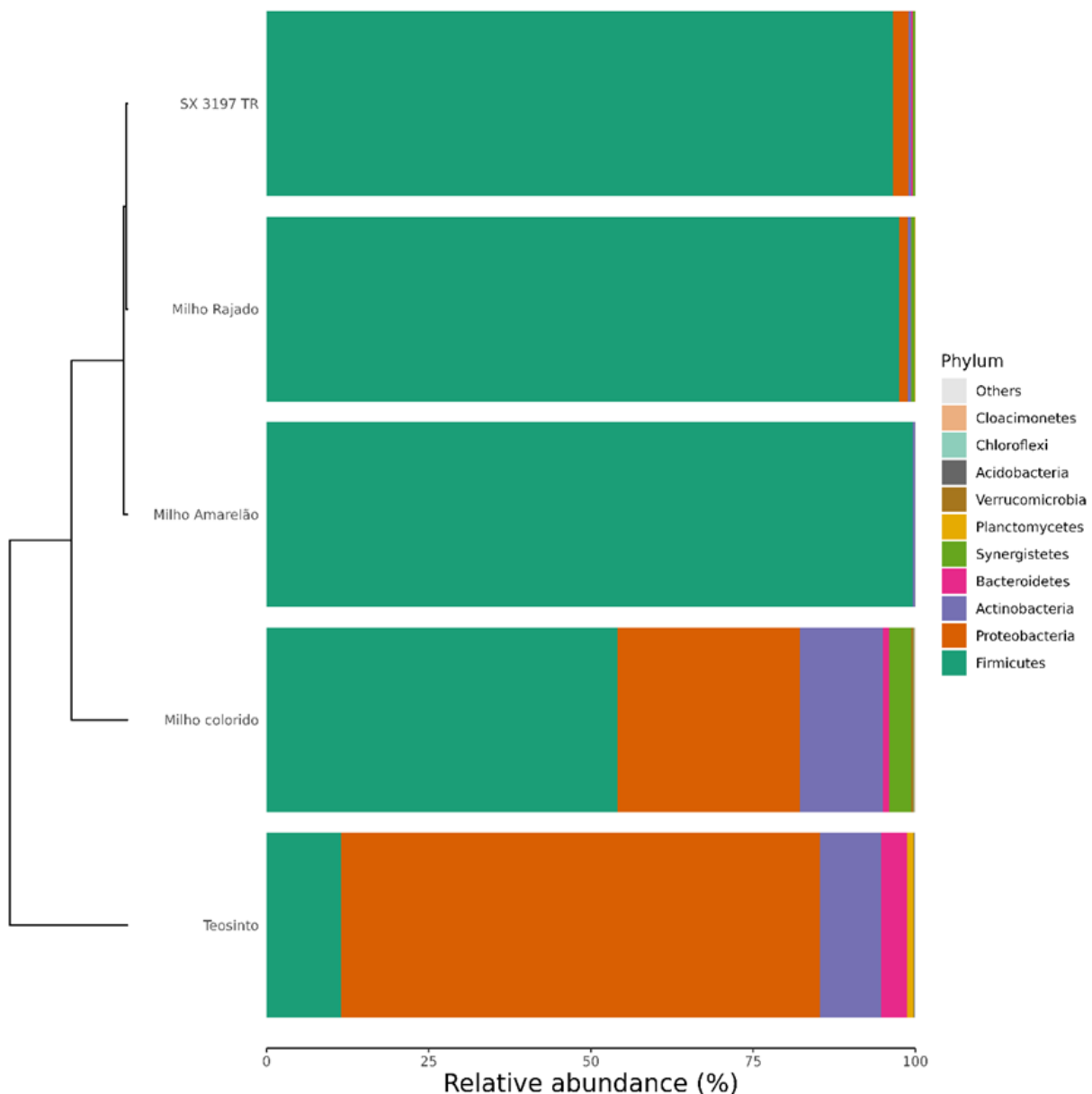
Fonte: Autoria própria, 2025.

A partir da análise da Figura 9, observa-se que o Teosinto se situa no quadrante superior esquerdo, próximo ao zero no eixo X, indicando uma posição intermediária em PCo1 e um valor mais alto em PCo2. Ao analisar a disposição das demais variedades, constata-se que o milho Colorido, posicionado próximo ao centro do gráfico, é a variedade mais próxima do Teosinto, sugerindo maior similaridade na composição bacteriana entre eles. Já o milho Amarelão, localizado no quadrante superior direito, aproxima-se do Teosinto no eixo vertical, pois ambos apresentam valores positivos de PCo2, mas diverge no eixo horizontal, revelando diferenças significativas em seus grupos bacterianos. Em maior oposição ao Teosinto encontram-se o milho Transgênico SX 3197 TR, localizado no quadrante inferior esquerdo, e o milho Rajado, situado no quadrante inferior direito. O Transgênico SX 3197 TR demonstra alguma semelhança com o Teosinto em termos de PCo1, mas distingue-se consideravelmente em PCo2. Já o milho Rajado afasta-se do Teosinto em ambos os eixos, indicando diferenças marcantes em sua composição microbiana. O milho Colorido exibe composição microbiana mais similar ao Teosinto,

enquanto que o milho Rajado apresenta contrastes mais acentuado.

O dendrograma associado ao gráfico de barras de abundância relativa de filos bacterianos (Figura 10) reflete a similaridade das comunidades microbianas entre os genótipos de milho. As variedades mais próximas no dendrograma, como o milho Transgênico SX 3197 TR e o milho Rajado, apresentam comunidades bacterianas semelhantes, dominadas principalmente pelo filo Firmicutes. Em contraste, o Teosinto está posicionado de forma isolada, evidenciando que sua microbiota se distingue em relação às demais variedades analisadas.

Figura 10 - Dendrograma ilustrando a abundância relativa dos principais filos bacterianos encontrados em três variedades crioulas de milho (Colorido, Rajado e Amarelão), um parente silvestre da espécie (Teosinto) e uma variedade híbrida transgênica SX 3197 TR.

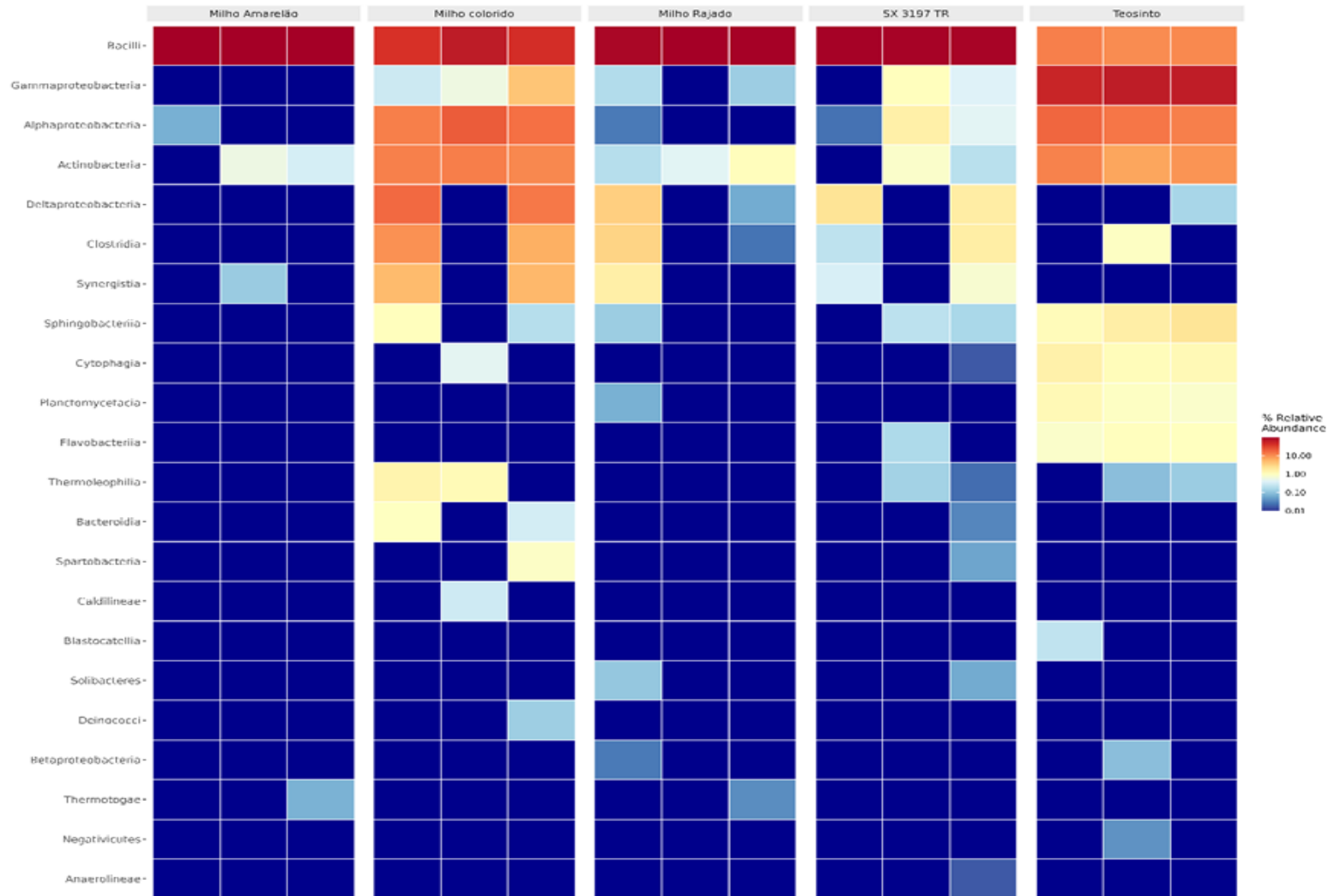


Fonte: Autoria própria, 2025.

A análise do gráfico de barras revela que o filo Firmicutes predomina nas sementes da maioria das variedades de milho, com exceção do Teosinto, que apresenta uma alta proporção de Proteobacteria, além de proporções significativas dos filos Actinobacteria e Bacteroidetes. O milho Colorido, por sua vez, compartilha certa semelhança com o Teosinto por apresentar uma microbiota mais diversificada em comparação às outras variedades crioulas, destacando-se pela predominância dos filos Firmicutes, seguidos por Proteobacteria, Actinobacteria e Synergistetes.

A diversidade observada nas classes é detalhada na Figura 11, que ilustra as abundâncias relativas das 30 classes bacterianas mais dominantes em cada variedade. Em maior abundância, destaca-se a classe Bacilli, presente em todas as variedades, com coloração entre laranja e vermelho intenso, indicando uma abundância relativa próxima de 10%. De maneira geral, observa-se que o Teosinto e a variedade milho Colorido apresentam a maior abundância de classes bacterianas. O Teosinto destaca-se pela alta abundância das classes Bacilli, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Actinobacteria, com índices próximos de 10%, seguido por uma abundância moderada das classes Sphingobacteriia, Cytophagia, Planctomycetacia, Flavobacteriia, com índices entre 0,1 e 1%. Já o milho Colorido apresenta alta abundância nas classes Bacilli, Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Deltaproteobacteria, Clostridia e Synergistia, com abundância relativa próxima dos 10%. Essa variedade também se destaca pela abundância moderada de classes como Gammaproteobacteria, Sphingobacteria e Thermoleophilia.

Figura 11 - *Heatmap* da abundância relativa dos 30 principais táxons OTUs dominantes em nível de classe em três variedades crioulas de milho (Colorido, Rajado e Amarelão), um parente silvestre da espécie (Teosinto) e uma variedade híbrida transgênica SX 3197 TR



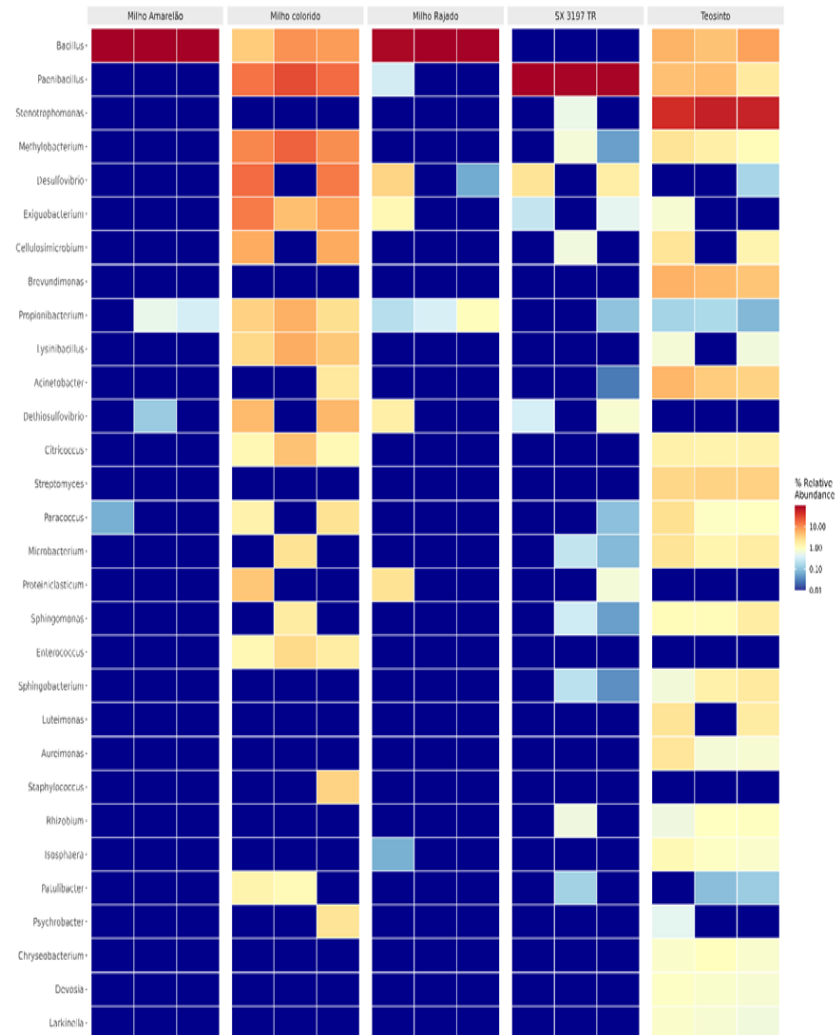
Fonte: Autoria própria, 2025.

Por outro lado, o milho Transgênico SX 3197 TR e o milho Rajado apresentam uma abundância microbiana intermediária, caracterizada por uma diversidade bacteriana moderada em comparação às demais variedades. Embora o milho Transgênico SX 3197 TR e o milho Rajado compartilhem táxons importantes com o Teosinto, como a classe Bacilli, essas variedades apresentam menor diversidade geral, com abundância relativa variando principalmente entre 0,01 e 0,10%. Por fim, observando o *heatmap* do milho Amarelão, nota-se a predominância de tons de azul escuro em quase todas as linhas, indicando uma abundância muito baixa, inferior a 0,01% para a maioria das classes bacterianas, com exceção da classe Bacilli. Dessa forma, o milho Amarelão se apresenta como a variedade com menor abundância relativa em nível de classe.

O *heatmap* de abundâncias relativas de gêneros, apresentado na Figura 12, reflete padrões importantes de diversidade microbiana nesse nível taxonômico. No milho Amarelão, apenas o gênero *Bacillus* se destaca, com uma abundância próxima a 10%, representada em tons de vermelho. Em contraste, o milho Colorido demonstra uma microbiota bem mais diversificada, com vários gêneros, como *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Methylobacterium*, *Exiguobacterium*, entre outros, apresentando abundâncias moderadas a altas, refletidas em tons amarelos, laranjas e vermelhos de 1 a 10%. Já o milho Rajado exibe um padrão próximo ao do milho Amarelão em relação à diversidade microbiana. Embora o gênero *Bacillus* esteja presente em abundância (em vermelho), a maioria dos outros gêneros aparecem em níveis significativamente baixos, em tons de azul claro e escuro.

O milho Transgênico SX 3197 TR destaca-se pela predominância do gênero *Paenibacillus*, com alta abundância, representada em tons de vermelho, enquanto outros gêneros aparecem em níveis baixos, apresentando um perfil semelhante ao observado nos milhos Rajado e Amarelão. Por fim, o Teosinto exibe a microbiota mais diversificada entre as variedades analisadas. O gênero *Stenotrophomonas* predomina, com abundância próxima a 10%, evidenciada em tons de vermelho. Além disso, diversos outros gêneros bacterianos, como *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Methylobacterium*, *Brevundimonas*, *Acinetobacter*, *Citricoccus*, *Streptomyces*, *Paraccocus*, *Microbacterium*, *Sphingobacterium*, *Aureimonas*, entre outros, aparecem em níveis moderados, representados por tons amarelos e laranjas.

Figura 12 - *Heatmap* da abundância relativa dos 30 principais táxons OTUs dominantes em nível de gênero em três variedades crioulas de milho (Colorido, Rajado e Amarelão), um parente silvestre da espécie (Teosinto) e uma variedade híbrida transgênica SX 3197 TR.



Fonte: Autoria própria, 2025.

4 DISCUSSÃO

4.1 Diversidade Microbiana nos Diferentes Genótipos Estudados

Estudos sobre microbiomas associados a sementes de milho frequentemente sugerem que a domesticação e o melhoramento genético, juntamente com o cultivo em diferentes tipos de ambientes agrícolas, têm impactos significativos na diversidade microbiana. Dentre esses impactos, acreditava-se que a diversidade de microrganismos endofíticos seria reduzida no milho transgênico em comparação com genótipos crioulos e o parente silvestre. Os resultados deste estudo corroboram, em partes, com essa premissa, destacando que o Teosinto apresenta uma maior diversidade microbiana quando comparado com as outras variedades estudadas em níveis taxonômicos superiores.

A riqueza microbiana encontrada no Teosinto pode ser atribuída ao fato dessa variedade não ter passado por processos intensos de seleção humana, o que evitou os gargalos associados à domesticação e permitiu a manutenção de uma microbiota mais diversa, bem como ao seu método de dispersão de sementes natural. Adiciona-se ainda que seu cultivo ocorre em condições de menor entrada de adubos químicos e agrotóxicos. Por outro lado, a diversidade microbiana (abundância) elevada em termos de número de OTUs no milho Transgênico SX 3197 TR, pode indicar uma alta diversidade de espécies dentro de poucas classes e gêneros, ou seja, menor riqueza (quantidade de espécies) e maior abundância relativa (quantidade de indivíduos de determinada espécie). Isso pode estar relacionado à homogeneidade genética da variedade, que é descendente do cruzamento de indivíduos homocigotos e selecionada para ambientes de alta entrada de insumos, o que favoreceu comunidades microbianas adaptadas a essas condições. Além disso, fatores como características do solo, práticas de manejo agrícola e alterações nos exsudatos radiculares são apontados como influências potenciais para diversidade de espécies dentro de poucas classes e gêneros (ABDULLAEVA *et al.*, 2021).

De forma não corroborativa à hipótese lançada nesse estudo, as variedades crioulas de milho apresentam menor quantidade de OTUs em relação ao Teosinto e a variedade híbrida transgênica. Como se tratam de variedades de polinização aberta, ou seja, trocam abertamente pólen entre plantas de dentro da sua população, aliadas a um cultivo majoritariamente de adubação orgânica, esperava-se encontrar maior quantidade de OTUs. Curiosamente, apesar de poucas OTUs, o milho Colorido tem muita diversidade (riqueza) microbiana em nível de gênero, destacando-se em comparação às outras variedades crioulas. Apesar disso, as outras variedades crioulas, milho Amarelão e milho Rajado, que

apresentam poucas OTUs e pouca diversidade, compartilham suas principais características de predominância do gênero *Bacillus* com o Teosinto.

Gutierrez e Grillo (2022), sustentam que a domesticação de plantas está associada a mudanças nas interações planta-microrganismo, oferecendo duas explicações principais para essas alterações. A primeira sugere que a diversidade do microbioma pode ser reduzida em variedades domesticadas devido à perda de mecanismos genéticos que regulam as interações planta-microrganismos. A segunda perspectiva aponta que a redução da diversidade genética durante a domesticação pode ter tornado os mecanismos de filtragem do microbioma menos eficientes, permitindo que as plantas cultivadas se associem a uma maior diversidade de microrganismos. Os autores ainda citam que, em grande parte dos estudos, não foram observadas diferenças significativas entre a diversidade de microbiomas em plantas silvestres e domesticadas (GUTIERREZ e GRILLO, 2022).

4.2 Abundância Relativa de Filos e Classes Bacterianas

Os resultados deste estudo indicam que a composição e a abundância relativa de filos bacterianos variam significativamente entre os genótipos analisados, destacando a influência conjunta do genótipo da planta e do ambiente na estrutura do microbioma radicular. O Teosinto apresentou uma composição bacteriana única, dominada principalmente por Proteobacteria, mas com alta abundância de Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes. Em contrapartida, as variedades crioulas e o milho Transgênico SX 3197 TR foram predominantemente dominadas por Firmicutes. Essa diferença na estrutura microbiana reforça a importância do genótipo na seleção das comunidades microbianas, alinhando-se a estudos como aquele de Aira *et al.* (2010), que demonstraram que, tanto o genótipo da planta de milho, quanto o regime de fertilização influenciam diretamente a estrutura e a atividade das comunidades microbianas da rizosfera. Esse sistema promove o aumento da qualidade do solo, da biodiversidade e da capacidade de retenção de água, além de enfatizar os ciclos ecológicos, a fertilidade do solo e a preservação da biodiversidade (GOMIERO, PIMENTEL, PAOLETTI, 2011). Em contrapartida, alta entrada de insumos, como fertilizantes sintéticos e agrotóxicos para maximizar o rendimento das colheitas. Apesar dessa observação, as variedades crioulas e a híbrida transgênica SX 3197 TR, apresentam certa similaridade em termos de filos.

Estudos sugerem que diferentes práticas agrícolas impactam de maneira distinta os filos e classes bacterianas. A predominância de Firmicutes nas variedades cultivadas, isto

é, em maior quantidade no Transgênico SX 3197 TR, seguindo pelas variedades crioulas, pode estar associada às práticas agrícolas modernas, como o uso intensivo de fertilizantes químicos e agrotóxicos, que favorecem filos bacterianos resistentes a condições ambientais adversas. Sabe-se que os agricultores familiares de Anchieta usam, em algumas ocasiões, adubação química nitrogenada, como é o caso do Amarelão. Wessén *et al.* (2010) observaram que a abundância relativa de Firmicutes aumentou significativamente em solos tratados com sulfato de amônio. Esse fenômeno está relacionado às propriedades do sulfato de amônio, um fertilizante rico em nitrogênio e enxofre, que promove o desenvolvimento vegetativo, estimula o crescimento de folhas e caules e melhora a qualidade dos grãos.

Por sua vez, a maior diversidade observada no Teosinto está alinhada com a literatura que destaca a importância dos genótipos silvestres como reservatórios de diversidade microbiana (GUTIÉRREZ e GRILLO, 2022). A presença abundante de Proteobacteria e Actinobacteria no parente silvestre sugere funções ecológicas importantes como a promoção de crescimento vegetal, solubilização de nutrientes e proteção contra estresses bióticos e abióticos. De acordo com Kumar *et al.* (2023), Proteobacteria é o filo com abundância relativa predominante em cenários de agricultura de conservação, isto é, um sistema de produção agrícola que promove a sustentabilidade ao minimizar o revolvimento do solo, mantendo sua cobertura e diversificando cultivos. Isso ocorre porque esse filo é caracterizado como copiotrófico, ou seja, prospera em ambientes com alta disponibilidade de carbono (HO, DI LEONARDO, BODELIER, 2017), explicando a relação de dominância do filo em variedades de Teosinto.

O milho Transgênico SX 3197 TR, por sua vez, exibiu uma microbiota concentrada em poucos filos e gêneros, o que pode ser consequência do processo de desenvolvimento dessas plantas para ambientes de alta entrada de insumos, bem como por ser uma variedade descendente de linhagens endogâmicas, com homogeneidade genética. Estudos como o de Wang *et al.* (2024) sugerem que a introdução de transgenes afetaram a interação planta-microrganismo, resultando em uma microbiota menos diversa, mas potencialmente mais eficiente em funções específicas.

4.3 Relação entre Microbiota e Fenótipos Vegetais: Perspectivas e Usos Práticos

A diversidade microbiana associada às plantas desempenha um papel essencial na definição de seus fenótipos, influenciando diretamente características como resistência a estresses ambientais e capacidade de interação com o solo (HAHL *et al.*, 2020). O Teosinto

apresentou uma microbiota rica e diversificada, o que pode conferir resistência aprimorada a estresses ambientais, como seca, salinidade e ataques de patógenos. Essa resiliência relaciona-se à presença de microrganismos benéficos, que não apenas promovem o crescimento vegetal, mas também melhoram a absorção de nutrientes e aumentam a tolerância a condições adversas. Estudos como o de Hahl *et al.* (2020), demonstram que plantas cultivadas em condições de alta diversidade microbiana desenvolvem mecanismos de defesa mais eficazes, resultado das interações enriquecedoras com as comunidades microbianas.

Gêneros bacterianos, como *Bacillus*, *Stenotrophomonas* e *Paenibacillus*, amplamente encontrados no Teosinto, desempenham papéis cruciais na promoção do crescimento vegetal e na defesa contra patógenos. Reconhece-se o gênero *Bacillus* por sua capacidade de estimular o crescimento vegetal e por sua eficácia contra patógenos, sendo uma das bactérias endofíticas com frequente identificação em diversas plantas (DOURIET-GÁMEZ *et al.*, 2018). Um estudo realizado por Fouda *et al.* (2021), demonstrou que a inoculação de sementes de milho com *Bacillus* ssp. resultou em melhorias significativas no comprimento das raízes, peso fresco e seco das partes aéreas e do sistema radicular. Esses efeitos positivos foram atribuídos à síntese de ácido indolacético (AIA), amônia e à solubilização de fosfato. Ademais, bactérias do gênero *Bacillus*, se mostraram ser eficazes contra fungos patogênicos devido à produção de metabólitos e enzimas como amilase, protease e quitinase, que degradam a parede celular dos patógenos. Essas bactérias também exibiram tolerância a estresses abióticos, como salinidade, alta temperatura e seca (BODHANKAR *et al.*, 2017).

O gênero *Stenotrophomonas*, encontrado com abundância no Teosinto, também oferece benefícios expressivos às plantas. Segundo Ulrich *et al.* (2021), essas bactérias produzem compostos similares ao ácido indolacético (AIA), que promovem o crescimento do sistema radicular e um número ampliado de pelos radiculares, melhorando assim a absorção de nutrientes pela planta. Essas bactérias também possuem genes para a síntese de sideróforos, moléculas capazes de captar ferro do ambiente, o que não apenas melhora a disponibilidade de ferro para as plantas, mas também inibe o crescimento de patógenos por competição. Além disso, espécies como *Stenotrophomonas maltophilia* possuem o gene *nifH*, que participa da fixação de nitrogênio atmosférico, convertendo-o em uma forma utilizável pelas plantas, contribuindo assim para a sua nutrição (WOZNIAK *et al.*, 2019).

De maneira semelhante, o gênero *Paenibacillus*, abundante também no Teosinto, desempenha um papel integral na microbiota endofítica do milho. Essas bactérias

promovem o crescimento das plantas através da produção de fitormônios, como o AIA, e da solubilização de fósforo insolúvel, além de fixar nitrogênio atmosférico. O gênero *Paenibacillus* também é eficaz no biocontrole, induzindo resistência sistêmica (ISR) e produzindo substâncias antimicrobianas que combatem patógenos. Segundo Grady *et al.* (2016), essas bactérias produzem quitinases que degradam a quitina, componente estrutural de fungos e insetos, reduzindo sua capacidade de infecção. A presença de *Paenibacillus* na microbiota do milho, como mostrado na Figura 12, ressalta sua conservação nas diferentes variedades de milho, independente de base genética e ambiente agrícola de cultivo, e seu papel essencial no desenvolvimento das plantas (JOHNSTON-MONJE e RAIZADA, 2011).

A riqueza microbiana observada no Teosinto e no milho Colorido, em termo de gêneros, reflete um reservatório promissor de microrganismos capazes de promover crescimento vegetal, melhorar a absorção de nutrientes e proteger as plantas contra estresses bióticos e abióticos. Embora desempenhem funções semelhantes, as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Stenotrophomonas* e *Paenibacillus* apresentam particularidades nos mecanismos de promoção do crescimento vegetal e proteção das plantas. Essas particularidades representam um potencial significativo para aplicações biotecnológicas, com destaque para o desenvolvimento de bioinsumos agrícolas, que podem reduzir a necessidade de agroquímicos, como fertilizantes e pesticidas (VANDANA *et al.* 2021).

4.4 Impacto da Domesticação e do Melhoramento Genético na Microbiota Endofítica das Variedades de Milho Estudadas

Os diferentes níveis de domesticação e de melhoramento genético das variedades de milho analisadas neste estudo, juntamente com as distintas condições de manejo e cultivo, revelaram impactos distintos sobre a microbiota endofítica associada às suas sementes. As variedades crioulas, resultado de seleções conduzidas por pequenos agricultores com base em suas preferências particulares, apresentaram uma menor quantidade de OTUs exclusivas em comparação com o parente silvestre Teosinto e ao milho Transgênico SX 3197 (Figura 7). Com exceção do milho Colorido, as outras variedades crioulas, como o milho Amarelão e milho Rajado, além de apresentarem poucas OTUS, também exibiram baixa diversidade em níveis taxonômicos superiores.

A partir das análises das informações de manejo da variedade de milho Amarelão, obtidas diretamente do agricultor, destaca-se o uso de ureia e de cama de aviário para o cultivo dessa variedade. A cama de aviário é considerada um adubo orgânico, por ser um

resíduo da criação de aves, composto principalmente por serragem, palha ou outros substratos usados no piso de granjas, misturados com fezes e urina das aves. Por isso é rica em nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio. Esse tipo de adubo pode aumentar a fertilidade do solo e a absorção de nutrientes pelas culturas, sendo uma alternativa eficaz aos fertilizantes químicos (LIN *et al.*, 2018). Por outro lado, a ureia é um fertilizante químico de nitrogênio, amplamente reconhecido por seu papel no aumento da produtividade das culturas, especialmente no milho (RIADI *et al.*, 2023). Estudos como o de Sun *et al.* (2019) demonstraram que o uso de ureia e outros fertilizantes químicos tendem a diminuir a diversidade bacteriana em geral. Além disso, foi observado que, nas camadas mais profundas do solo com ureia, há menor diversidade de bactérias. Portanto, especula-se que o uso de ureia no cultivo do milho Amarelão possa ter alterado as propriedades do solo e, conseqüentemente, influenciou a microbiota endofítica, reduzindo a quantidade de OTUs.

Acredita-se que o baixo número de OTUs e a reduzida diversidade microbiana encontrada no milho Rajado estejam relacionadas a uma situação semelhante à do milho Amarelão. Como não foi possível obter informações detalhadas sobre o manejo dessa variedade, quer seja de solo, quer seja do processo seletivo, desconhece-se quais fatores contribuíram para a baixa diversidade observada.

Por outro lado, o milho Colorido se destaca, principalmente em relação à diversidade de microrganismos. Essa diversidade funcional em níveis taxonômicos superiores pode ser um reflexo da coevolução entre a variedade crioula e as comunidades microbianas em condições de manejo tradicional, reforçando seu papel ecológico na promoção do crescimento vegetal, solubilização de nutrientes e defesa contra patógenos (GUTIÉRREZ e GRILLO, 2022). Assim, essa variedade crioula demonstra um equilíbrio interessante entre diversidade microbiana e funcionalidade predita, o que pode ter implicações importantes para a agricultura sustentável. O Teosinto, como parente silvestre do milho, apresentou o maior número de OTUs exclusivas e maior diversidade microbiana total. Este resultado corrobora a hipótese aventada de que a domesticação, juntamente com maior entrada de insumos agrícolas, reduzem a diversidade microbiana endofítica, uma vez que as plantas domesticadas passam por pressões seletivas direcionadas a características agrônômicas, frequentemente em detrimento de interações simbióticas complexas com microrganismos. A diversidade robusta do Teosinto pode conferir a essa planta uma maior resiliência ecológica e adaptabilidade, características que podem ser aproveitadas para programas de melhoramento genético, bem como para a prospecção de bioinsumos.

A ausência de OTUs compartilhadas entre os genótipos analisados, reforça que cada

variedade possui uma microbiota particular, reforçando argumentos para a conservação dos recursos genéticos vegetais. Este resultado sugere que a conservação de variedades tradicionais, como as crioulas e o Teosinto, juntamente com técnicas de manejo com menor entrada de insumos agrícolas, é essencial para conservar a diversidade funcional microbiana, que pode oferecer soluções naturais para desafios como a adaptação a mudanças climáticas e o aumento da produtividade em sistemas agrícolas de baixo impacto ambiental.

4.5 Limitações do Estudo e Perspectivas

A análise da microbiota endofítica das radículas das plântulas, após germinação das 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

Para superar essa lacuna, é imprescindível caracterizar o papel funcional das bactérias endofíticas. Abordagens experimentais, como análises de metabolômica, transcriptômica e genômica funcional, devem ser incorporadas em estudos futuros. Essas ferramentas avançadas permitem elucidar os mecanismos bioquímicos e moleculares que regem as interações simbióticas entre plantas e microrganismos, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de bioestimulantes agrícolas que possam melhorar a produtividade e a sustentabilidade das culturas. A microbiota das radículas das plântulas, após germinação das sementes, representa apenas uma fração do holobioma vegetal, o que demanda uma ampliação do escopo das análises. Estudos futuros devem incluir outros tecidos vegetais, como raízes, rizosfera, caule e folhas, e até mesmo as sementes sem germinação, para compreender melhor a dinâmica microbiana em diferentes compartimentos da planta. Além disso, é essencial investigar a microbiota em diferentes estágios de desenvolvimento da planta, desde a germinação até a maturação. Tal abordagem permitirá captar como fatores fisiológicos e ambientais influenciam a composição e a funcionalidade da microbiota, oferecendo uma visão integrada do papel desses microrganismos na saúde e no desempenho vegetal.

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.

5 CONCLUSÕES

Este estudo revelou que a diversidade microbiana das sementes de milho foi influenciada pelo nível de domesticação, pelo melhoramento genético e pelas práticas agrícolas associadas ao cultivo das diferentes variedades. O Teosinto (*Zea Luxurians*), parente silvestre da espécie, apresentou a maior diversidade microbiana, evidenciando sua função como um reservatório genético e microbiológico relevante. Essa elevada diversidade pode estar associada à ausência ou menor seleção praticada, permitindo a manutenção de uma microbiota mais ampla e possivelmente mais funcionalmente diversa.

Dentre as variedades crioulas analisadas, o milho Colorido destacou-se pela diversidade microbiana em nível taxonômico superior, o que pode indicar uma maior interação ecológica favorável à manutenção de microrganismos benéficos. Por outro lado, as variedades crioulas Amarelão e Rajado apresentaram uma menor diversidade de OTUs e uma composição microbiana mais similar à do milho transgênico, sugerindo que práticas agrícolas como o uso de fertilizantes nitrogenados influenciaram negativamente a microbiota endofítica.

O milho transgênico SX 3197 TR, embora apresentasse uma microbiota menos diversa em termos taxonômicos superiores, demonstrou um elevado número de OTUs. Esse resultado sugere que, apesar de sua homogeneidade genética e do cultivo sob sistemas com elevada entrada de insumos, a variedade transgênica deve abrigar uma diversidade funcional dentro de grupos bacterianos específicos, potencialmente relacionados à sua adaptação para prosperar em ambientes tecnificados.

Nossos resultados corroboram a hipótese de que a domesticação e o melhoramento genético, juntamente com o cultivo em diferentes condições agrícolas, influenciam a microbiota endofítica das sementes de milho. No entanto, a ausência de OTUs compartilhadas entre os genótipos analisados destaca a singularidade da microbiota de cada variedade e reforça a importância da conservação de recursos genéticos vegetais para a manutenção da diversidade microbiana associada às plantas.

Há necessidade de ampliar os estudos sobre o papel funcional das bactérias, bem como realizar isolamento, para aquisição de suas possíveis vantagens adaptativas que poderão ser aproveitadas para o desenvolvimento de bioestimulantes agrícolas. Além disso, destaca-se a importância de uma amostragem maior em futuros estudos para explorar de forma mais detalhada as interações simbióticas entre plantas e microrganismos, nos seus distintos ambientes de cultivo.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAEVA, Yulduzkhon et al. **Domestication affects the composition, diversity, and co-occurrence of the cereal seed microbiota.** *Journal of Advanced Research*, v. 31, p. 75-86, 2021.
- ACUÑA, Jacqueline J. et al. **Endophytic bacterial communities in ungerminated and germinated seeds of commercial vegetables.** *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 19829, 2023.
- AIRA, Manuel et al. **Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 42, n. 12, p. 2276-2281, 2010.
- AGLER, Matthew T. et al. **Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation.** *PLoS biology*, v. 14, n. 1, p. e1002352, 2016.
- BÁLINT, Miklós et al. **An Illumina metabarcoding pipeline for fungi.** *Ecology and evolution*, v. 4, n. 13, p. 2642-2653, 2014.
- 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.
- BIOLÓGICA-CBD, CONVENÇÃO PARA A DIVERSIDADE. **Convention on Biological Diversity.** Nações Unidas, 1992.
- BODHANKAR, Shrey et al. **Maize seed endophytic bacteria: dominance of antagonistic, lytic enzyme-producing *Bacillus* spp.** *3 Biotech*, v. 7, p. 1-13, 2017.
- BOHMANN, Kristine, et al. **Strategies for sample labelling and library preparation in DNA metabarcoding studies.** *Molecular Ecology Resources*, v. 22, n. 4, p. 1231-1246, 2022.
- BRASIL. **Recursos genéticos para a alimentação e agricultura.** GOV.BR, 14 jan. 2020. Disponível em: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/recursos-geneticos-1#:~:text=RECURSOS%20GEN%C3%89TICOS%20PARA%20A%20ALIMENTA%C3%87%20E%20AGRICULTURA&text=Eles%20s%C3%A3o%20a%20mat%C3%A9ria%20prima,%E2%80%9D%20\(Embrapa%2C%202019\).](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/recursos-geneticos-1#:~:text=RECURSOS%20GEN%C3%89TICOS%20PARA%20A%20ALIMENTA%C3%87%20E%20AGRICULTURA&text=Eles%20s%C3%A3o%20a%20mat%C3%A9ria%20prima,%E2%80%9D%20(Embrapa%2C%202019).)
- BRISSEON, Vanessa L. et al. **Impacts of maize domestication and breeding on rhizosphere microbial community recruitment from a nutrient depleted agricultural soil.** *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 15611, 2019.
- CALLAHAN, Benjamin J. et al. **DADA2: High-resolution sample interference from Illumina amplicon data.** *Nature methods*, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016.

CLEMENT, Charles R. et al. **Domesticação das paisagens amazônicas**. Estudos Avançados, v. 38, n. 112, p. 55-72, 2024.

COGHLAN, Megan L. et al. **Deep sequencing of plant and animal DNA contained within traditional Chinese medicines reveals legality issues and health safety concerns**. PLoS genetics, v. 8, n. 4, p. e1002657, 2012.

CONTRERAS-LIZA, Sergio Eduardo. **Plant breeding and microbiome**. Plant Breeding-Current and Future Views, 2021.

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.

DOURIET-GÁMEZ, Nadia R. et al. **Genomic analysis of *Bacillus* sp. strain B25, a biocontrol agent of maize pathogen *Fusarium verticillioides***. Current microbiology, v. 75, p. 247-255, 2018.

EMBRAPA. **O papel do microbioma da rizosfera no desenvolvimento e proteção das plantas**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1171778/o-papel-do-microbioma-da-rizosfera-no-desenvolvimento-e-protecao-das-plantas>. Acesso em: 16 fev. 2025.

FOUDA, Amr et al. **Plant growth-promoting endophytic bacterial community inhabiting the leaves of *Pulicaria incisa* (Lam.) DC inherent to arid regions**. Plants, v. 10, n. 1, p. 76, 2021.

GARCIA, Taís Vargas; KNAAK, Neiva; FIUZA, Lidia Mariana. **Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura**. Arquivos do Instituto Biológico, v. 82, p. 1-9, 2016.

GOMIERO, Tiziano; PIMENTEL, David; PAOLETTI, Maurizio G. **Environmental impact of different agricultural management practices: conventional vs. organic agriculture**. Critical reviews in plant sciences, v. 30, n. 1-2, p. 95-124, 2011.

GRADY, Elliot Nicholas et al. **Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review**. Microbial cell factories, v. 15, p. 1-18, 2016.

GUTIERREZ, Andres; GRILLO, Michael A. **Effects of Domestication on Plant–Microbiome Interactions**. Plant and Cell Physiology, v. 63, n. 11, p. 1654-1666, 2022.

HAHL, Terhi et al. **Plant responses to diversity-driven selection and associated rhizosphere microbial communities**. Functional ecology, v. 34, n. 3, p. 707-722, 2020.

HANEY, Cara H. et al. **Associations with rhizosphere bacteria can confer adaptive Advantage to plants**. Nature plants, v. 1, n. 6, pág. 1-9, 2015.

HEBERT, Paul DN et al. **Biological identifications through DNA barcodes**. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HO, Adrian; DI LONARDO, D. Paolo; BODELIER, Paul LE. **Revisiting life strategy concepts in environmental microbial ecology.** FEMS microbiology ecology, v. 93, n. 3, p. fix006, 2017.

ISHIZAWA, Taís Aragão. **Microrganismos endofíticos e associados de melancia e aplicação biotecnológica.** 2017.

JIAO, Shuo et al. **Dominant role of abundant rather than rare bacterial taxa in maintaining agro-soil microbiomes under environmental disturbances.** Chemosphere, v. 235, p. 248-259, 2019.

JOHNSTON-MONJE, David; RAIZADA, Manish N. **Conservation and diversity of seed associated endophytes in Zea across boundaries of evolution, ethnography and ecology.** Plos one, 2011.

JOHNSTON-MONJE, David; GUTIÉRREZ, Janneth P.; LOPEZ-LAVALLE, Luis Augusto Becerra. **Seed-transmitted bacteria and fungi dominate juvenile plant microbiomes.** Frontiers in Microbiology, v. 12, p. 737616, 2021.

JORGE, Marçal Henrique Amici. **A Domesticação de Plantas Nativas do Pantanal.** Embrapa Pantanal, 2004. 20 p. (Documentos / Embrapa Pantanal, ISSN 1517-1973; 70).

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.

KUMAR, Abhishek; BARKHA, Barkha. **Organic Farming vs. Integrated Nutrient Management: A Comparative Review of Agricultural Productivity and Sustainability.** International Journal of Plant & Soil Science , v. 36, n. 6, p. 460-473, 2024.

KUMAR, Rakesh et al. **Influence of conservation agriculture-based production systems on bacterial diversity and soil quality in rice-wheat-green gram cropping system in eastern Indo-Gangetic Plains of India.** Frontiers in Microbiology, v. 14, p. 1181317, 2023.

LEANDRO, Mariana Ramos. **Colonização endofítica de Arabidopsis thaliana por Herbaspirillum soropedicae e seus efeitos na promoção do crescimento vegetal e na regulação diferencial de proteínas.** 2016.

LIN, Huang; PEDDADA, Shyamal Das. **Analysis of compositions of microbiomes with bias correction.** Nature communications, v. 11, n. 1, p. 3514, 2020.

LIU, Yang et al. **Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (Zea mays L., Nongda108) at different growth stages.** Annals of microbiology, v. 63, p. 71-79, 2013.

LIN, Yaru et al. **Influence of poultry litter on crop productivity under different field conditions: A meta-analysis.** Agronomy Journal, v. 110, n. 3, p. 807-818, 2018.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; Aguirre-Noyola, J. L.; Taco-Taype, N.; Remigi, P.; Pardo, M. A. **Plant microbiota modified by plant domestication**. Systematic and Applied Microbiology, v. 43, 2020.

MÉRIEUX NUTRISCIENCES. ADN metabarcoding. 2023. Disponível em: <https://www.merieuxnutrisciences.com/pt/alimentos/analises-de-alimentos/fraude-e-autenticidade-alimentar/dna-metabarcoding/#:~:text=Quais%20s%C3%A3o%20as%20vantagens%20do,%2C%20abrange%20repet%C3%ADvel%20e%20fi%C3%A1vel>. Acesso em: 16 jan. 2025.

MOLIN, Dayane. **Diversidade genética em milho crioulo através dos marcadores moleculares RAPD, microssatélite e AFLP**. 2012.

NANFACK, Albert Dongmo et al. **Exploiting the microbiome associated with normal and abnormal sprouting rice (*Oryza sativa* L.) seed phenotypes through a metabarcoding approach**. Microbiological Research, v. 279, p. 127546, 2024.

PURUGGANAN, M. D. **Evolutionary Insights into the Nature of Plant Domestication**. Trends in Plant Science, v. 24, n. 6, p. 462-471, 2019.

RIADI, Septa et al. **Effect of Urea Application on Corn Productivity: A Meta-Analysis**. Jurnal Ilmiah Pertanian dan Peternakan, v. 1, n. 1, p. 27-33, 2023.

SANTONIERI, Laura; BUSTAMANTE, Patricia Goulart. **Conservação ex situ e on farm de recursos genéticos: desafios para promover sinergias e complementaridades**. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas, v. 11, p. 677-690, 2016.

SIERRA, Luis Guillermo Teheran. **Comunidades de bactérias endofíticas e epifíticas associadas à cana-de-açúcar e prospecção de promotores de crescimento em plantas**. 2020.

SILVA, Natália Carolina de Almeida. **Conservação, diversidade e distribuição de variedades locais de milho e seus parentes silvestres no extremo oeste de Santa Catarina, Sul do Brasil**. 2015.

SILVA, Natália Carolina de Almeida et al. **Presence of *Zea luxurians* (Durieu and Ascherson) bird in southern Brazil: Implications for the conservation of wild relatives of maize**. PloS one, v. 10, n. 10, p. e0139034, 2015.

SUN, Ruibo et al. **Long-term urea fertilization alters the composition and increases the abundance of soil ureolytic bacterial communities in an upland soil**. FEMS microbiology ecology, v. 95, n. 5, p. fiz044, 2019.

TEIXEIRA, Flavia F. et al. **Banco ativo de germoplasma de milho**. 2006.

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

UDRY, Consolación V.; DUARTE, Wilton. **Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos**. Paralelo 15, 2000.

ULRICH, Kristina et al. **Genomic analysis of the endophytic *Stenotrophomonas* strain 169 reveals features related to plant-growth promotion and stress tolerance**. *Frontiers in microbiology*, v. 12, p. 687463, 2021.

VANDANA, Udaya Kumar et al. **The endophytic microbiome as a hotspot of synergistic interactions, with prospects of plant growth promotion**. *Biology*, v. 10, n. 2, p. 101, 2021.

VASQUES, Natalia Caetano; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. **Increasing Application of Multifunctional *Bacillus* for Biocontrol of Pests and Diseases and Plant Growth Promotion: Lessons from Brazil**. *Agronomy*, v. 14, n. 8, 2024.

VEASEY, Elizabeth Ann et al. **Processos evolutivos e a origem das plantas cultivadas**. *Ciência Rural*, v. 41, p. 1218-1228, 2011.

VIEIRA, João Antonio Côrtes. **Bactérias endofíticas de milho e seu potencial como promotoras de crescimento vegetal e agFentes de controle biológico**. 2015.

WALLACE, Jason G. **Maize seed endophytes**. *Molecular Plant Pathology*, v. 24, n. 7, p. 801-810, 2023.

WANG, Guihua et al. **Impact of glyphosate on the rhizosphere microbial communities of a double-transgenic maize line D105**. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 8, p. 1421837, 2024.

WEI, Ze-Gang et al. **Comparison of methods for picking the operational taxonomic units from amplicon sequences**. *Frontiers in microbiology*, v. 12, p. 644012, 2021.

WESSÉN, Ella et al. **Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management**. *Applied Soil Ecology*, v. 45, n. 3, p. 193-200, 2010.

WOŹNIAK, Małgorzata et al. **Endophytic bacteria potentially promote plant growth by synthesizing different metabolites and their phenotypic/physiological profiles in the Biolog GEN III MicroPlate™ Test**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 21, p. 5283, 2019.

ZHANG, Ximei et al. **Decreased plant productivity resulting from plant group removal experiment constrains soil microbial functional diversity**. *Global Change Biology*, v. 23, n. 10, p. 4318-4332, 2017.