

ESTRUTURA E DINÂMICA DO BACTERIOMA DE SEMENTES DE
MILHO DE GENÓTIPOS CONTRASTANTES SUBMETIDAS A ALTAS
TEMPERATURAS

BEATRIZ ELISA BARCELOS CYRÍACO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

OUTUBRO – 2025

ESTRUTURA E DINÂMICA DO BACTERIOMA DE SEMENTES DE
MILHO DE GENÓTIPOS CONTRASTANTES SUBMETIDAS A ALTAS
TEMPERATURAS

BEATRIZ ELISA BARCELOS CYRÍACO

Tese apresentada ao Centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia Vegetal

Orientador: Dr. Fabio Lopes Olivares

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

OUTUBRO – 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

C997

Cyriaco, Beatriz Elisa Barcelos.

ESTRUTURA E DINÂMICA DO BACTERIOMA DE SEMENTES DE MILHO DE GENÓTIPOS
CONTRASTANTES SUBMETIDAS A ALTAS TEMPERATURAS / Beatriz Elisa Barcelos Cyriaco. -
Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

88 f. : il.

Bibliografia: 75 - 84.

Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2025.

Orientador: Fabio Lopes Olivares.

1. Microbiota. 2. Estresse térmico. 3. Diversidade bacteriana. 4. Sustentabilidade. 5.
Bioinoculantes. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6


ESTRUTURA E DINÂMICA DO BACTERIOMA DE SEMENTES DE MILHO DE GENÓTIPOS CONTRASTANTES SUBMETIDAS A ALTAS TEMPERATURAS

BEATRIZ ELISA BARCELOS CYRÍACO


Tese apresentada ao Centro de Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia Vegetal

Aprovada em 30 de outubro de 2025.


Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **ALINE CHAVES INTORNE**
Data: 27/01/2026 11:01:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Aline Chaves Intorne (D.Sc., Biotecnologia) – UENF

Documento assinado digitalmente
 **ALESSANDRO COUTINHO RAMOS**
Data: 26/01/2026 10:52:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Alessandro Coutinho Ramos (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

Documento assinado digitalmente
 **LUC FELICIANUS MARIE ROUWS**
Data: 20/01/2026 12:17:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Luc Felicianus Marie Rouws (D.Sc., Química Biológica) – Embrapa

Documento assinado digitalmente
 **FABIO LOPES OLIVARES**
Data: 27/01/2026 18:20:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Fabio Lopes Olivares (D.Sc. Ciências do Solo) - UENF

Orientador

*Dedico este trabalho aos meus avós Antônio
Manoel Barcelos (in memoriam), Natalina Fortkamp
Barcelos (in memoriam) e minha mãe Roselise Barcelos,
que pavimentaram meus caminhos até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, por todos estes anos de acolhimento em suas estruturas, sendo fundamental para o meu desenvolvimento acadêmico, profissional e pessoal.

Aos órgãos de fomento FAPERJ, CAPES e CNPq pelos recursos necessários para a minha formação acadêmica, execução deste trabalho e a possibilidade da realização de um sonho, o Doutorado Sanduíche.

Ao meu orientador, Dr. Fabio Lopes Olivares, por esses treze anos de ensinamentos, convivência e amizade. Jamais esquecerei como é ter um orientador que não mede esforços pela pesquisa de qualidade na direção de uma agricultura sustentável e que nunca limitou a criatividade de seus alunos no aperfeiçoamento do pensamento científico.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal que me formaram com exímia competência no ensino. Em especial, os professores que muito me apoiaram nessa caminhada e também contribuíram para a execução deste trabalho: Dr. Gonçalo Apolinário, Dra. Antônia Elenir, Dra. Maura da Cunha, Dra. Clícia Gravitól e Dra. Claudete Santa Catarina.

À Dra. Viviane Cordovez e ao Dr. Jos Raaijmakers por me receberem de braços abertos no NIOO-KNAW (Países Baixos) durante o período de Doutorado Sanduíche. Uma das melhores experiências da minha vida. Os ensinamentos e a gratidão são eternos.

À secretária Margareth Paes, por sempre auxiliar os alunos da melhor forma com sua simpatia e competência.

Aos amigos de laboratório pela ajuda em experimentos, análises e discussões de ideias em meio a muitos cafés e bolinhos – Gabriela Brazil, Rafael Ribeiro, João Pedro Mattos, Sara Sangi, Diego Sena, Letícia Oliveira, Letícia Cespom, Rayane Ormino, Juliana Dias, Laysa Balbi, Gabriela Petroceli, Daniel Quintanilha, João Vitor e Gabriela Souza. Ao amigo Jefferson Brendon pela colaboração neste trabalho.

A todos que me apoiaram até aqui, muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT	III
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Domesticação vegetal e melhoramento genético.....	4
Interações bactéria-planta.....	5
Bactérias promotoras do crescimento vegetal.....	6
Microbiota associada às sementes	8
OBJETIVO GERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
MATERIAL E MÉTODOS.....	10
Material vegetal.....	10
Análise de vigor das sementes.....	10
Teste de germinação	10
Cultivo das plantas em condições axênicas.....	11
Quantificação bacteriana	11
Atividade enzimática microbiana.....	12
Extração e sequenciamento de DNA.....	12
Análise de metabarcoding	13
Perfil fisiológico das comunidades microbianas	13
Ensaio de inoculação de comunidades	14
Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR).....	15
Microscopia eletrônica de varredura.....	16
Análises estatísticas.....	16
RESULTADOS	17
Análise do Vigor das Sementes.....	17
Teste de Germinação das Sementes.....	18
Quantificação Bacteriana.....	20
Atividade Enzimática Microbiana	22
Análise de Metabarcoding.....	23
Análise de Diversidade Alfa	24
Análise de Diversidade Beta	26
Atribuições Taxonômicas Bacterianas	28
Perfil fisiológico e metabólico das comunidades microbianas.....	41
Ensaio de inoculação de comunidades em casa de vegetação	47

PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)	48
Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das sementes	50
DISCUSSÃO	53
CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
APÊNDICES.....	73

1 CYRÍACO, Beatriz Elisa Barcelos; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense
2 Darcy Ribeiro; outubro de 2025; Estrutura e dinâmica do bacterioma de sementes de
3 milho de genótipos contrastantes submetidas a altas temperaturas; Orientador: Dr.
4 Fabio Lopes Olivares.

6 RESUMO

7 As plantas coexistem com microrganismos que desempenham um papel
8 fundamental no seu desenvolvimento, nutrição e resiliência a condições
9 desfavoráveis. Dentro deste microbioma, as bactérias promotoras do crescimento
10 vegetal (PGPB) desempenham papéis como a fixação de nitrogênio, a solubilização
11 de nutrientes, a produção de fitormônios e a proteção contra estresses bióticos e
12 abióticos. Técnicas como o melhoramento genético de plantas e transgenia vegetal
13 desconsideram o papel das interações planta-microrganismos. Nesse sentido, sob um
14 cenário de aquecimento global, o efeito do calor sobre o microbioma de sementes
15 assume relevância para práticas agrícolas mais sustentáveis. Neste estudo, foi
16 avaliado o efeito do tratamento térmico a 60 °C e 70 °C na comunidade bacteriana
17 associada às sementes de três genótipos contrastantes de milho: semente crioula (Sol
18 da Manhã), um híbrido comercial (SHS 5050) e uma linhagem geneticamente
19 modificada (DKB 177). Além dos testes de germinação e vigor, foram realizadas
20 contagens de bactérias heterotróficas e diazotróficas, atividade microbiana através da
21 hidrólise de FDA e diversidade bacteriana através de análise metataxonômica. A
22 funcionalidade das comunidades foi avaliada pela predição de vias metabólicas
23 através do PICRUST2 e pela Ecoplacas Biolog, enquanto a resposta molecular vegetal
24 foi avaliada através da expressão de genes com biomarcadores. Os dados indicaram
25 que a termoterapia promoveu mudanças significativas na estrutura e função das
26 comunidades bacterianas, com comportamento diferencial entre os genótipos. Maior
27 estabilidade e redundância funcional foram encontradas para o genótipo crioulo Sol
28 da Manhã, que apresentou bactérias com maior potencial para a síntese de
29 metabólitos benéficos e com alta resistência térmica. Uma resposta intermediária foi
30 encontrada para SHS, que apresentou a maior expressão de genes de atividade
31 hormonal e antioxidante, enquanto o genótipo transgênico DKB mostrou maior
32 sensibilidade, com menor diversidade bacteriana e potencial metabólico. A expressão
33 gênica indicou que existem diferentes estratégias de adaptação molecular e, embora
34 o calor atue como um filtro ecológico que reorganiza as comunidades bacterianas,

35 essa seleção ocorre de forma dependente do genótipo. Os resultados indicam que o
36 tratamento térmico de sementes pode ser uma ferramenta seletiva para
37 microrganismos com comportamento termotolerante e indicam a importância das
38 variedades crioulas como fonte de microbiomas resilientes com potencial para o
39 desenvolvimento de bioinoculantes adaptados ao cenário de mudanças globais.

40 **Palavras-chave:** *microbiota; estresse térmico; diversidade bacteriana;*
41 *sustentabilidade; bioinoculantes.*

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60 CYRÍACO, Beatriz Elisa Barcelos; D.Sc.; State University of Northern Fluminense
61 Darcy Ribeiro; October, 2025; Structure and dynamics of the seed bacteriome of
62 contrasting maize genotypes subjected to high temperatures; Supervisor: Dr. Fabio
63 Lopes Olivares.

64

ABSTRACT

65 Plants coexist with microorganisms that play a fundamental role in their
66 development, nutrition, and resilience to unfavorable conditions. Within this
67 microbiome, plant growth-promoting bacteria (PGPB) perform functions such as
68 nitrogen fixation, nutrient solubilization, phytohormone production, and protection
69 against biotic and abiotic stresses. Plant breeding and genetic engineering approaches
70 often overlook the role of plant–microorganism interactions. In this context, under a
71 global warming scenario, the effect of heat on the seed microbiome becomes highly
72 relevant for the development of more sustainable agricultural practices. In this study,
73 the effects of heat treatments at 60 °C and 70 °C on the bacterial community
74 associated with seeds of three contrasting maize genotypes were evaluated: a
75 landrace variety (Sol da Manhã), a commercial hybrid (SHS 5050), and a genetically
76 modified line (DKB 177). In addition to germination and vigor tests, counts of
77 heterotrophic and diazotrophic bacteria were performed, microbial activity was
78 assessed through fluorescein diacetate (FDA) hydrolysis, and bacterial diversity was
79 analyzed using metataxonomic approaches. Community functionality was evaluated
80 by predicting metabolic pathways with PICRUST2 and Biolog EcoPlates, while plant
81 molecular responses were assessed by analyzing the expression of biomarker genes.
82 The data indicated that thermotherapy promoted significant changes in the structure
83 and function of bacterial communities, with genotype-dependent responses. Greater
84 stability and functional redundancy were observed in the landrace genotype Sol da
85 Manhã, which harbored bacteria with a higher potential for synthesizing beneficial
86 metabolites and greater thermal resistance. An intermediate response was observed
87 in SHS, which showed the highest expression of genes related to hormonal activity
88 and antioxidant responses, whereas the transgenic genotype DKB exhibited greater
89 sensitivity, characterized by lower bacterial diversity and reduced metabolic potential.
90 Gene expression analyses revealed distinct molecular adaptation strategies and
91 showed that, although heat acts as an ecological filter reshaping bacterial
92 communities, this selection process is genotype-dependent. These results suggest
93 that seed heat treatment can serve as a selective tool for thermotolerant

94 microorganisms and highlight the importance of landrace varieties as sources of
95 resilient microbiomes with potential to develop bioinoculants adapted to global change
96 scenarios.

97 **Keywords:** *microbiota; heat stress; bacterial diversity; sustainability; bioinoculants.*

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119 INTRODUÇÃO

120 Plantas são holobiontes, hospedando diversas comunidades de
121 microrganismos, predominantemente bactérias e fungos (Sena et al., 2024). As
122 interações planta-microrganismo são críticas para as plantas hospedeiras, pois
123 desempenham um papel fundamental na nutrição, crescimento e tolerância a
124 estresses bióticos e abióticos (Das et al., 2022). Tais comunidades microbianas
125 podem ser endofíticas, onde vivem dentro dos tecidos do hospedeiro, mas sem causar
126 doença, ou epifíticas, vivendo na superfície das plantas. O microbioma da rizosfera
127 também desempenha um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das
128 plantas, sendo uma comunidade de microrganismos que vive no solo, ao redor das
129 raízes (Vishwakarma et al., 2020).

130 O milho (*Zea mays* L., família Poaceae) está entre as espécies de culturas mais
131 importantes globalmente, tendo enorme valor agrônomo e social. É nativo da
132 América Central e descende de seu ancestral selvagem, o teosinto, que foi
133 domesticado há cerca de 9.000 anos (Kistler et al., 2020). O processo de
134 domesticação foi acompanhado por várias mudanças fisiológicas e morfológicas na
135 planta, levando ao moderno alimento básico produtivo e nutritivo que é hoje (Zhang et
136 al., 2023a). Além de ser um componente chave de muitas dietas ao redor do mundo,
137 o milho é usado como ração animal e para fins industriais, como a produção de
138 biocombustíveis, amido e açúcar (Maitra & Singh, 2021). O Brasil é o terceiro maior
139 produtor global de milho, com uma área plantada de 20,838 milhões de hectares, com
140 uma produtividade média de 5.478 kg/ha e produção total de 22,9622 milhões de
141 toneladas (CONAB, 2024).

142 O melhoramento genético vegetal visa selecionar genótipos com
143 características interessantes, como uniformidade de plantas, aumento de
144 produtividade e resistência a estresses bióticos e abióticos (Wani et al., 2022). Através
145 da criação de organismos geneticamente modificados, foram adicionadas
146 características como tolerância a herbicidas e resistência a certas pragas aos
147 genótipos de milho, tornando as plantas mais tolerantes a fatores limitantes de
148 produção (Kumar et al., 2020). Tais estratégias têm sido essenciais para os avanços
149 tecnológicos na área, com o conseqüente aumento da produtividade das lavouras que

150 abastecem a demanda do mercado. No entanto, consideram apenas as
151 características fenotípicas e fisiológicas das plantas, desconsiderando o microbioma
152 das culturas. As plantas são holobiontes e, como tal, seu microbioma é uma parte
153 essencial para uma compreensão integral das respostas das plantas (Koide, 2023).

154 A rizosfera, as raízes e a filosfera são habitats microbianos bem documentados
155 na literatura científica, porém, informações sobre as interações semente-
156 microrganismo ainda são escassas (Romão et al., 2025). Esses microrganismos
157 desempenham um papel crítico na saúde da semente, pois contribuem para a
158 manutenção do vigor da semente, supressão de fitopatógenos e promoção do
159 crescimento e desenvolvimento da planta, particularmente durante a fase crítica, entre
160 a germinação da semente e o estabelecimento da plântula (Li et al., 2025).

161 Os microrganismos das sementes são transmitidos horizontalmente, através da
162 água, solo ou agentes polinizadores, ou verticalmente, passando da planta-mãe para
163 as próximas progênes (Johnston-Monje et al., 2021). O estudo e a aplicação desses
164 microrganismos em produtos biológicos são promissores, uma vez que a transmissão
165 vertical pode garantir que características benéficas sejam herdadas por gerações
166 futuras (Abdelfattah et al., 2023). O microbioma da semente pode ser modulado pela
167 espécie da planta, genótipo e ambiente, o que pode afetar a estrutura e a função
168 desses microrganismos (Delitte et al., 2021).

169 Microrganismos benéficos, como as bactérias promotoras do crescimento
170 vegetal (PGPB), são essenciais para a nutrição vegetal através da fixação biológica
171 de nitrogênio (Guo et al., 2023), solubilização de fosfato e produção de sideróforos
172 (Timofeeva et al., 2023) e pela promoção do crescimento vegetal através da produção
173 de fitohormônios e compostos orgânicos voláteis (Orozco-Mosqueda et al., 2023).
174 Eles também aumentam a resistência a patógenos (Ngalimat et al., 2021; Triantafyllou
175 et al., 2023) e contribuem para aliviar estresses hídrico, térmico e salino,
176 principalmente por bactérias do gênero *Bacillus* (Etesami et al., 2023; Ghazala et al.,
177 2023).

178 As mudanças climáticas, especialmente o aquecimento global e a maior
179 frequência de secas, têm levantado questões científicas sobre como diferentes
180 estresses abióticos afetam a produtividade das culturas agrícolas. Além de suas

181 características fenotípicas e fisiológicas, o calor excessivo tem a capacidade de alterar
182 tanto a composição quanto as interações entre as comunidades bacterianas que
183 habitam as raízes, a rizosfera e os tecidos internos das plantas, o que pode modificar
184 processos ecológicos essenciais, como a ciclagem de nutrientes, a tolerância ao
185 estresse hídrico e a resistência a fitopatógenos (Trivedi et al., 2022).

186 Em condições de aquecimento e seca, uma tendência comum aparece, com
187 um aumento de bactérias gram-positivas mais resistentes à dessecação e uma
188 diminuição de bactérias gram-negativas sensíveis ao calor, afetando potencialmente
189 processos metabólicos chave da ciclagem de nutrientes e, em última análise, uma
190 perda de diversidade funcional nessas comunidades (Abdul Rahman et al., 2021;
191 Bogati & Walczak, 2022). Essas alterações também se relacionam à chamada “cry for
192 help” das plantas, caracterizada pela exsudação radicular de compostos que recrutam
193 microrganismos benéficos capazes de mitigar estresses bióticos e abióticos (Liu et al.,
194 2020). Determinar como o microbioma das plantas pode ser afetado pelo aumento
195 das temperaturas é necessário se quisermos desenvolver bioinoculantes para
196 aumentar os rendimentos das plantas em um cenário de aquecimento global.

197 Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a modulação de
198 comunidades bacterianas presentes nas sementes de milho de diferentes genótipos,
199 incluindo a variedade crioula Sol da Manhã, o híbrido comercial Santa Helena SHS
200 5050 e o genótipo geneticamente modificado DKB 177, submetidos a altas
201 temperaturas de 60 °C e 70 °C. Foram utilizadas abordagens microbiológicas,
202 fisiológicas e moleculares para avaliar como as altas temperaturas podem impactar a
203 biodiversidade e a atividade de tais populações e afetar a emergência de plântulas. A
204 compreensão da composição dessas populações bacterianas e de como elas podem
205 ser afetadas pelo estresse térmico pode ser a base para a criação de bioinoculantes,
206 visando aprimorar o crescimento e o desenvolvimento de plantas em condições de
207 estresse, especialmente em um cenário de aquecimento global.

208

209

210 **REVISÃO DE LITERATURA**

211 **Domesticação vegetal e melhoramento genético**

212

213 A domesticação de plantas, que ocorreu há cerca de 10.000 anos, foi o primeiro
214 passo na nutrição humana e nas técnicas agronômicas contemporâneas (Fuller et al.
215 2023). Essa seleção vegetal, seja ela consciente ou inconsciente como descrito por
216 Charles Darwin, acarretou em modificações nas espécies vegetais que foram
217 essenciais para a manutenção da vida humana, aumentando a produtividade e,
218 conseqüentemente, atendendo às necessidades alimentares das populações.

219 A razão inicial para a seleção artificial foi garantir alimentos e fibras, dando
220 origem às sociedades agrícolas da era Neolítica (Clement et al. 2021). Ao longo dos
221 anos, as espécies de plantas foram modificadas em termos de suas estruturas
222 vegetativas, como características morfológicas das folhas e exsudatos radiculares. A
223 transição da coleta para o cultivo baseia-se na hipótese de que os agricultores
224 primitivos perceberam não apenas as características fenotípicas das espécies, mas
225 também a reprodução e adaptação das plantas (Fuller et al., 2023). A seleção vegetal
226 consciente pode também impactar a composição microbiana das plantas, podendo
227 levar à uma diminuição da diversidade e especificidade destes microrganismos
228 (Gutierrez & Grillo 2022; Berg & Cernava 2022).

229 Dada a população mundial crescente e a demanda cada vez maior para
230 produzir mais alimentos, somado aos estresses bióticos e abióticos sofridos pelas
231 culturas vegetais, estudos surgiram focando no melhoramento genético. As
232 tecnologias ômicas permitiram a comparação do genoma das espécies cultivadas
233 para aplicação no melhoramento de plantas (Aziz & Masmoudi, 2025). No entanto, o
234 modelo de seleção convencional baseado em fenotipagem e alta produtividade
235 resultou em uma severa redução da diversidade genética (Khoury et al., 2022). Surge
236 então a necessidade de adotar práticas que combinem o melhoramento genético com
237 o estudo dos microbiomas vegetais, tendo em vista que microrganismos benéficos
238 podem auxiliar as plantas a uma maior produtividade e resistência a fatores adversos.

239

240

241 **Interações bactéria-planta**

242

243 Plantas e microrganismos coevoluíram por milhões de anos, resultando em
244 interações ecológicas que desempenharam papéis na adaptação e sobrevivência de
245 ambos os organismos (Trivedi et al. 2020). As plantas estão associadas a uma
246 variedade de microrganismos, que têm um impacto direto no crescimento e
247 desenvolvimento vegetal e na tolerância ao estresse (Fitzpatrick et al., 2020). Além
248 disso, eles formam estruturas dinâmicas onde genótipos de plantas, condições
249 ambientais e interações microrganismo-microrganismo são fatores essenciais para a
250 composição e função do microbioma (Trivedi et al., 2020; Mesny et al., 2023).

251 Essas interações são marcadas por sinalizações químicas que vão
252 desempenhar um papel fundamental no tipo de relação estabelecida, seja ela de
253 comensalismo, parasitismo ou mutualística. As raízes, por exemplo, secretam uma
254 mistura de açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos que podem atuar como fontes
255 de carbono, favorecendo a colonização de microrganismos benéficos na rizosfera
256 (Pantigoso et al., 2022). Essa linguagem de sinalização de raízes e microrganismos é
257 considerada uma das estratégias-chave para a montagem e seleção do microbioma
258 radicular com funções benéficas, como aquisição de nutrientes e tolerância ao
259 estresse (Fitzpatrick et al., 2020; Pantigoso et al., 2022). Todas essas interações
260 fazem parte da estrutura do holobionte, que é a planta juntamente com sua microbiota,
261 onde os microrganismos são essenciais para a adaptação da planta ao ambiente,
262 mantendo-a viva e saudável (Fitzpatrick et al., 2020). Mesny et al. (2023) relataram
263 que a coevolução entre plantas e microrganismos afeta diretamente o desempenho
264 do hospedeiro, destacando a relevância de uma microbiota equilibrada para uma
265 planta saudável.

266 O ambiente também tem um efeito determinante em todas essas relações, pois
267 afeta a composição e a funcionalidade da comunidade microbiana (Trivedi et al.,
268 2020). O tipo de solo, a disponibilidade de nutrientes e o clima influenciam o
269 recrutamento e a permanência de microrganismos, fazendo com que o desempenho
270 e as características difiram entre espécies e genótipos de plantas (Ware et al., 2021).
271 No cenário de mudanças climáticas em que vivemos, é necessário entender o efeito
272 do ambiente na estrutura e função do microbioma para antecipar a resposta da planta,

273 ao mesmo tempo em que se prevê a manipulação de comunidades microbianas para
274 uma agricultura sustentável (Trivedi et al., 2020; Ware et al., 2021).

275 Todas essas percepções ecológicas e evolutivas sobre o papel das bactérias
276 nas interações com as plantas impulsionam a busca por grupos de interesse
277 biotecnológico. O conhecimento sobre este tema permite a descoberta de
278 microrganismos que podem induzir o crescimento de plantas, e a implementação de
279 práticas agrícolas mais eficientes e sustentáveis (Fitzpatrick et al., 2020; Mesny et al.,
280 2023).

281 **Bactérias promotoras do crescimento vegetal**

282

283 As bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) têm despertado
284 grande interesse na biotecnologia agrícola pelo potencial de reduzir o uso de
285 fertilizantes minerais e favorecer sistemas de cultivo mais sustentáveis (Kumar et al.,
286 2024). A microbiota bacteriana pode estabelecer relações simbióticas ou associativas
287 com as plantas, com interações mutualísticas em que estes microrganismos se
288 beneficiam dos exsudados vegetais enquanto auxiliam plantas a crescerem e se
289 desenvolverem.

290 As BPCVs podem se associar às plantas epifiticamente, colonizando a
291 superfície da planta, ou endofiticamente, colonizando o interior dos tecidos vegetais,
292 promovendo o crescimento vegetal de forma direta ou indireta (Gómez-Godinez et al.,
293 2023). Entre os mecanismos diretos estão a fixação biológica de nitrogênio, a
294 solubilização de fosfatos e a produção de fitormônios reguladores do crescimento,
295 como auxinas, giberelinas e citocininas (Cassán et al., 2020). Os mecanismos
296 indiretos incluem o controle biológico de fitopatógenos, por competição e antibiose, e
297 a indução de tolerância a estresses abióticos, como seca, salinidade e metais pesados
298 (Lahlali et al., 2022; Kumar et al., 2024).

299 Um exemplo muito conhecido de simbiose positiva é o das plantas leguminosas
300 com as bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, que formam nódulos
301 radiculares, reduzindo o N₂ atmosférico a NH₃ pela enzima nitrogenase, tornando-o
302 disponível para a planta (Raza et al., 2020). Telles et al. (2023) estimaram uma

303 economia de aproximadamente US\$ 15 bilhões por ano quando a utilização de ureia
304 foi substituída pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) na cultura da soja brasileira.

305 O efeito positivo da inoculação de bactérias diazotróficas tem sido amplamente
306 explorado para diversas culturas, incluindo o milho. Quando exposta à seca moderada
307 e baixa disponibilidade de nitrogênio, a inoculação com *Gluconacetobacter*
308 *diazotrophicus* (cepa Pal5) aumentou a biomassa vegetal, o teor de clorofila e a
309 eficiência no uso da água, comprovando a eficácia dessa espécie bacteriana em
310 aliviar o efeito do déficit hídrico e reduzir a necessidade de fertilizantes minerais (Tufail
311 et al., 2021). Irineu et al. (2022) relataram que a inoculação de milho com a bactéria
312 *Herbaspirillum seropedicae* aumentou significativamente a biomassa de raízes e parte
313 aérea, o teor de pigmentos verdes, a absorção e assimilação de nitrogênio e a
314 produção de fitormônios. Em condição de campo, a inoculação de *H. seropedicae*
315 resultou em ganhos de produtividade e maior eficiência de fixação biológica de
316 nitrogênio sob diferentes níveis de aplicação de fertilizantes nitrogenados (Alves et al.
317 2021).

318 Consórcios bacterianos também têm sido relatados como eficazes para
319 biocontrole em milho. Um consórcio composto por *Azospirillum brasilense*,
320 *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter sp.* e *Sphingomonas sp.* foi capaz de manter o
321 rendimento de grãos, mesmo com a redução de 50% de N mineral, mostrando
322 respostas diferenciadas entre genótipos e a possibilidade de substituir parcialmente
323 fertilizantes químicos (Molina-Romero et al. 2021). Esses resultados enfatizam o
324 potencial biotecnológico de diazotróficos na promoção do crescimento em um sistema
325 de agricultura sustentável.

326 A aplicação de fósforo solúvel ainda é uma prática comum na agricultura,
327 embora grande parte do nutriente se torne indisponível às plantas devido à fixação
328 por minerais do solo (Rawat et al., 2021). Nesse contexto, a inoculação de bactérias
329 solubilizadoras de fosfato representa uma alternativa sustentável e de menor impacto
330 ambiental (Wahid et al., 2020). Algumas espécies dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*
331 e *Rhizobium* produzem ácidos orgânicos e enzimas fosfatases que solubilizam o
332 fósforo, permitindo assim que o elemento seja assimilado (Timofeeva et al., 2022).

333 Entre as espécies amplamente exploradas, *Gluconacetobacter diazotrophicus*
334 tem sido destacada por sua capacidade auxiliar o crescimento de plantas deficientes
335 em fósforo, aumentando a concentração de nutrientes nos tecidos e promovendo um
336 incremento de biomassa vegetal (Delaporte Quintana et al., 2017; Ceballos-Aguirre et
337 al., 2023). Esses efeitos são frequentemente atribuídos à produção de fitormônios
338 como auxinas, giberelinas e citocininas, que modulam o desenvolvimento vegetal
339 (Orozco-Mosqueda et al., 2023). De forma semelhante, *H. seropedicae* apresenta
340 elevada capacidade de síntese de ácido indolacético (AIA), além de atuar na fixação
341 biológica de nitrogênio e na solubilização de minerais (Irineu et al., 2022).

342 As interações planta-microrganismo são dinâmicas e influenciadas por fatores
343 ambientais e genéticos. Elucidar essas interações e os mecanismos relacionados à
344 promoção de crescimento são as principais questões da ecologia microbiana aplicada
345 para a sustentabilidade agrícola (Trivedi et al. 2022; Mesny et al. 2023).

346 **Microbiota associada às sementes**

347

348 As sementes e outros materiais propagativos vegetativos hospedam um
349 microbioma, que é crucial para a ecologia e o funcionamento da semente, mas o
350 conhecimento de sua função ainda é limitado (Simonin et al., 2020). Apesar de, até
351 muito recentemente, as sementes serem consideradas estéreis, trabalhos utilizando
352 abordagens ômicas evidenciaram a presença de um microbioma endofítico com
353 potenciais atividades benéficas (Khanal et al., 2024).

354 O microbioma da semente pode ser herdado e transmitido verticalmente, ou
355 seja, da planta mãe para a prole, ou adquirido e transmitido horizontalmente, ou seja,
356 através do solo, água e agentes polinizadores (Abdelfattah et al., 2023). Estes
357 microrganismos desempenham um papel fundamental na germinação e crescimento
358 inicial das plântulas, sendo esta a fase mais crítica no ciclo de vida vegetal
359 (Abdelfattah et al., 2023; Rana & Patil, 2024). Os estudos sobre a funcionalidade
360 desses microrganismos são limitados pois ainda não foi registrado um método de
361 eliminação total do microbioma da semente e grande parte desses microrganismos
362 não são cultiváveis (Romão et al., 2025).

363 Bactérias endofíticas, como *Enterobacter asburiae*, *Pantoea dispersa* e
364 *Pseudomonas putida* foram isoladas de sementes de arroz, apresentando efeitos
365 positivos no crescimento de plântulas, bem como no biocontrole de *Fusarium*
366 *oxysporum* (Verma et al., 2017). Kouzai & Akimoto-Tomiya (2022) relataram a
367 capacidade da bactéria da semente de arroz *Pantoea dispersa* BB1 inibir *Burkholderia*
368 *glumae*, o agente causal da podridão de sementes e plântulas de arroz.

369 Na cultura do milho, foi demonstrado que o microbioma da raiz de genótipos
370 melhorados não era semelhante entre si e também diferentes do teosinto, implicando
371 que essas comunidades variam de acordo com o genótipo (Barnes et al., 2024). O
372 uso de genótipos contrastantes para comparar microbiomas de sementes ajuda a
373 compreender o holobioma da planta e a recuperar táxons bacterianos benéficos que
374 foram deixados para trás no processo de hibridização, abrindo caminho para o
375 desenvolvimento de bioinoculantes específicos.

376 **OBJETIVO GERAL**

377 Avaliar o impacto de altas temperaturas sobre a composição e potencial
378 funcionalidade das comunidades bacterianas associadas a sementes de milho de
379 genótipos contrastantes.

380 **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 381 • Avaliar o efeito das altas temperaturas aplicadas sobre a qualidade fisiológica
382 das sementes de milho;
- 383 • Caracterizar a estrutura, diversidade e atividade metabólica bacteriana após o
384 estresse térmico;
- 385 • Descrever o perfil fisiológico e metabólico das comunidades bacterianas
386 quanto à utilização de diferentes fontes de carbono;
- 387 • Analisar a performance e biomassa vegetal das plântulas de milho inoculadas
388 com comunidades bacterianas das sementes;
- 389 • Analisar a expressão gênica de marcadores relacionados à promoção de
390 crescimento e tolerância ao estresse térmico nas raízes das plântulas;
- 391 • Caracterizar a colonização bacteriana em sementes pré-germinadas;

392 MATERIAL E MÉTODOS

393 Material vegetal

394 Este estudo utilizou três cultivares de milho de genótipos contrastantes: Sol da
395 Manhã (SOL), Santa Helena 5050 (SHS) e Dekalb® 177 (DKB). As sementes da
396 cultivar crioula Sol da Manhã foram cedidas pelo produtor rural Jamil Bráz Corinto, da
397 Fazenda Corinalves, Santo Antônio do Rio Verde, Catalão – Goiás (Brasil), por
398 intermédio do professor Samuel Kamphorst (UNILA, Brasil). As cultivares SHS 5050
399 e DKB 177 são sementes comerciais, sendo a primeira um híbrido superprecoce com
400 alta estabilidade, enquanto a segunda apresenta a tecnologia transgênica VT PRO
401 3™, que confere produção da proteína Bt, responsável pela proteção contra larvas de
402 traça, insetos da ordem Lepidoptera e tolerância ao glifosato (Roundup®). As
403 sementes de milho foram submetidas ao tratamento com calor seco a 60°C e 70°C
404 por 72 horas, conforme adaptação de Silva et al. (2002). Para manter condições
405 axênicas nas análises subsequentes, as sementes foram acondicionadas em frascos
406 de vidro autoclavados, vedados com tampão de algodão.

407 Análise de vigor das sementes

408 O vigor das sementes foi avaliado por meio do teste bioquímico de tetrazólio,
409 conforme as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). As sementes foram
410 submetidas à embebição entre papel por 16 horas a 27°C, seguidas de bissecção
411 longitudinal ao longo do embrião e coloração com solução de cloreto de 2,3,5-trifenil
412 tetrazólio a 0,1% por 3 horas a 30°C. Após esse período, as sementes foram lavadas
413 e mantidas em água destilada até a visualização das superfícies coradas em
414 estereomicroscópio de luz com câmera digital (Zeiss Stemi SV 11). As sementes foram
415 consideradas viáveis quando a área máxima de tecido não corado, flácido ou necrótico
416 não ultrapassava 1/3 do escutelo e do eixo embrionário. Tecidos não corados na
417 região central do escutelo foram interpretados como danos de secagem. Foram
418 analisadas dez sementes por repetição, em três repetições por tratamento.

419 Teste de germinação

420 A embebição das sementes foi realizada em placas de Petri esterilizadas (150
421 × 25 mm) contendo papel germitest autoclavado, no qual as sementes foram
422 posicionadas entre papéis umedecidos com água destilada estéril, equivalente a 2,5

423 vezes o peso do papel. As placas foram incubadas em câmara BOD a 28°C por 16
424 horas antes da semeadura em placas de Petri contendo meio ágar-água 0,5%. As
425 sementes foram então mantidas em BOD a 28°C por 5 dias, sob fotoperíodo de 12
426 horas de luz/12 horas de escuro. Foram colocadas 12 sementes por placa, em três
427 repetições por tratamento. As sementes germinadas foram contadas diariamente para
428 cálculo da porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação
429 (IVG), tempo médio de germinação (TMG) e velocidade média de germinação (VMG)
430 (Maguire, 1962; Borghetti & Ferreira, 2004).

431 **Cultivo das plantas em condições axênicas**

432 Após a embebição, as sementes foram semeadas em frascos de vidro de 3 L
433 autoclavados, contendo 700 g de substrato Basaplant® Hortaliças autoclavado (três
434 vezes por 1 hora, em intervalos de 24 horas). O substrato apresentava as seguintes
435 propriedades físico-químicas: pH 4,9; N (g/Kg): 5,04; P (g/Kg): 3,77; K (g/Kg): 2,10;
436 Ca (g/Kg): 5,20; Mg (g/Kg): 0,40; C (g/Kg): 249,6; S (g/Kg): 0,54; Fe (mg/Kg): 8855;
437 Cu (mg/Kg): 26; Zn (mg/Kg): 90; Mn (mg/Kg): 182; B (mg/Kg): 104,8; U (%): 30,64.
438 Foram adicionados 250 mL de água destilada autoclavada, e os frascos foram
439 vedados com manta de algodão para evitar contaminações. O experimento foi
440 conduzido em triplicata, com dez sementes por repetição, totalizando 30 sementes
441 por tratamento. Os frascos permaneceram em câmara BOD a 28°C por 7 dias,
442 fotoperíodo de 12/12 horas. Ao final do experimento, foram coletadas amostras de
443 raízes e de solo rizosférico para análises posteriores.

444 **Quantificação bacteriana**

445 Sementes germinadas, raízes e solo rizosférico de plântulas cultivadas em
446 condições axênicas foram pesados (1 g) em triplicata e colocados em tubos de ensaio
447 contendo 9 mL de solução salina NaCl 0,85%, realizando diluições seriadas (10^{-1} a
448 10^{-7}). As sementes e raízes foram maceradas na solução salina para obter a diluição
449 10^{-1} . A população bacteriana total foi cultivada em meio Nutrient Broth sólido (13g/L),
450 com estimativa da população por contagem de unidades formadoras de colônia
451 (UFC/mL) através do plaqueamento de 100 μ L das diluições de 10^{-1} a 10^{-4} para
452 sementes e 10^{-4} a 10^{-7} para rizosfera e raiz. Para quantificação e isolamento de
453 bactérias fixadoras de nitrogênio, alíquotas de 100 μ L foram pipetadas em meio semi-

454 sólido JNFb (Baldani et al., 2014) nas mesmas diluições descritas anteriormente e em
455 triplicata. A quantificação de bactérias diazotróficas foi realizada pelo método do
456 Número Mais Provável (Cochran, 1950), utilizando a tabela de McCrady (Okon et al.,
457 1977).

458 **Atividade enzimática microbiana**

459 A atividade microbiana no solo rizosférico das plântulas de milho foi avaliada
460 pelo ensaio de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA). Para isso, 0,5 g de solo
461 de cada tratamento foram pesados em triplicata, com solo autoclavado como controle
462 negativo, e transferidos para tubos cônicos de centrifugação de 15 mL. Foram
463 adicionados 6 mL de tampão fosfato autoclavado (50 mM TPO₄, pH 7,6) e 120 µL da
464 solução de FDA (1 g/L em acetona 100%, armazenada em frascos âmbar). Os tubos
465 foram incubados no escuro em agitador orbital a 180 rpm e 30°C por 1 hora. A reação
466 foi interrompida com 6 mL de acetona 50%, seguida de centrifugação a 5000 rpm por
467 6 minutos. Alíquotas de 200 µL do sobrenadante foram pipetadas em triplicata em
468 placas de poliestireno de 96 poços, e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a
469 492 nm. A curva de calibração foi obtida com leituras de fluoresceína em
470 concentrações de 2 a 20 mg/mL.

471 **Extração e sequenciamento de DNA**

472 Amostras de solo rizosférico de plântulas germinadas em condições axênicas
473 foram coletadas, e 250 mg de solo foram utilizados para a extração de DNA com o kit
474 QIAGEN DNeasy® PowerSoil® Pro, seguindo as instruções do fabricante. Três
475 repetições foram realizadas por tratamento. A integridade do DNA foi verificada por
476 eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e
477 visualizado sob transiluminador UV. A quantificação (ng/µL) e a qualidade do DNA
478 foram avaliadas pelas razões 260/280 e 260/230 em espectrofotômetro NanoDrop®
479 2000 (Thermo Scientific). O sequenciamento da comunidade bacteriana foi realizado
480 na empresa NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, Brasil), onde a região V4 do gene
481 16S rRNA foi amplificada com os primers 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')
482 e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al., 2011) na plataforma
483 MiSeq (Illumina, San Diego, EUA).

484

485 **Análise de metabarcoding**

486 As sequências demultiplexadas foram importadas para o ambiente R para o
487 processamento bioinformático. Inicialmente, os adaptadores correspondentes aos
488 primers 341F (“GTGCCAGCMGCCGCGGTAA”) e 805R (“GGACTACNVGGGTWTCT
489 AAT”) foram removidos utilizando o plugin Cutadapt (Martin, 2011). O processamento
490 subsequente foi conduzido com o pipeline do pacote DADA2 (Callahan et al., 2016).
491 Os parâmetros de filtragem foram definidos como truncLen = c(260, 235), trimLeft =
492 10, maxEE = 2 e truncQ = 2, mantendo-se os demais parâmetros nas configurações
493 padrão. Após a filtragem de qualidade, as sequências foram submetidas ao
494 aprendizado das taxas de erro, inferência das variantes de sequência de amplicon
495 (Amplicon Sequence Variants – ASVs) e pareamento das leituras (reads). A atribuição
496 taxonômica foi realizada por meio do classificador naive Bayes implementado no
497 DADA2, utilizando o banco de dados SILVA (v138.1) (Quast et al., 2013) como
498 referência. Sequências taxonomicamente atribuídas a cloroplastos e mitocôndrias
499 foram removidas. A tabela de abundância de ASVs foi rarefeita para padronização da
500 profundidade de sequenciamento antes das análises de diversidade. As análises de
501 diversidade alfa, beta e gama foram realizadas com os pacotes vegan (Oksanen et
502 al., 2013) e phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013). As análises de abundância relativa
503 e a construção de diagramas de Venn foram conduzidas com o pacote microeco (Liu
504 et al., 2021). Por fim, a predição funcional foi executada com o pacote ggpicrust (Yang
505 et al., 2023), utilizando o banco de dados de vias metabólicas do PICRUST2 (Douglas
506 et al., 2020).

507 **Perfil fisiológico das comunidades microbianas**

508 Com base na utilização de Biolog EcoPlate™ (Biolog Inc., Hayward, CA, EUA)
509 as comunidades microbianas provenientes da rizosfera das plântulas de milho dos
510 diferentes genótipos e tratadas ou não por termoterapia, crescidas em condições
511 axênicas, foram caracterizadas de acordo com a utilização de diferentes fontes de
512 carbono. Para isto, com base na quantificação bacteriana realizada anteriormente, a
513 diluição 10^{-4} do solo rizosférico de cada genótipo e tratamento foi utilizada, pipetando
514 150µL desta diluição na placa Biolog EcoPlate™, nos poços contendo as diferentes
515 fontes de carbono. O mesmo volume de solução salina 0,85% autoclavada foi utilizado
516 nos poços controle contendo água. Cada placa contém 31 fontes de carbono distintas

517 (Tabela S1), em triplicata, representando diferentes classes funcionais como aminas,
518 aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos, fenóis e polímeros. Quando um
519 substrato é metabolizado pelos microrganismos, ocorre a redução do corante
520 tetrazólio violeta, resultando em coloração púrpura cuja intensidade é proporcional à
521 atividade metabólica. As placas foram inoculadas e incubadas a 32°C, sem agitação,
522 e as leituras de absorbância foram realizadas a 630 nm em intervalos de 4 horas nas
523 4 leituras iniciais e 8 horas nas leituras seguintes, totalizando 116 horas de
524 experimento. Os dados de absorbância foram utilizados para calcular o Average Well
525 Color Development (AWCD), índices de diversidade de Shannon e Simpson e
526 consumo metabólico final por classe funcional e fontes de carbono isoladas (mapa de
527 calor) (Sofo & Ricciuti, 2019).

528 **Ensaio de inoculação de comunidades**

529 Comunidades crescidas nas placas de 96 poços Biolog EcoPlate™ de todos os
530 tratamentos (DKB, SHS e SOL tratados ou não a 60°C e 70°C) foram transferidas com
531 o auxílio de um “carimbo” para placas de petri (150 × 25 mm) esterilizadas contendo
532 100mL de meio de cultura sólido Nutrient Broth sólido (13g/L) para o cultivo das
533 comunidades de cada genótipo e tratamento, crescidas nas diferentes fontes de
534 carbono. Após 48h de incubação das placas em estufa a 28°C, as comunidades
535 crescidas em placa foram lavadas com 10mL de solução salina 0.85%, a densidade
536 óptica de cada inóculo foi medida em espectrofotômetro a 600nm e todos os inóculos
537 foram ajustados para uma densidade óptica de 0,5 a 600nm. Para tratamentos
538 controle (não inoculado), foi utilizada solução salina NaCl a 0.85% autoclavada.
539 Sementes de milho dos três genótipos (DKB, SHS e SOL), tratadas ou não por
540 termoterapia (controle, 60°C e 70°C) foram inoculadas com suas respectivas
541 comunidades provenientes da Biolog EcoPlate™.

542 As sementes dos tratamentos SHS 70°C e SOL 70°C, além da inoculação de
543 suas respectivas comunidades, foram inoculadas com as comunidades crescidas nas
544 placas do tratamento DKB 70°C. A inoculação foi feita da seguinte forma: 10 sementes
545 em triplicata de cada tratamento foram imersas nos seus respectivos inóculos
546 padronizados ($OD_{600nm}=0.5$) em tubos falcon de volume 50mL contendo 2mL de
547 inóculo por grama de semente. Os tubos foram dispostos horizontalmente em agitador
548 orbital a 150rpm por 30 minutos, sendo agitados manualmente por 15 minutos após

549 este período e as sementes inoculadas foram dispostas em placas de petri estéreis
550 para secar em fluxo laminar por 15 minutos. As sementes foram então dispostas em
551 vasos de plástico pretos contendo 200g de substrato Basaplant® Hortaliças
552 autoclavado (uma vez por 1 hora) e cada vaso recebeu uma dose extra de 10mL do
553 mesmo inóculo das sementes. Os vasos foram dispostos em casa de vegetação,
554 irrigados com água comum a cada 24h e as plantas coletadas após 7 dias de
555 germinação para análise dos parâmetros biométricos (comprimento de parte aérea,
556 comprimento de raiz, peso fresco de parte aérea e raiz e peso seco de parte aérea e
557 raiz).

558 **Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)**

559 Aproximadamente 200 mg de tecido radicular de cada tratamento previamente
560 descrito foram macerados em nitrogênio líquido com o auxílio de um almofariz e pistilo.
561 A extração do RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen;
562 Thermo Fisher Scientific, Inc.), de acordo com as instruções do fabricante. A
563 concentração do RNA obtido foi determinada por meio do espectrofotômetro
564 NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific). Amostras de RNA com razão de
565 absorvância 260/280 entre 1,8 e 2,0 foram consideradas adequadas para as análises
566 subsequentes. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose a 2%, corado
567 com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

568 A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total utilizando o kit
569 Maxima H Minus Reverse Transcription System (Thermo Fisher Scientific), conforme
570 as recomendações do fabricante. As reações de qPCR foram conduzidas em placas
571 de 48 poços no sistema StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems) sob as
572 seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos
573 de amplificação a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 15 segundos.
574 O volume final de reação foi de 15 µL, contendo 0,75 µL (10 µM) de cada primer
575 (forward e reverse), 7,5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), 3 µL de cDNA e
576 3 µL de água ultrapura. Os primers (Tabela S2) foram desenhados com base em
577 sequências depositadas no banco de dados GenBank e sintetizados pela empresa
578 Exxtend Biotechnology (São Paulo, Brasil). O gene Tubulin alpha-3 chain (TUB) foi
579 utilizado como controle endógeno. A especificidade de cada par de primers foi
580 verificada por meio da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool;

581 Altschul & Lipman, 1990) e confirmada pela análise da curva de dissociação (melting
582 curve). Os níveis relativos de expressão gênica foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$
583 (Livak & Schmittgen, 2001), considerando a expressão do tratamento controle como
584 valor de referência. A análise estatística dos dados foi realizada no software GraphPad
585 Prism versão 8 (GraphPad Software, Boston, MA, EUA), e as diferenças foram
586 avaliadas pelo teste t de Student, adotando-se nível de significância de $p < 0,05$.

587 **Microscopia eletrônica de varredura**

588 Seções longitudinais foram realizadas em sementes germinadas,
589 especificamente na região de protrusão da radícula, para visualização da colonização
590 bacteriana em sementes tratadas ou não com termoterapia. As amostras foram
591 fixadas em solução contendo 4% paraformaldeído (PA), 2,5% glutaraldeído (GA) e
592 tampão fosfato (TPO_4 0,05 M, pH 7,2) por 48 horas. Em seguida, as seções foram
593 lavadas três vezes no mesmo tampão por 40 minutos, desidratadas em série
594 crescente de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, repetido duas vezes) e
595 submetidas à secagem em ponto crítico com CO_2 (Leica CPD300). As amostras foram
596 montadas em stubs de alumínio e metalizadas com ouro e paládio no equipamento
597 SCD050 BAL-TEC. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura
598 EVO 40 (Zeiss).

599 **Análises estatísticas**

600 As análises estatísticas foram realizadas no software R versão 4.1.3, utilizando
601 o RStudio. A normalidade e a homogeneidade de variâncias foram avaliadas pelos
602 testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente, com nível de significância de 5%.
603 Os resultados foram então classificados em grupos paramétricos e não paramétricos.
604 Para dados normais, utilizou-se análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida
605 pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Dados que não atingiram normalidade foram avaliados
606 pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste pós-hoc de Dunn.

607

608

609

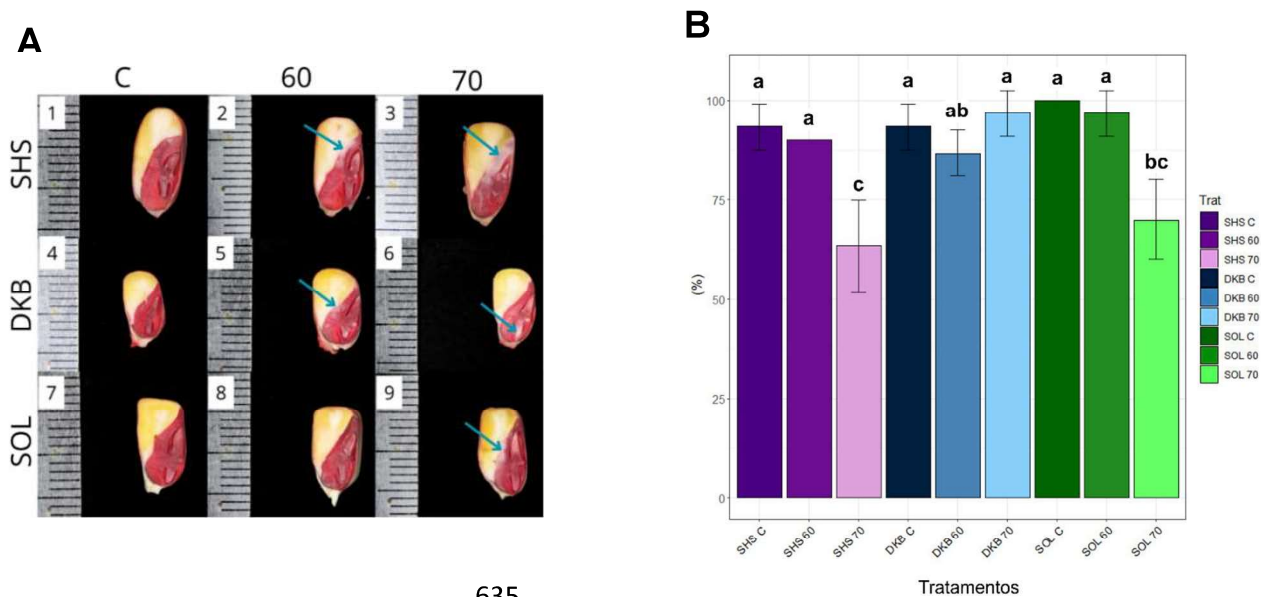
610

611 **RESULTADOS**

612 **Análise do Vigor das Sementes**

613 O teste bioquímico de tetrazólio foi realizado para avaliar o vigor das sementes
614 após os tratamentos de termoterapia. As sementes apresentaram coloração vermelha
615 uniforme em todos os genótipos no tratamento controle, demonstrando vigor
616 adequado para o experimento. Esse cenário se modificou de forma significativa
617 quando a termoterapia foi aplicada (Figura 1A). Em algumas sementes do genótipo
618 SHS, o dano ao vigor nos tratamentos a 60 °C e 70 °C foi observado ao longo do
619 escutelo, com uma área esbranquiçada que cobria mais de um terço dessa região da
620 semente. O genótipo DKB foi o menos afetado pelo estresse térmico, apresentando
621 descoloração em pequenas áreas, especificamente no centro do escutelo e na
622 extremidade da radícula no tratamento a 60 °C e, no tratamento 70 °C, nas
623 extremidades da radícula e da plúmula. No tratamento controle do genótipo SOL, o
624 vigor foi semelhante ao observado na termoterapia a 60 °C, porém, no tratamento a
625 70 °C foram constatadas áreas não coradas no centro do escutelo, característica de
626 dano térmico.

627 O tratamento a 60°C não afetou significativamente o vigor das sementes dos
628 três genótipos. No entanto, observou-se perda significativa de vigor a 70°C para os
629 genótipos SHS e SOL, que apresentaram redução de 30% em ambos os casos (Figura
630 1B). Essa redução no vigor das sementes a 70°C sugere que SHS e SOL são
631 suscetíveis a altas temperaturas, o que está de acordo com a observação visual das
632 áreas não coradas. O genótipo DKB manteve alto vigor em todos os tratamentos,
633 inclusive a 70°C, com 96,67%, indicando que as sementes de DKB são mais tolerantes
634 ao estresse térmico, preservando o vigor mesmo sob condições de alta temperatura.



635

636 **Figura 1.** (A) Sementes de milho de diferentes genótipos submetidas ao teste de tetrazólio,
 637 com tecidos metabolicamente ativos evidenciados pela coloração vermelha nas regiões do
 638 escutelo e do eixo embrionário e tecidos descoloridos indicados pelas setas. Sol da Manhã
 639 (SOL), Santa Helena 5050 (SHS) e Dekalb® 177 (DKB); Controle (C) Tratamento 60°C (60)
 640 e Tratamento 70 °C (70); (B) Porcentagem de vigor das sementes. Letras iguais nas colunas
 641 não diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

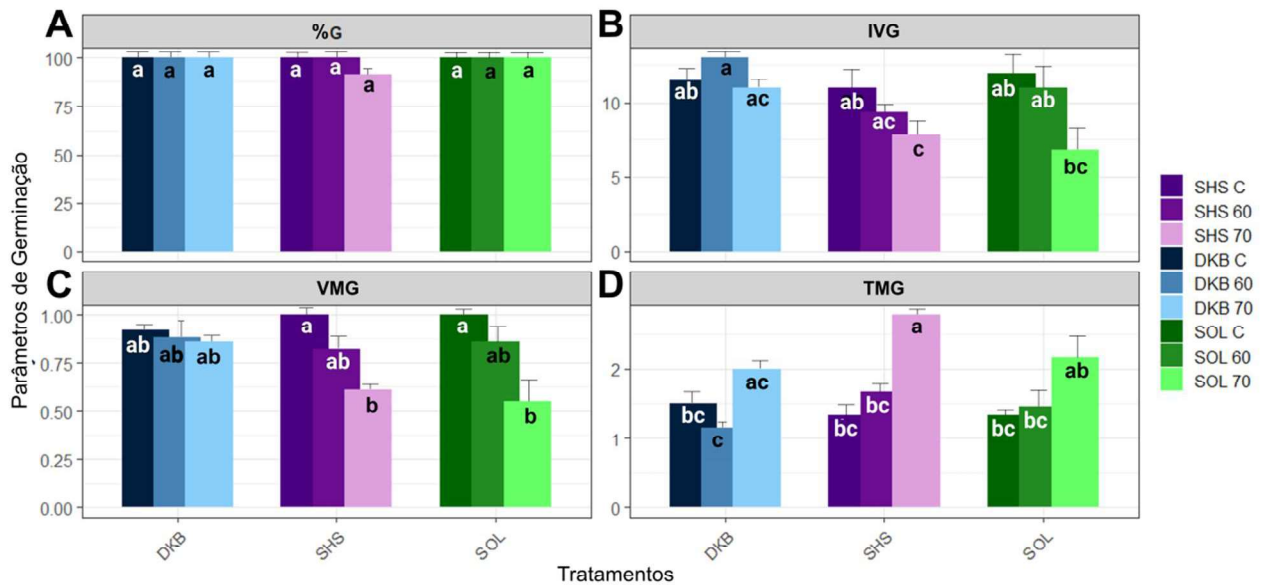
642

643 **Teste de Germinação das Sementes**

644 Para os valores de percentual de germinação (Figura 2A), os resultados não
 645 mostraram diferenças significativas entre os tratamentos para os três genótipos de
 646 milho. O índice médio de germinação variou significativamente entre os tratamentos e
 647 genótipos (Figura 2B). O genótipo DKB submetido ao tratamento de 60°C apresentou
 648 o maior índice de germinação (12,67), enquanto SHS a 70°C e SOL a 70°C mostraram
 649 os menores valores (4,56 e 6,11, respectivamente). A termoterapia não afetou
 650 estatisticamente o índice de germinação do genótipo DKB. Os tratamentos controle
 651 de todos os genótipos apresentaram índices de germinação relativamente altos, com
 652 valores próximos a 10,67 para SOL, 9,83 para SHS e 10,75 para DKB.

653 O genótipo DKB manteve elevada velocidade de germinação em todos os
 654 tratamentos. No entanto, o genótipo SHS apresentou menor desempenho, com
 655 velocidade de germinação reduzida a 0,69 sementes/dia sob 60 °C e a 0,46
 656 sementes/dia sob 70 °C (Figura 2C). O genótipo SHS tratado a 70°C teve o maior

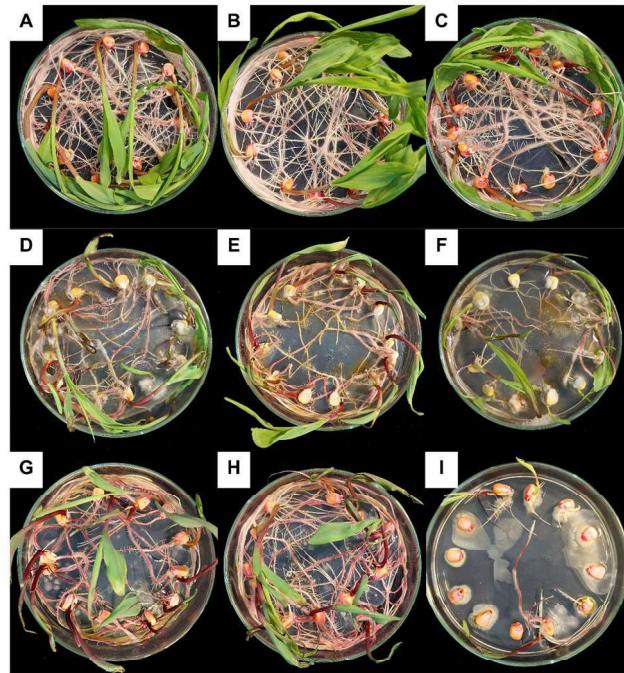
657 tempo médio de germinação (2,27 dias), indicando uma possível resposta de estresse
 658 às altas temperaturas (Figura 2D). No tratamento 60°C, o genótipo DKB apresentou o
 659 menor tempo médio de germinação (1,15 dias). Os tratamentos controle de todos os
 660 genótipos mostraram tempos médios de germinação uniformes, com média de 1,21
 661 dias.



662

663 **Figura 2.** Média \pm desvio padrão dos parâmetros de germinação, incluindo %G - percentual
 664 de germinação (A), IVG - índice de velocidade de germinação (B), VMG - velocidade média
 665 de germinação (C) e TMG - tempo médio de germinação (D). Letras iguais nas colunas não
 666 diferem significativamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

667



668

669 **Figura 3.** Plântulas de milho germinadas em meio ágar-água a 0,5% após 5 dias a 28°C em
 670 incubadora BOD. As letras na figura correspondem aos seguintes cultivares: DKB - A, B e C;
 671 SOL - D, E e F; SHS - G, H e I; na seguinte ordem: Controle, 60°C e 70°C. A cultivar SOL
 672 apresentou crescimento fúngico nas placas de ágar-água e o tratamento SHS 70 apresentou
 673 intenso crescimento bacteriano.

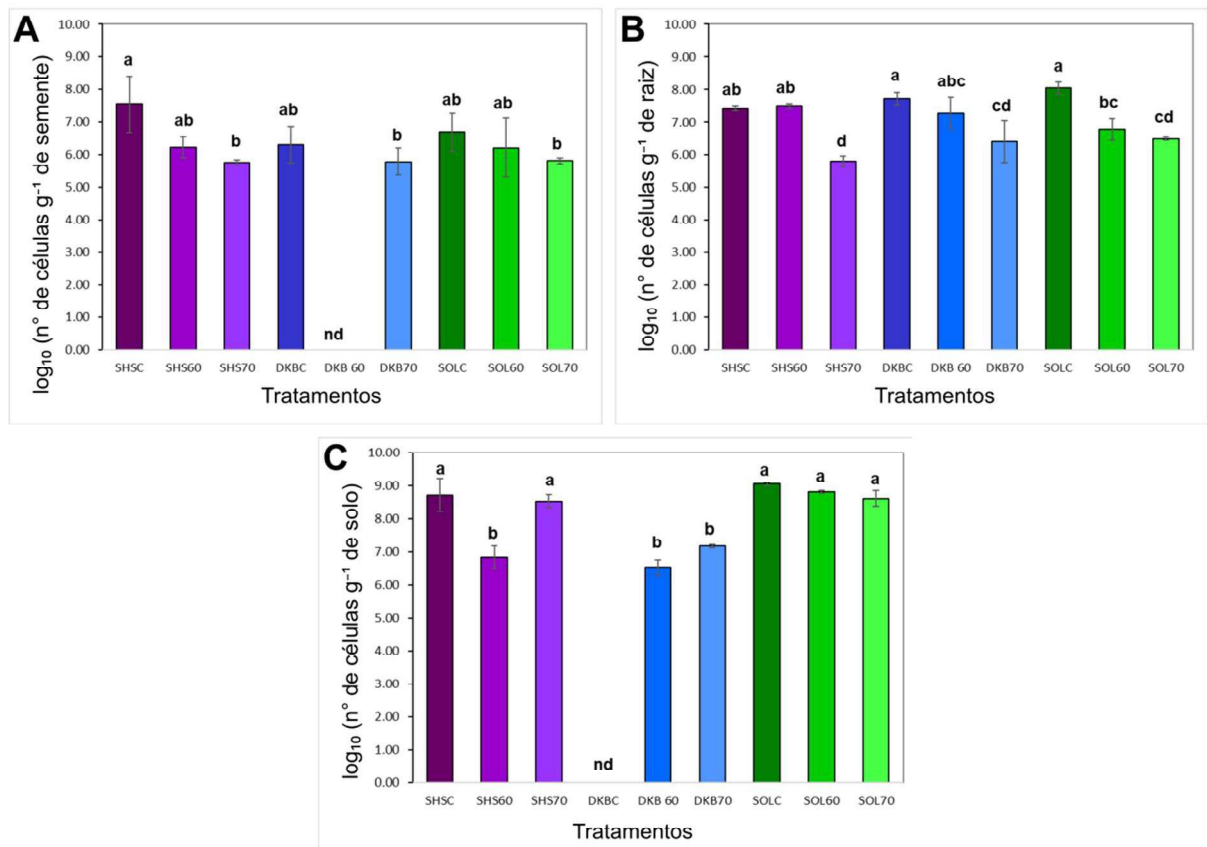
674

675 **Quantificação Bacteriana**

676 No resultado da contagem de bactérias totais nas sementes de milho (Figura
 677 4A), a cultivar SHS tratamento controle apresentou diferença significativa quando
 678 comparado ao tratamento 70°C, com o valor de $7,55 \pm 0,87 \log_{10}$ células por grama de
 679 sementes no tratamento controle e $5,75 \pm 0,08 \log_{10}$ células no tratamento 70°C. Não
 680 houve crescimento bacteriano da cultivar DKB quando tratada a 60°C. Os tratamentos
 681 controle e 70°C desta cultivar não diferiram estatisticamente. A cultivar SOL não
 682 apresentou diferença significativa entre os tratamentos.

683 Todos os genótipos apresentaram valores mais baixos no tratamento a 70°C
 684 na contagem bacteriana das raízes (Figura 4B), com números de células variando de
 685 $5,80 \pm 0,17 \log_{10}$ (SHS) a $6,50 \pm 0,05 \log_{10}$ (SOL). O cultivar SOL também apresentou
 686 uma redução significativa no tratamento a 60°C, com $6,79 \pm 0,32 \log_{10}$ células por
 687 grama de raiz.

688 Para o solo rizosférico, o genótipo SHS apresentou uma redução significativa
 689 apenas no tratamento a 60°C, com $6,84 \pm 0,35 \log_{10}$ células por grama de solo (Figura
 690 4C). A cultivar DKB não apresentou crescimento bacteriano no tratamento controle, e
 691 os tratamentos a 60°C e 70°C mostraram valores de $6,55 \pm 0,24 \log_{10}$ células e
 692 $7,17 \pm 0,06 \log_{10}$ células, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os
 693 tratamentos para o cultivar SOL, que apresentou valores variando de $8,62 \pm 0,24 \log_{10}$
 694 células g^{-1} solo (70°C) a $9,05 \pm 0,05 \log_{10}$ células g^{-1} solo (controle).



695

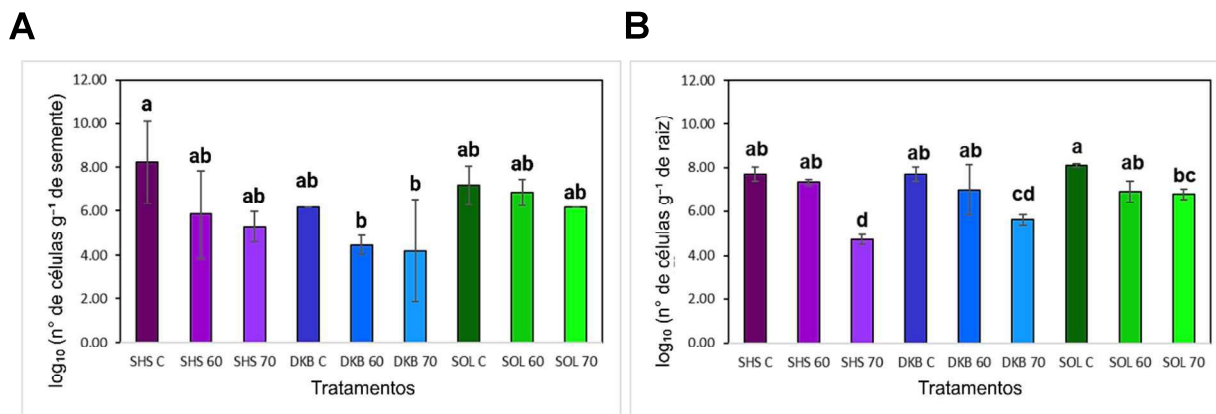
696 **Figura 4.** Contagem bacteriana por cálculo de UFC (Unidade Formadora de Colônia),
 697 expressa em número de células \log_{10} por grama de (A) sementes, (B) raízes e (C)
 698 solo rizosférico. A sigla n.d. indica ausência de detecção na diluição 10^{-1} . De acordo com o teste
 699 de Tukey, letras idênticas não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

700

701 A quantificação de bactérias diazotróficas foi realizada em meio semi-sólido
 702 livre de nitrogênio JNFb, utilizando o método do número mais provável (NMP) com
 703 base na tabela de McCrady (Döbereiner et al., 1995). Os tratamentos térmicos não
 704 afetaram de maneira significativa a quantidade de bactérias diazotróficas das

705 sementes das três cultivares. Diferente das raízes, que apresentaram redução
706 significativa em todas as cultivares no tratamento 70°C quando comparado ao
707 controle, com valores de $4,72 \pm 0,20 \log_{10}$ células para SHS 70, $5,63 \pm 0,24 \log_{10}$ células
708 para DKB 70 e $6,78 \pm 0,22 \log_{10}$ células para SOL 70.

709



710

711 **Figura 5.** Quantificação de bactérias diazotróficas pelo método do NMP (Número Mais
712 Provável) em sementes (A) e raízes (B). As barras acima de cada valor representam o erro
713 padrão. De acordo com o teste de Tukey, letras idênticas dentro das colunas não diferem
714 significativamente entre si ($p < 0,05$).

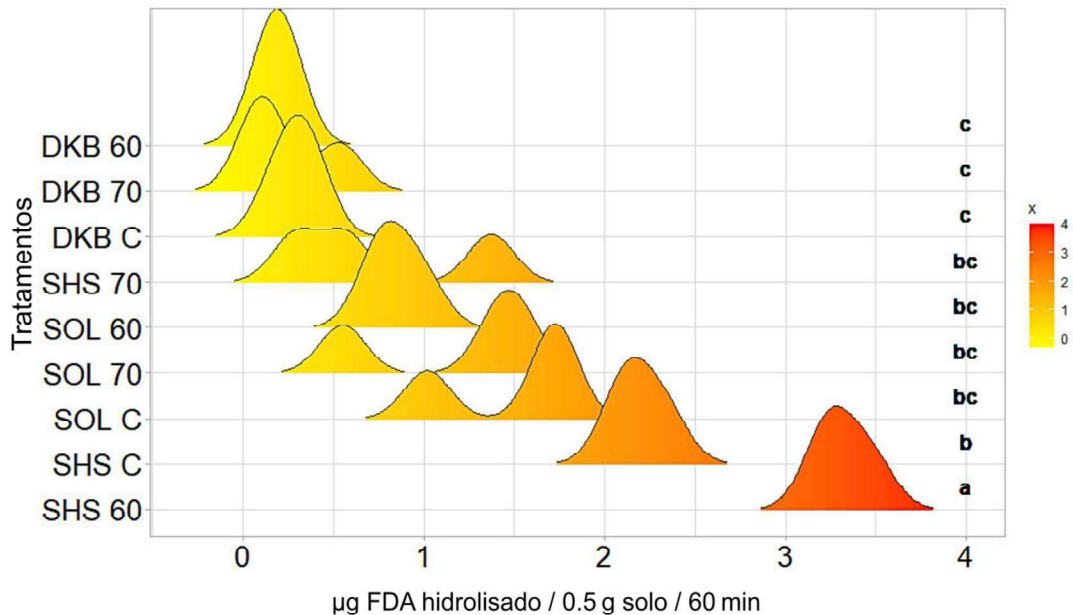
715

716 Atividade Enzimática Microbiana

717 A atividade enzimática microbiana no solo rizosférico de plântulas de milho,
718 avaliada por meio do ensaio de hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA), revelou
719 diferenças significativas entre os genótipos. A termoterapia não afetou a atividade
720 enzimática microbiana nos genótipos SOL e DKB, que apresentaram concentrações
721 de fluoresceína semelhantes entre os tratamentos. A cultivar SHS, tratamento a 60°C,
722 apresentou um aumento significativo na concentração de fluoresceína para cerca de
723 3,4 mg/mL, sugerindo uma intensificação da atividade enzimática microbiana sob esse
724 tratamento térmico moderado. No entanto, o tratamento a 70°C resultou em uma
725 acentuada redução, para aproximadamente 1,0 mg/mL, não diferindo estatisticamente
726 do tratamento controle.

727 O controle do genótipo SOL apresentou baixa concentração de fluoresceína
728 (1,2 mg/mL), assim como o tratamento a 60°C (1,1 mg/mL) e 70°C (1,2 mg/mL). A
729 cultivar DKB, tanto no controle quanto nos tratamentos de termoterapia, apresentou
730 concentrações consistentemente baixas de fluoresceína, em torno de 0,3 mg/mL,

731 indicando mínima atividade enzimática microbiana, diferindo estatisticamente dos
732 tratamentos SHS 60 e SHS C.



733

734 **Figura 6.** Ensaio de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA), com a atividade microbiana
735 correlacionada às concentrações de fluoresceína. Letras idênticas não diferem
736 significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

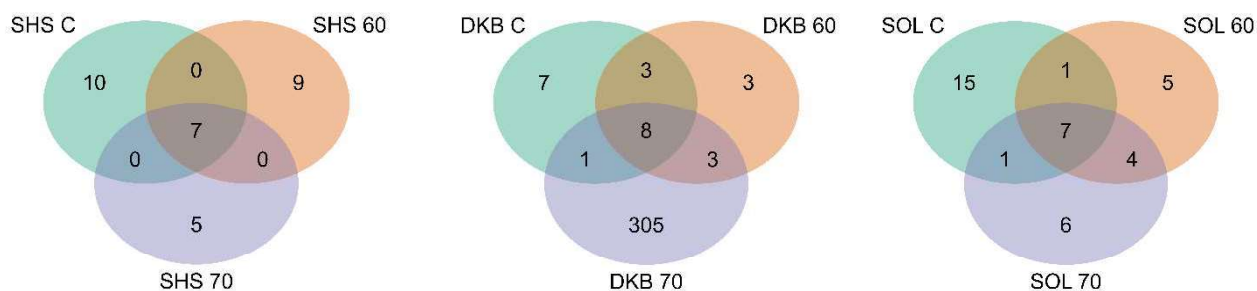
737

738 **Análise de Metabarcoding**

739 A análise de metabarcoding é uma técnica molecular poderosa utilizada para
740 estudar a composição e a diversidade de comunidades microbianas. Ao direcionar
741 regiões específicas do genoma microbiano, como o gene 16S rRNA para bactérias, o
742 metabarcoding permite identificar e quantificar diversos táxons microbianos presentes
743 em uma amostra. Os diagramas de Venn ilustram a distribuição das *Amplicon*
744 *Sequence Variants* (ASVs) entre os diferentes tratamentos e genótipos (Figura 7). As
745 áreas que não se sobrepõem indicam ASVs exclusivas de um tratamento, áreas
746 sobrepostas mostram ASVs compartilhadas entre dois tratamentos e a área central,
747 onde todos os círculos se sobrepõem, indica ASVs presentes em todos os
748 tratamentos.

749 O genótipo SHS apresentou 10, 9 e 5 ASVs exclusivas nos tratamentos
750 controle, 60°C e 70°C, respectivamente, sugerindo a diminuição no número de ASVs

751 únicas com o aumento da temperatura (Figura 7A). Não houve compartilhamento
 752 entre 2 tratamentos desta cultivar, porém 7 ASVs foram compartilhados entre os 3
 753 tratamentos, indicando um core microbiano não afetado pelo aumento de temperatura
 754 na termoterapia de sementes. O genótipo DKB apresentou 7 e 3 ASVs exclusivas nos
 755 tratamentos controle e 60°C respectivamente; entretanto, o tratamento 70°C revelou
 756 305 ASVs exclusivas, indicando um expressivo aumento na diversidade microbiana
 757 sob alta temperatura (Figura 7B). Houve um compartilhamento de 3 ASVs entre os
 758 tratamentos controle e 60°C e 60°C e 70°C, enquanto controle e 70°C compartilharam
 759 apenas 1 ASV. Os 3 tratamentos da cultivar DKB compartilharam um total de 8 ASVs.
 760 A cultivar SOL apresentou 15 ASVs exclusivas no controle, 5 no tratamento 60°C e 6
 761 em 70°C, indicando uma diminuição do número de ASVs exclusivas com os
 762 tratamentos térmicos (Figura 7C). Esta análise apresentou 1 ASV compartilhada entre
 763 os tratamentos SOL C e SOL 60, e SOL C e SOL 70. Os tratamentos SOL 60 e SOL
 764 70 apresentaram um compartilhamento de 4 ASVs, enquanto o compartilhamento
 765 entre todos os tratamentos foi de 7 ASVs. Na Figura S1 é possível observar que,
 766 quando comparamos todas as cultivares e tratamentos, apenas um ASV é
 767 compartilhado.



768

769 **Figura 7.** Diagramas de Venn mostrando a distribuição de *Amplicon Sequence Variants*
 770 (ASVs) entre os diferentes genótipos e tratamentos, com indicação do número de ASVs
 771 exclusivas e ASVs compartilhadas em SHS (A), DKB (B) e SOL (C).

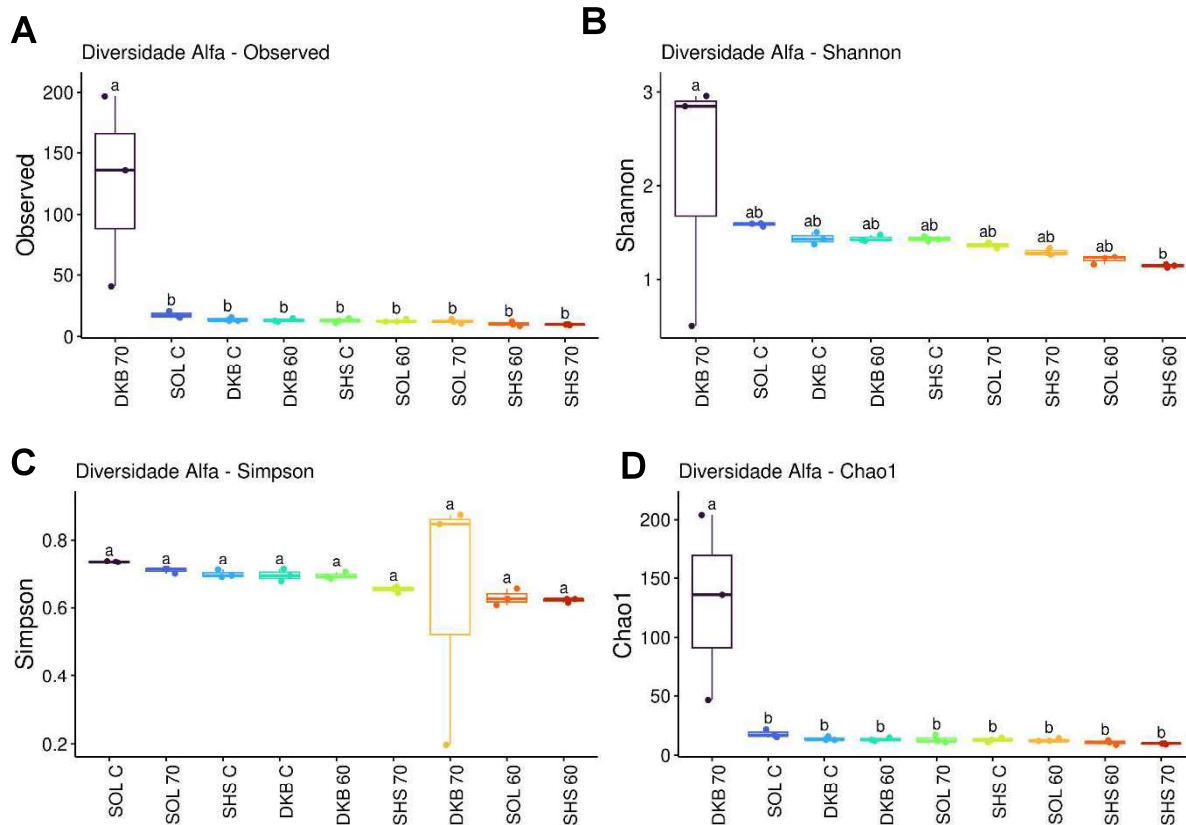
772

773 **Análise de Diversidade Alfa**

774 A diversidade alfa foi avaliada utilizando quatro índices: Observed, Shannon,
 775 Simpson e Chao1. O índice Observed (Figura 8A) representa o número total de ASVs
 776 detectadas nas amostras, levando em consideração apenas a riqueza. O índice de

777 Shannon (Figura 8B) representa a riqueza e abundância das amostras, sendo sensível
778 a espécies raras. O índice de Simpson (Figura 8C) mede a diversidade, considerando
779 a abundância relativa e a uniformidade das comunidades, com ênfase em ASVs
780 dominantes. Já o índice Chao1 (Figura 8D) está relacionado ao número total de ASVs
781 reais, corrigindo a riqueza observada para espécies raras não detectadas.

782 O índice Observed mostrou que o tratamento DKB 70°C apresentou a maior
783 riqueza bacteriana. Esse valor foi significativamente superior aos observados nos
784 demais tratamentos, que não diferiram entre si. No índice Shannon, o genótipo DKB
785 tratado a 70°C também se destacou, apresentando o maior valor de diversidade. Esse
786 tratamento diferiu significativamente do genótipo SHS tratado a 60°C. Os demais
787 tratamentos apresentaram valores intermediários e não diferiram estatisticamente
788 entre si. O índice Simpson não apresentou diferenças significativas entre os
789 tratamentos, indicando que mesmo havendo variações na riqueza e na diversidade
790 total observadas nos outros índices, a distribuição das abundâncias relativas dos
791 táxons permaneceu equilibrada entre as amostras, sem predomínio marcante de
792 grupos específicos. Por fim, o índice Chao1 confirmou o padrão observado no índice
793 Observed. O tratamento DKB 70°C apresentou os maiores valores estimados de
794 riqueza, diferindo significativamente dos demais tratamentos, que mantiveram valores
795 baixos e semelhantes entre si. Esse resultado reforça que o genótipo DKB, quando
796 tratado a 70°C apresentou um microbioma mais resiliente. De forma geral, os
797 resultados indicam que o genótipo DKB possui uma comunidade microbiana
798 associada às sementes mais resistentes ao calor, preservando maior riqueza e
799 diversidade sob estresse térmico.



800

801

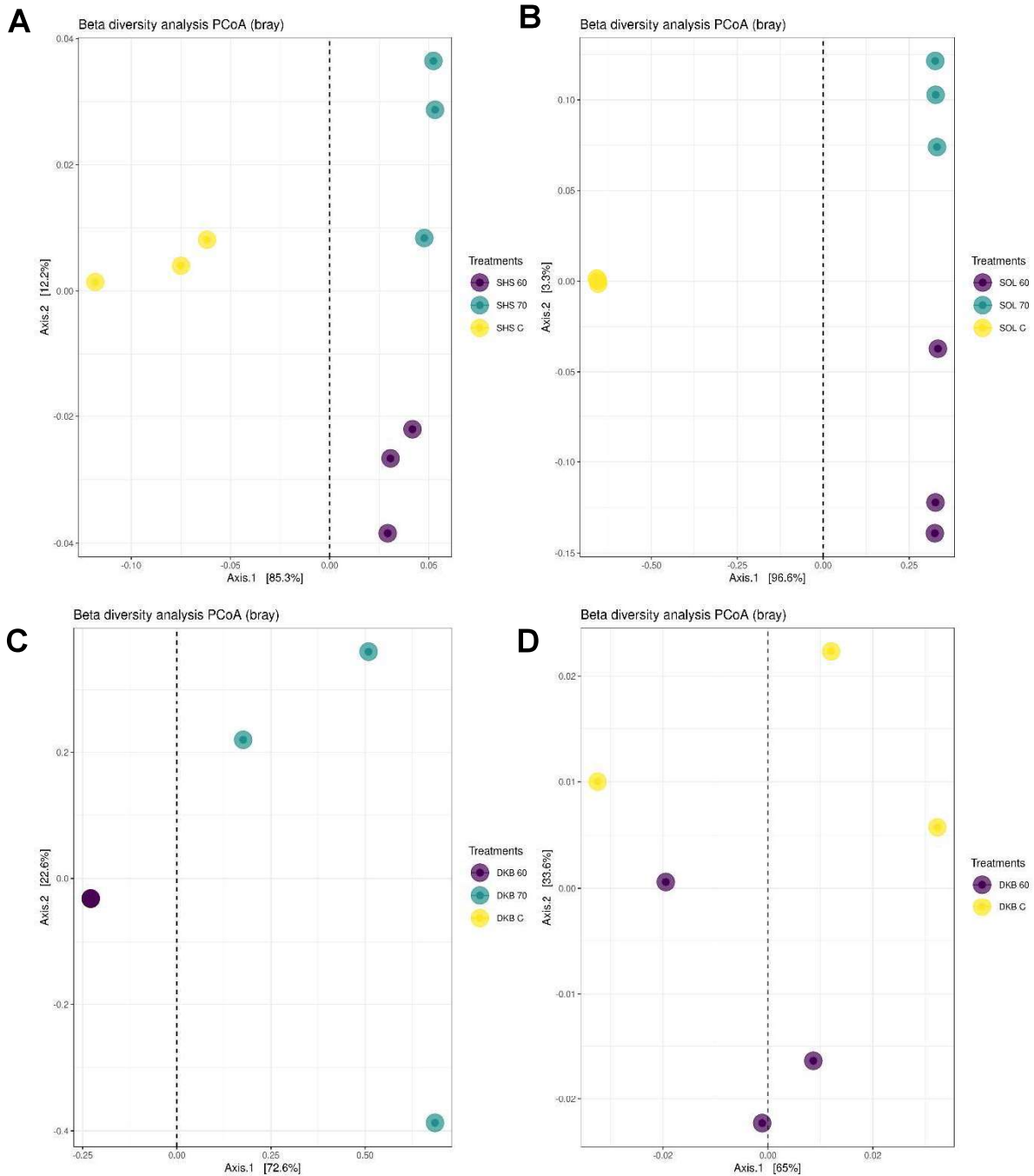
802 **Figura 8.** Métricas de diversidade alfa das comunidades bacterianas em sementes de milho
 803 de três genótipos (DKB, SHS e SOL) submetidos a diferentes tratamentos: controle, 60°C e
 804 70°C. As métricas apresentadas são: Observed (A), Shannon (B), Simpson (C) e Chao1 (D).
 805 Letras idênticas não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey
 806 ($p < 0,05$).

807

808 **Análise de Diversidade Beta**

809 A diversidade beta foi analisada para visualizar as alterações na composição
 810 da comunidade microbiana entre os três genótipos e tratamentos. A Análise de
 811 Coordenadas Principais (PCoA) foi empregada para ilustrar as diferenças
 812 composicionais e identificar respostas específicas de cada genótipo ao estresse
 813 térmico. O gráfico de PCoA do genótipo SHS (Figura 9A) mostrou uma separação
 814 clara das comunidades bacterianas em todos os tratamentos, indicando que as altas
 815 temperaturas alteram significativamente a composição do microbioma das sementes.
 816 O gráfico de PCoA do genótipo SOL (Figura 9B) revelou tendência semelhante, com
 817 todos os tratamentos separados entre si. Para o genótipo DKB (Figura 9C), observou-
 818 se um agrupamento distinto das amostras do tratamento a 70°C, separado do controle
 819 e do tratamento a 60°C, sugerindo que a comunidade bacteriana das sementes de

820 DKB foi fortemente afetada pela temperatura de 70°C. No gráfico com os três
 821 tratamentos da cultivar DKB, descrito anteriormente, observa-se uma sobreposição
 822 dos tratamentos controle e 60°C, porém essa sobreposição ocorreu devido à grande
 823 variação do tratamento 70°C. Para demonstrar isso, foi realizada uma análise de
 824 PCoA entre os tratamentos controle e 60°C, em que podemos observar que os
 825 tratamentos não se sobrepõem (Figura 9D).



826

827

828

829 **Figura 9.** Gráficos de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) representando a diversidade
830 beta das comunidades bacterianas em sementes de milho de três genótipos: SHS (A), SOL
831 (B), DKB (C) e DKB apenas tratamentos controle e 60°C (D). Os gráficos foram baseados em
832 matrizes de distância Bray–Curtis.

833

834 **Atribuições Taxonômicas Bacterianas**

835 As atribuições taxonômicas permitiram identificar a composição das
836 comunidades bacterianas associada às sementes. Os gráficos de barras apresentam
837 a abundância relativa das diferentes atribuições taxonômicas bacterianas nos três
838 genótipos de milho submetidos aos tratamentos controle (C), 60°C e 70°C. No nível
839 taxonômico de filo (Figura 10A), observou-se que a comunidade microbiana de DKB
840 Controle e DKB 60°C foi dominada pelo filo *Proteobacteria*. Houve uma redução
841 significativa de *Proteobacteria* acompanhada por um aumento de *Firmicutes* quando
842 as sementes foram submetidas ao tratamento de 70°C. Além disso, a 70°C, foram
843 detectados filios que não haviam sido observados nos tratamentos controle e 60°C,
844 como *Actinobacteriota*, *Chloroflexi*, *Acidobacteriota*, *Bacteroidota*, *Verrucomicrobiota*
845 e *Myxococcota*.

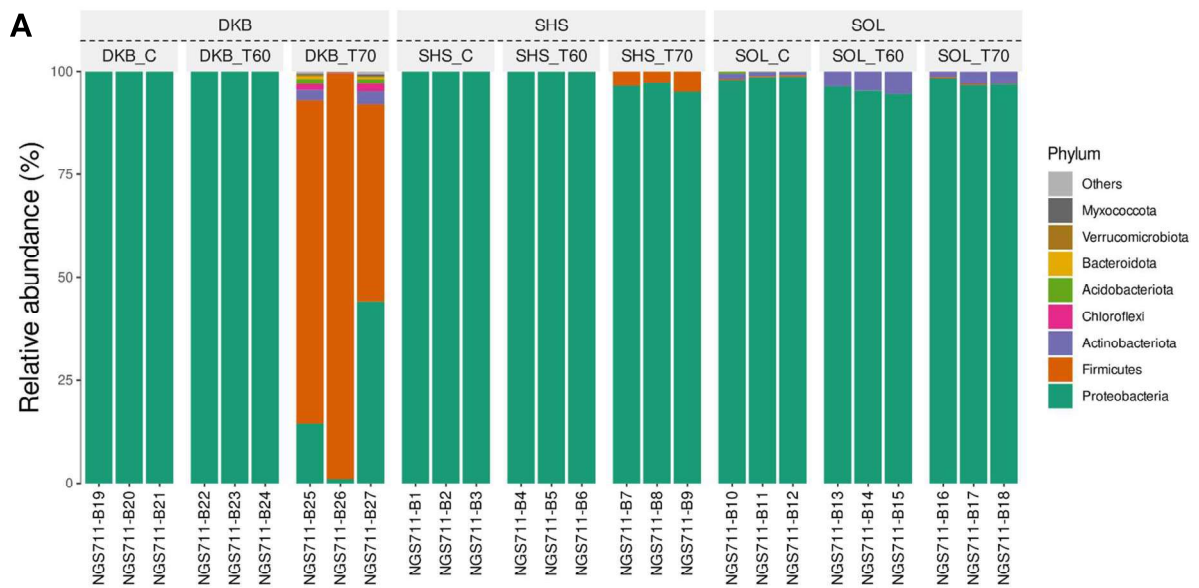
846 A cultivar SHS, nos tratamentos controle e 60°C, apresentou predominância do
847 filo *Proteobacteria*. Entretanto, sob 70°C, observou-se um aumento na presença de
848 *Firmicutes*. A cultivar SOL também apresentou predominância de *Proteobacteria* em
849 todos os tratamentos. No controle, foram observados os filios *Actinobacteriota*,
850 *Firmicutes* e *Acidobacteriota*. No tratamento a 60°C, verificou-se um aumento na
851 incidência de *Actinobacteriota*, enquanto os demais filios presentes no controle não
852 foram detectados. Já no tratamento a 70°C, observou-se a ocorrência dos filios
853 *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Verrucomicrobiota*.

854 No nível taxonômico de classe (Figura 10B), o cultivar DKB apresentou
855 predominância de *Gammaproteobacteria* nos tratamentos controle e 60°C, com
856 pequena ocorrência de *Alphaproteobacteria*. No entanto, no tratamento 70°C,
857 observou-se forte ocorrência de *Bacilli*, além da presença de *Alphaproteobacteria*,
858 *Actinobacteria*, *Acidobacteriae*, *Ktedonobacteria*, *Bacteroidia* e *Verrucomicrobiae*. O
859 genótipo SHS apresentou predominância de *Gammaproteobacteria* em todos os
860 tratamentos, com ocorrência de *Alphaproteobacteria* no controle. No tratamento a
861 70°C, houve redução de *Alphaproteobacteria* e ocorrência da classe *Bacilli*. O

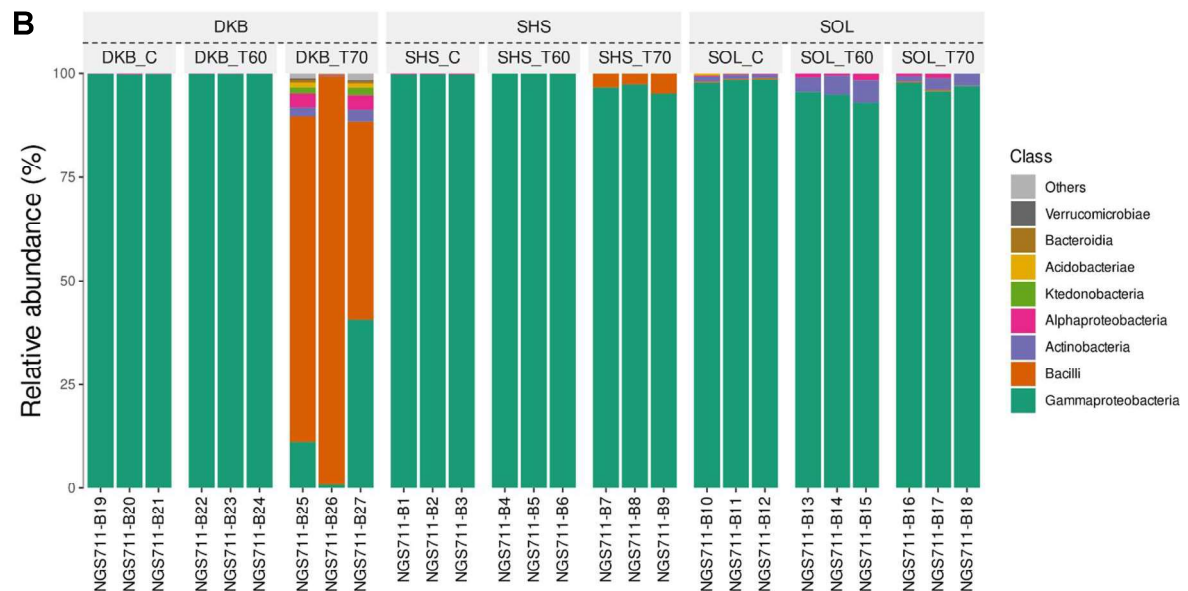
862 genótipo SOL também exibiu predominância de *Gammaproteobacteria* em todos os
863 tratamentos. No controle, foi identificada maior diversidade em comparação ao
864 controle dos outros genótipos, com ocorrência de *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*,
865 *Bacilli* e *Acidobacteriae*. No tratamento a 60°C, houve maior ocorrência de
866 *Actinobacteria* e *Alphaproteobacteria*, enquanto no tratamento a 70°C foram
867 identificadas *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* e *Bacilli*.

868 No nível taxonômico de ordem (Figura 11A), os tratamentos DKB Controle e
869 60°C apresentaram resultados semelhantes, com predominância de *Burkholderiales*
870 e *Xanthomonadales*, além da ocorrência de *Enterobacterales* e *Rhizobiales*. O
871 tratamento 70°C mostrou predominância marcante de *Bacillales*, seguido de
872 *Paenibacillales*, *Micrococcales*, *Rhizobiales*, *Enterobacterales* e *Ktedonobacterales*,
873 reduzindo significativamente a ocorrência das ordens predominantes nos tratamentos
874 controle e 60°C. Para o genótipo SHS, observou-se predominância de *Burkholderiales*
875 e *Xanthomonadales* em todos os tratamentos, com ocorrência de *Rhizobiales* e
876 *Enterobacterales* no controle. No tratamento a 70°C, foi registrada uma considerável
877 ocorrência de *Bacillales* e presença de *Paenibacillales*.

878 O cultivar SOL, de forma semelhante ao SHS, apresentou predominância de
879 *Burkholderiales* em todos os tratamentos. No controle, observou-se alta ocorrência de
880 *Xanthomonadales*, seguida por *Micrococcales*, *Rhizobiales* e *Enterobacterales*. No
881 tratamento a 60°C, houve redução de *Xanthomonadales* e aumento de *Micrococcales*,
882 além da presença de *Enterobacterales* e *Rhizobiales*. Já no tratamento a 70°C,
883 *Xanthomonadales* não foi mais detectado, sendo observadas as ordens
884 *Micrococcales*, *Enterobacterales* e *Rhizobiales*.



885



886

887 **Figura 10.** Abundância relativa das comunidades bacterianas no solo rizosférico de plântulas
 888 de milho cultivadas em condições axênicas, nos níveis taxonômicos de filo (A) e classe (B),
 889 para cada genótipo e tratamento.

890

891 No nível taxonômico de família, o cultivar DKB apresentou, nos tratamentos
 892 controle e 60°C, predominância da família *Burkholderiaceae*, seguida por
 893 *Rhodanobacteraceae* e menor ocorrência de *Enterobacteriaceae*. No tratamento DKB
 894 70°C, observou-se predominância das famílias *Bacillaceae* e *Paenibacillaceae*, com
 895 ocorrência adicional de *Microbacteriaceae*, *Planococcaceae*, *Enterobacteriaceae* e

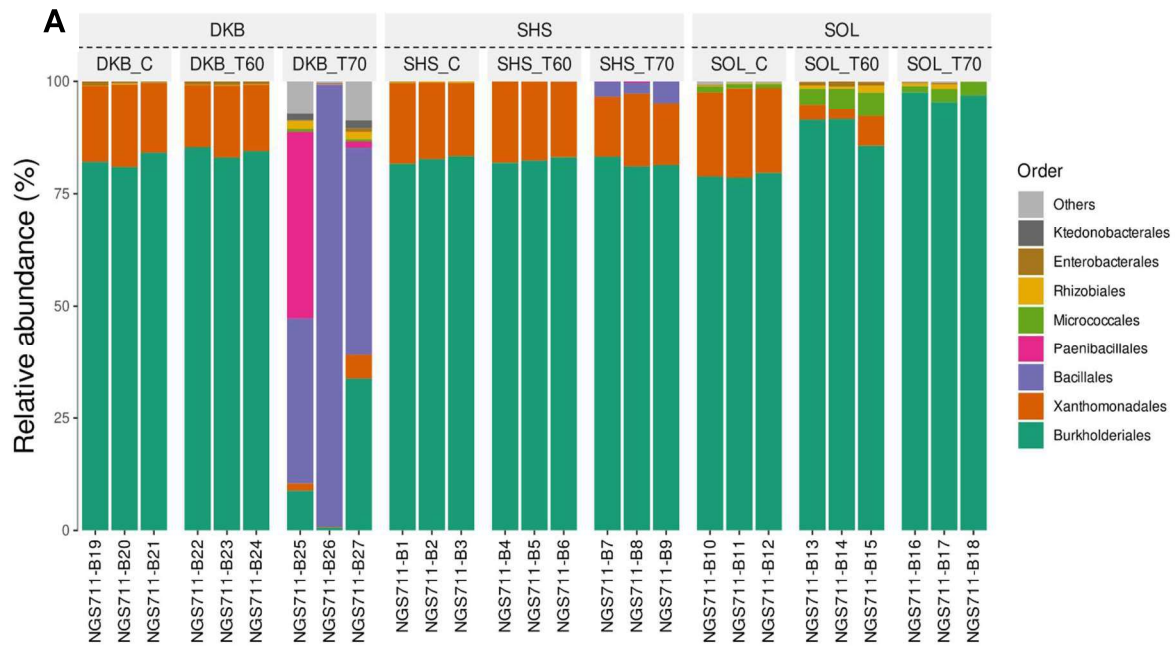
896 *Beijerinckiaceae*. Houve redução significativa das famílias *Burkholderiaceae* e
897 *Rhodanobacteraceae*. Para o cultivar SHS, todos os tratamentos apresentaram
898 predominância das famílias *Burkholderiaceae* e *Rhodanobacteraceae*, sendo que o
899 tratamento 70°C também mostrou a presença das famílias *Planococcaceae* e
900 *Paenibacillaceae*.

901 O cultivar SOL exibiu predominância de *Burkholderiaceae* em todos os
902 tratamentos. No controle, foram observadas as famílias *Rhodanobacteraceae* e
903 *Microbacteriaceae*. No tratamento 60°C, ocorreu redução de *Rhodanobacteraceae* e
904 aumento de *Microbacteriaceae*, além da presença de *Enterobacteriaceae* e
905 *Beijerinckiaceae*. No tratamento 70°C, observou-se redução das famílias
906 *Microbacteriaceae*, *Enterobacteriaceae* e *Beijerinckiaceae*, e a família
907 *Rhodanobacteraceae* não foi mais detectada, diferentemente dos tratamentos
908 anteriores.

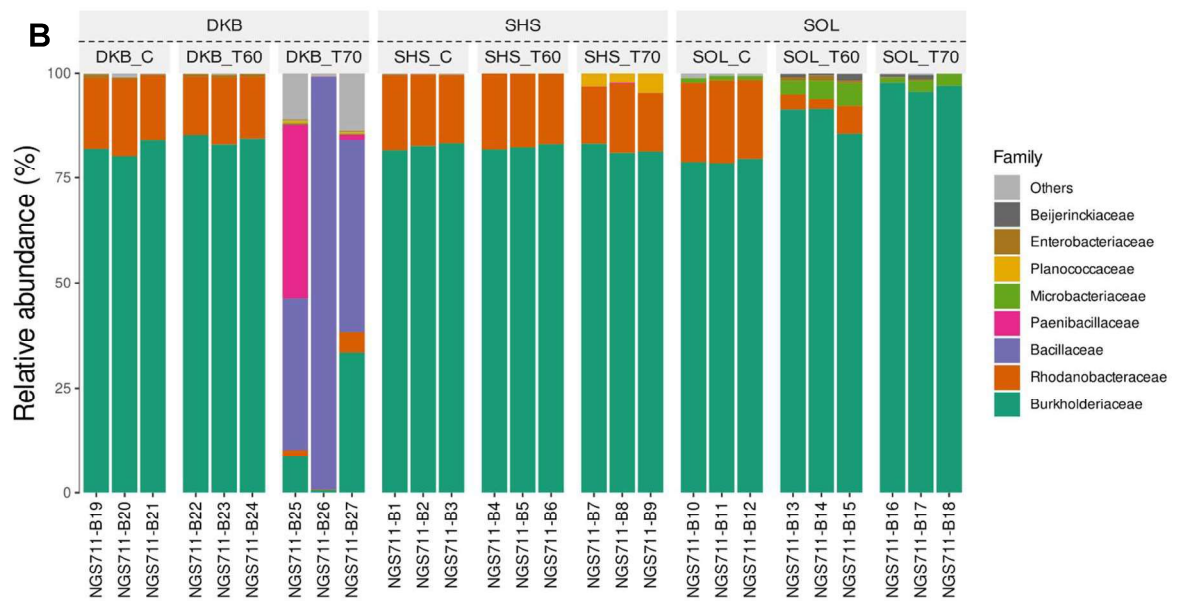
909 O heatmap (Figura 12) apresenta a abundância relativa dos gêneros
910 bacterianos. O gradiente de cores indica o percentual de abundância relativa, sendo
911 o azul-escuro representativo da menor abundância (0,01%) e o vermelho da maior
912 abundância (10%). Para o genótipo DKB, os gêneros dominantes no controle foram
913 *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*, seguidos por outros gêneros em menor
914 abundância, como *Dyella*, *Klebsiella* e *Massilia*. Observou-se redução na diversidade
915 bacteriana quando as sementes foram tratadas a 60°C, restando apenas alguns
916 gêneros com baixas abundâncias relativas, como *Hyphomicrobium* e *Serratia*, porém
917 com aumento de *Klebsiella*. No tratamento 70°C, houve aumento dos gêneros *Bacillus*
918 e *Paenibacillus*, além de um leve incremento em outros gêneros, como *Pseudolabrys*,
919 *Terracidiphilus*, *Rhizobium* e *Pseudomonas*. Os gêneros *Burkholderia-Caballeronia-*
920 *Paraburkholderia* e *Dyella* apresentaram redução expressiva.

921 Para o genótipo SHS, o gênero *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* foi
922 altamente abundante no controle, enquanto *Dyella*, *Klebsiella*, *Hyphomicrobium* e
923 *Serratia* ocorreram em menores quantidades. A diversidade diminuiu
924 significativamente no tratamento 60°C, com predominância de *Burkholderia-*
925 *Caballeronia-Paraburkholderia* e *Dyella*, e um leve aumento do gênero
926 *Alicyclobacillus*. No tratamento 70°C, *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* e

927 *Dyella* permaneceram predominantes, com aumento do gênero *Paenibacillus*. O
 928 genótipo SOL apresentou maior abundância relativa dos gêneros *Burkholderia*-
 929 *Caballeronia-Paraburkholderia* e *Curtobacterium* em todos os tratamentos. No
 930 tratamento 60°C, observou-se redução na diversidade e na abundância do gênero
 931 *Dyella*, que havia sido altamente abundante no controle. Os gêneros *Luteibacter*,
 932 *Methylobacterium-Methylorubrum*, *Hyphomicrobium* e *Rhodopila* apresentaram
 933 aumento a 60°C em relação ao controle. No tratamento 70°C, verificou-se redução
 934 dos gêneros *Luteibacter*, *Klebsiella* e *Methylobacterium-Methylorubrum*,
 935 acompanhada de aumento do gênero *Alicyclobacillus*.



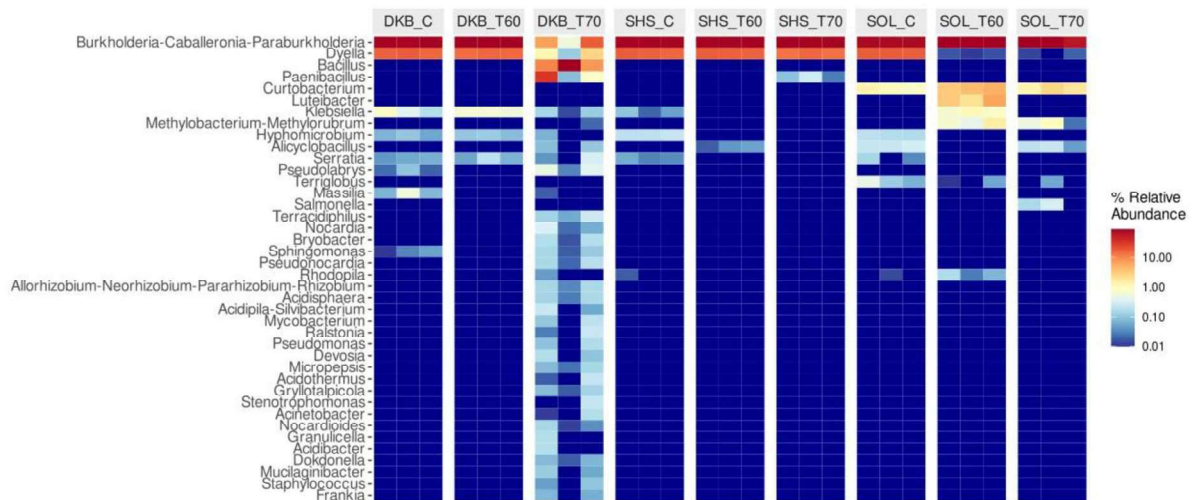
936



937

938 **Figura 11.** Abundância relativa das comunidades bacterianas no solo rizosférico de plântulas
 939 de milho cultivadas em condições axênicas, nos níveis taxonômicos de ordem (A) e família
 940 (B), para cada genótipo e tratamento.

941



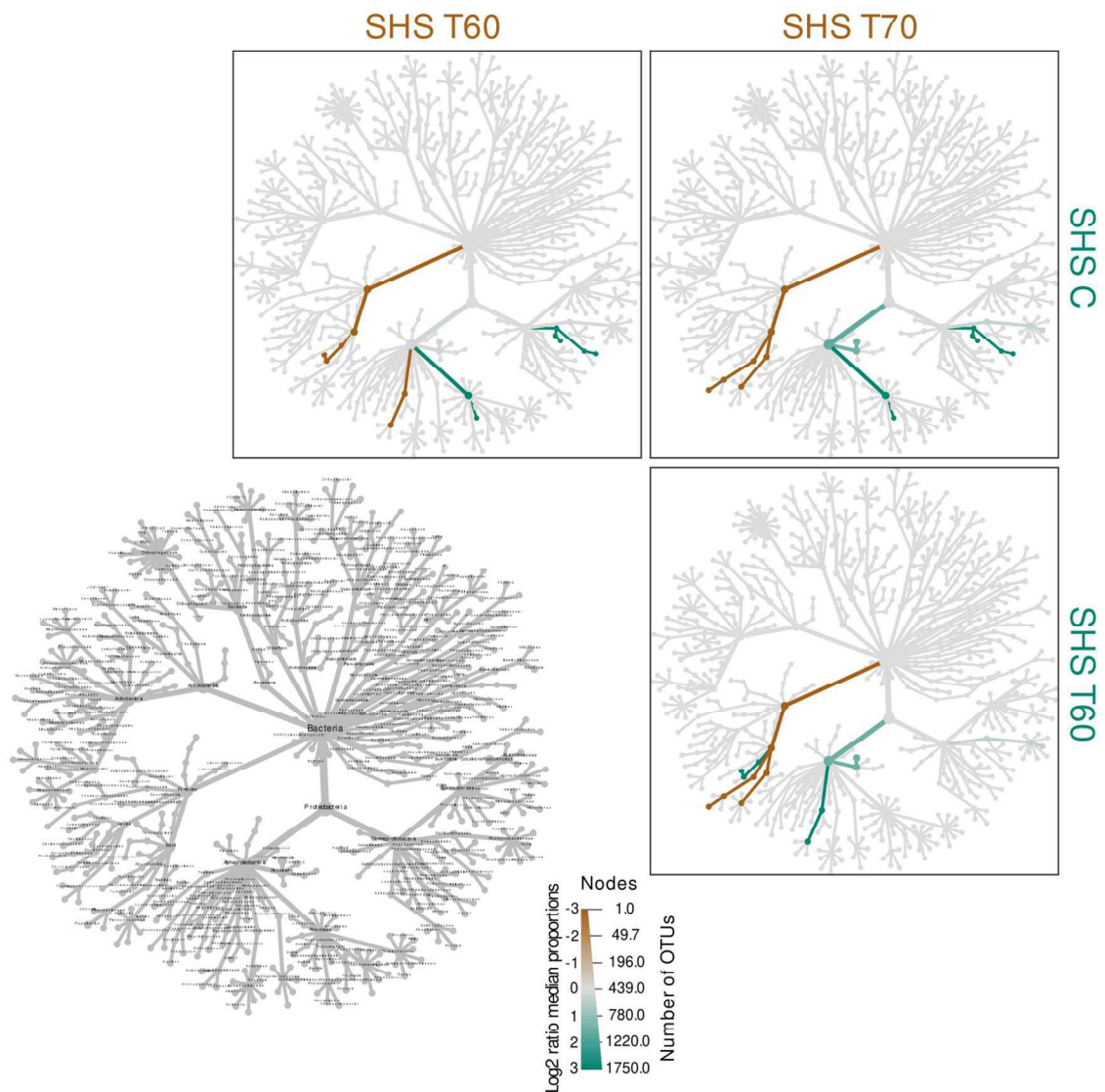
942

943 **Figura 12.** Abundância relativa dos gêneros bacterianos em sementes de milho. A intensidade
 944 das cores representa o percentual de abundância relativa de cada gênero, sendo que cores
 945 mais quentes indicam maior abundância (vermelho: alta abundância; azul: baixa abundância).

946

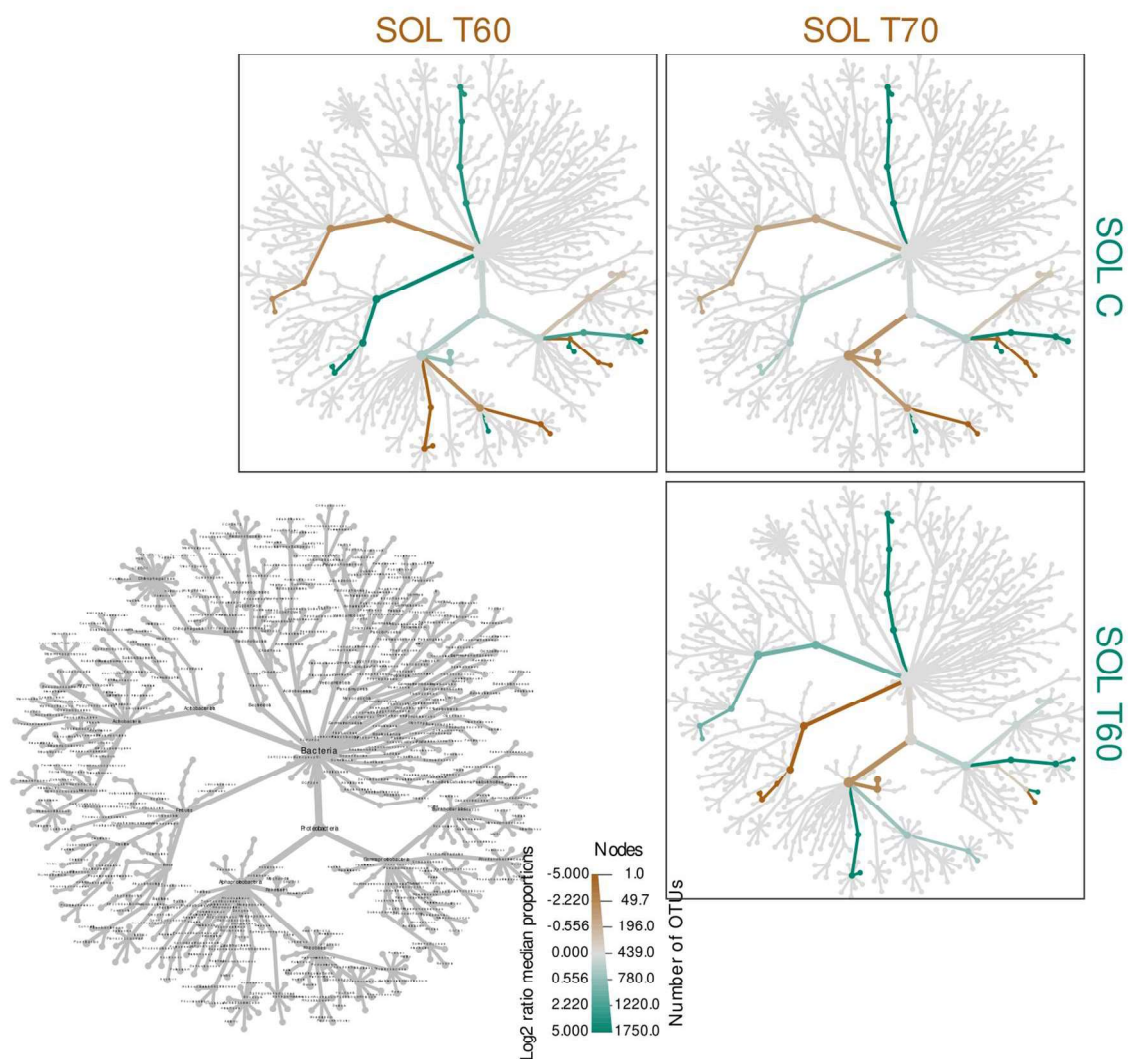
947 A análise de *heat tree* fornece uma visualização detalhada das mudanças na
 948 comunidade microbiana, auxiliando na compreensão de como a termoterapia afeta os
 949 filótipos bacterianos das sementes de milho. Os nós representam as ASVs, cujo
 950 tamanho e cor indicam sua abundância relativa e significância. As conexões ilustram

951 as relações entre diferentes ASVs. Todos os genótipos apresentaram alterações em
952 ASVs específicas, reforçando a mudança na composição da comunidade bacteriana
953 das sementes em cada genótipo e tratamento estudado (Figuras 13, 14 e 15). A
954 cultivar SOL exibiu a maior resiliência de sua comunidade bacteriana inicial à
955 termoterapia, enquanto o genótipo DKB demonstrou uma comunidade bacteriana
956 inicial com maior sensibilidade ao tratamento a 70°C, apresentando um aumento
957 expressivo na diversidade bacteriana. A reorganização substancial da comunidade
958 microbiana indica que temperaturas elevadas podem induzir mudanças abrangentes,
959 favorecendo táxons termofílicos. As comunidades bacterianas do genótipo SHS
960 apresentou sensibilidade moderada à termoterapia. As mudanças em diversidade
961 registrada entre todos os genótipos e tratamentos podem ser comparadas na Figura
962 S2.



963

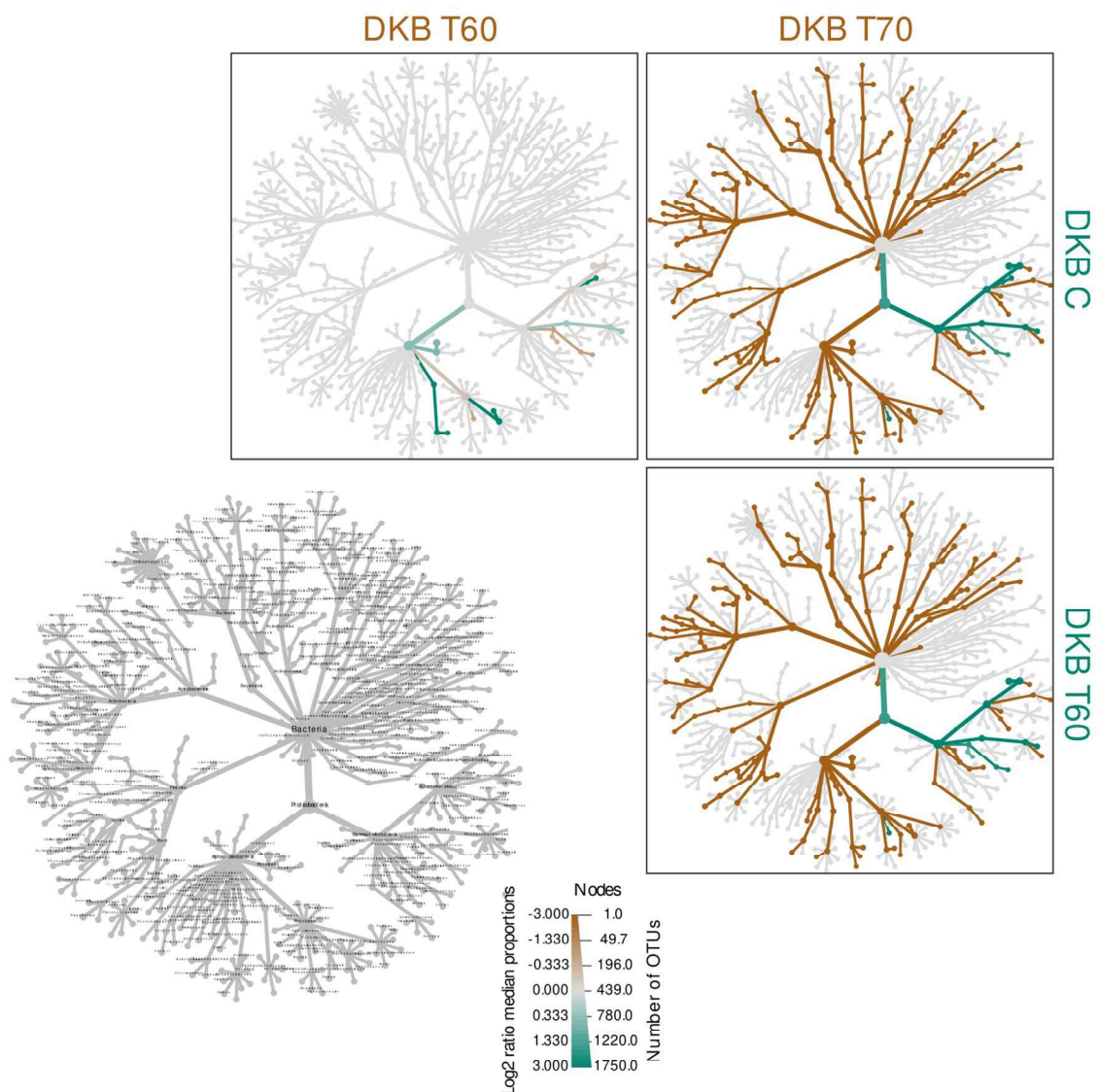
964 **Figura 13.** Matriz de *heat tree* do cultivar SHS sob tratamento controle e térmico, em
 965 comparações pareadas. Os ramos marrons ou azuis são estatisticamente significativos para
 966 o respectivo tratamento indicado pelas legendas marrons ou azuis.



967

968 **Figura 14.** Matriz de *heat tree* do cultivar SOL sob tratamento controle e térmico, em
 969 comparações pareadas. Os ramos marrons ou azuis são estatisticamente significativos para
 970 o respectivo tratamento indicado pelas legendas marrons ou azuis.

971



972

973 **Figura 15.** Matriz de *heat tree* do cultivar DKB sob tratamento controle e térmico, em
 974 comparações pareadas. Os ramos marrons ou azuis são estatisticamente significativos para
 975 o respectivo tratamento indicado pelas legendas marrons ou azuis.

976

977 A análise de predição funcional utilizando o PICRUST2 revelou alterações
 978 significativas no potencial metabólico das comunidades bacterianas da rizosfera dos
 979 três genótipos de milho avaliados após a termoterapia das sementes. O heatmap de
 980 abundância relativa das vias metabólicas (Figura 16A) evidenciou que o tratamento
 981 térmico induziu mudanças substanciais na composição funcional predita, com efeitos
 982 distintos entre os genótipos DKB (transgênico), SHS (híbrido comercial) e SOL
 983 (crioulo).

984 As vias de biossíntese de aminoácidos apresentaram respostas complexas à
985 termoterapia. A superpathway de biossíntese de L-aspartato e L-asparagina mostrou
986 redução na abundância relativa nos tratamentos a 60°C e 70°C para todos os
987 genótipos, sendo esse efeito mais pronunciado em DKB. Em contraste, as vias
988 relacionadas à biossíntese de aminoácidos aromáticos mantiveram-se relativamente
989 estáveis no genótipo crioulo SOL, enquanto apresentaram declínio nos genótipos
990 comerciais. As vias associadas à biossíntese de arginina e poliaminas — incluindo L-
991 arginina, L-citrulina e L-ornitina — exibiram maior resistência à termoterapia no
992 genótipo SOL, sugerindo que as bactérias associadas às sementes crioulas possuem
993 maior capacidade de manutenção dessas funções metabólicas sob estresse térmico.

994 O metabolismo energético apresentou alterações marcantes em resposta aos
995 tratamentos térmicos. A via de glicólise III mostrou redução progressiva com o
996 aumento da temperatura, sendo mais acentuada a 70°C em todos os genótipos. A
997 fermentação homoláctica apresentou o padrão inverso, com aumento relativo nas
998 amostras tratadas por termoterapia, especialmente nos genótipos DKB e SHS,
999 indicando possível seleção de bactérias fermentativas termotolerantes. As vias do
1000 ciclo de Calvin–Benson–Bassham apresentaram forte redução nos tratamentos
1001 térmicos, sugerindo perda de bactérias autotróficas sensíveis ao calor.

1002 As vias de degradação mostraram respostas heterogêneas à termoterapia. A
1003 degradação de D-arabinose apresentou enriquecimento nos tratamentos a 60°C,
1004 particularmente em SHS, mas declínio a 70°C. A degradação de creatinina manteve-
1005 se relativamente estável no genótipo SOL, enquanto diminuiu nos demais genótipos.
1006 As vias de degradação de compostos xenobióticos, incluindo 4-hidroxifenilacetato e
1007 compostos clorados, mostraram maior persistência no genótipo crioulo, sugerindo a
1008 presença de bactérias com capacidades catabólicas especializadas.

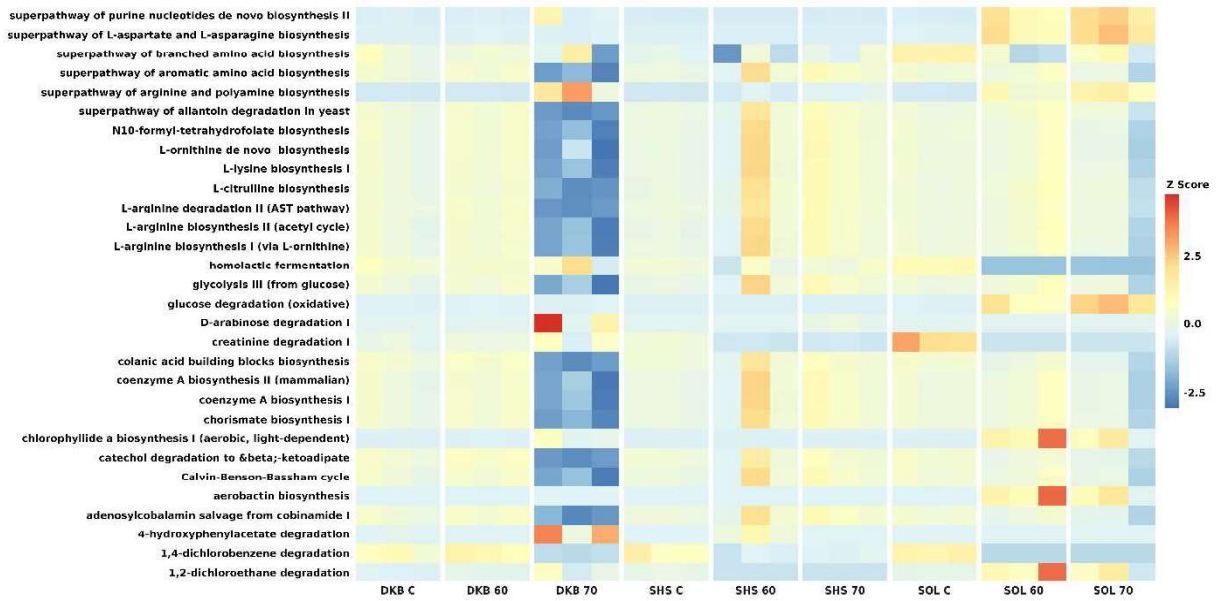
1009 A análise de componentes principais (PCA) (Figura 16B) revelou uma
1010 separação clara entre os tratamentos no espaço funcional, com o PC1 explicando 28%
1011 e o PC2 explicando 14,2% da variância total. O primeiro componente principal
1012 distinguiu nitidamente as amostras controle das amostras tratadas por termoterapia,
1013 indicando que a temperatura foi o principal fator determinante da estrutura funcional

1014 da comunidade. As amostras controle de todos os genótipos agruparam-se à direita
1015 do gráfico, apresentando maior homogeneidade e diversidade de vias biossintéticas.

1016 Os tratamentos a 60°C ocuparam posição intermediária no espaço funcional,
1017 caracterizando um estado de transição entre a estabilidade observada nos controles
1018 e a dissimilaridade acentuada a 70°C. O genótipo SOL apresentou menor dispersão
1019 a essa temperatura, sugerindo maior estabilidade funcional da comunidade bacteriana
1020 associada. Já os tratamentos a 70°C concentraram-se no lado esquerdo do PC1,
1021 apresentando maior dispersão dos pontos e ampla variação nas densidades
1022 marginais, o que indica que o calor intensificou a variabilidade funcional entre réplicas
1023 e reduziu a coesão funcional da comunidade.

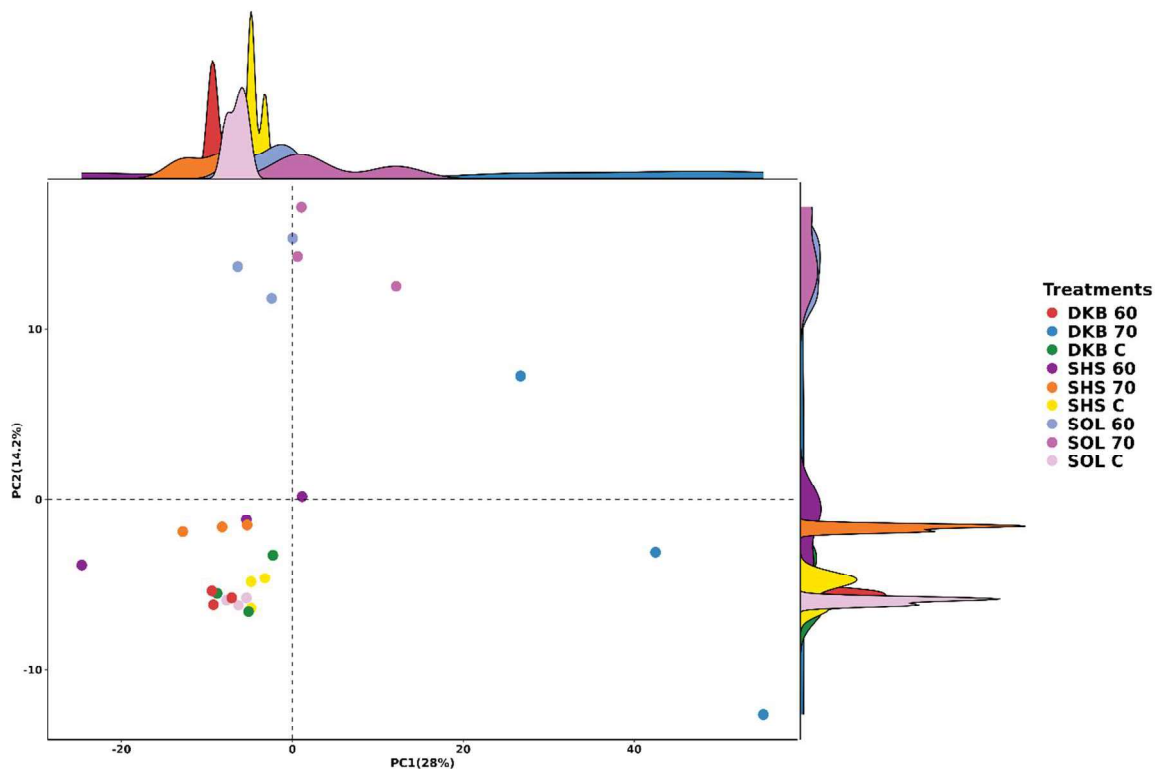
1024 O segundo componente principal (PC2) evidenciou diferenças relacionadas aos
1025 genótipos. O genótipo crioulo SOL distribuiu-se preferencialmente na porção superior
1026 do gráfico, o híbrido SHS em posição intermediária e o transgênico DKB na porção
1027 inferior, refletindo assinaturas funcionais distintas entre os microbiomas rizosféricos.
1028 Essa separação genotípica sugere que as características genéticas da planta
1029 hospedeira influenciam fortemente o potencial funcional microbiano, mesmo em
1030 condições axênicas.

1031 Em síntese, o PCA demonstra que a termoterapia promoveu reestruturação
1032 funcional dependente da temperatura e do genótipo, sendo o calor o principal agente
1033 modulador e o genótipo crioulo o mais resistente às alterações funcionais induzidas.



1034

1035 **Figura 16.** Heatmap das vias metabólicas previstas a partir da análise funcional pelo
 1036 PICRUSt2, mostrando o potencial metabólico das comunidades bacterianas dos genótipos
 1037 DKB, SHS e SOL de milho sob diferentes temperaturas de termoterapia das sementes
 1038 (controle, 60°C e 70°C). As cores representam valores de Z-score padronizados, indicando o
 1039 nível relativo de abundância funcional de cada via (azul: menor abundância; vermelho: maior
 1040 abundância).



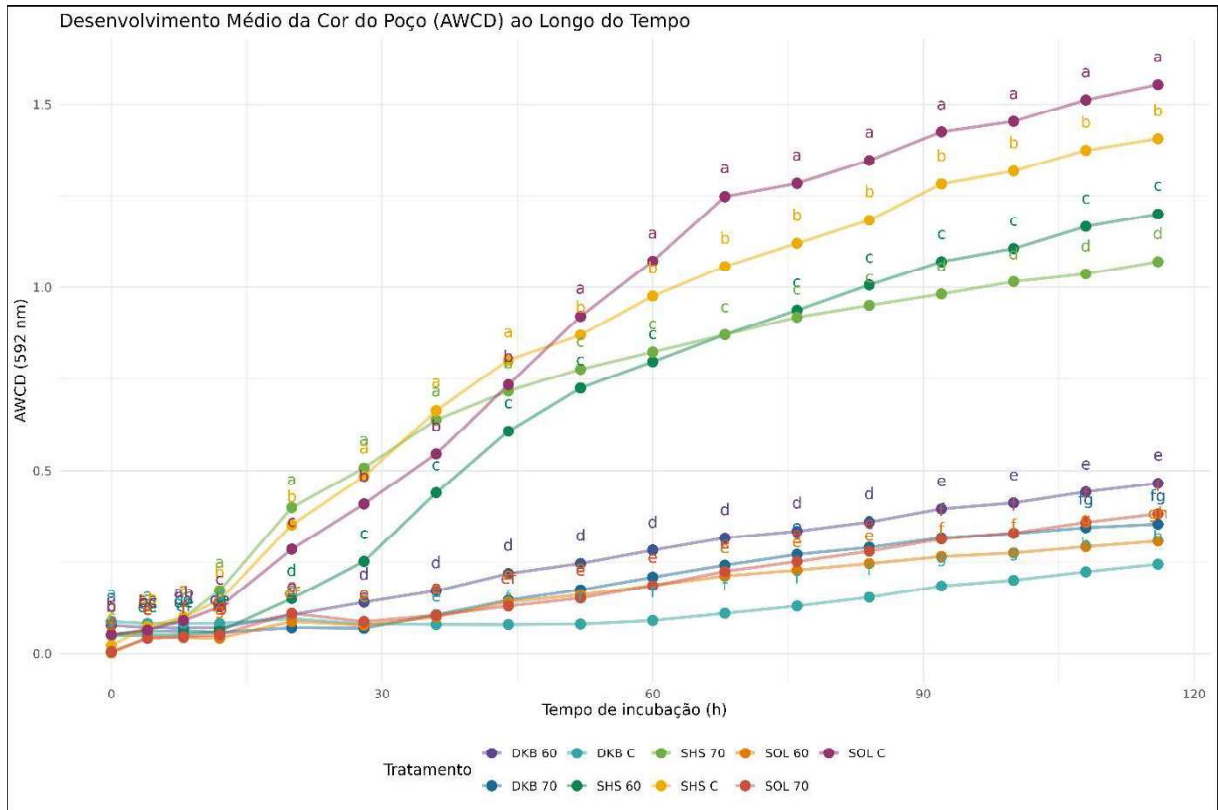
1041

1042 **Figura 17.** Análise de componentes principais (PCA) baseada na predição funcional das
 1043 comunidades bacterianas dos genótipos DKB, SHS e SOL de milho submetidos à
 1044 termoterapia das sementes (controle, 60°C e 70°C).

1045 **Perfil fisiológico e metabólico das comunidades microbianas**

1046 O desenvolvimento médio da cor do poço (AWCD) (Figura 18) reflete a
1047 atividade metabólica total das comunidades bacterianas na Ecoplaca Biolog.
1048 Observou-se um aumento progressivo do AWCD ao longo do período de incubação,
1049 indicando crescimento microbiano ativo e utilização gradual das fontes de carbono
1050 (Figura 1). Entre os genótipos avaliados, o milho crioulo (SOL) apresentou os maiores
1051 valores de AWCD em todos os tempos de incubação, seguido pelo híbrido comercial
1052 (SHS), enquanto o genótipo transgênico (DKB) exibiu os menores valores,
1053 principalmente após 70 horas de incubação.

1054 No tratamento controle, o genótipo SOL alcançou a maior taxa de aumento do
1055 AWCD, atingindo valores superiores a 1,5 em 116 horas, demonstrando alta
1056 capacidade metabólica e diversidade funcional. O tratamento a 60 °C manteve
1057 desempenho semelhante, enquanto a termoterapia a 70 °C reduziu moderadamente
1058 a atividade, embora o SOL 70 ainda tenha superado todos os demais genótipos. Já
1059 os genótipos SHS e DKB apresentaram reduções expressivas no AWCD com o
1060 aumento da temperatura, evidenciando sensibilidade funcional ao calor. Esses
1061 resultados indicam que a microbiota associada às sementes crioulas apresenta maior
1062 tolerância térmica e flexibilidade metabólica frente ao estresse.

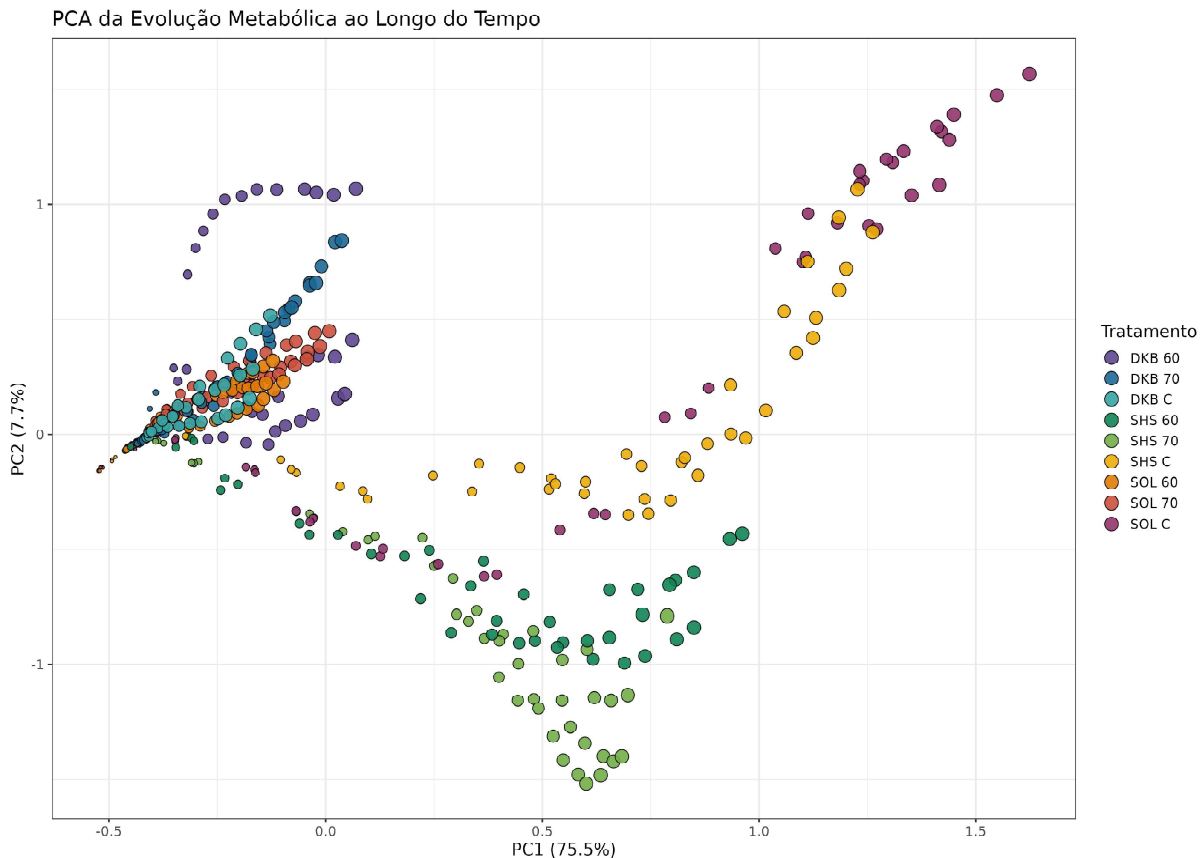


1063

1064 **Figura 18.** Desenvolvimento médio da cor do poço (AWCD) na Ecoplaca Biolog™ ao longo
 1065 do tempo de 116 horas para as comunidades bacterianas associadas às sementes de milho
 1066 de genótipos contrastantes sob diferentes tratamentos térmicos.

1067

1068 A análise de componentes principais (PCA) (Figura 19) revelou separação clara
 1069 entre os tratamentos térmicos e genótipos, explicando 75,5% (PC1) e 7,7% (PC2) da
 1070 variabilidade total dos dados. As amostras do genótipo SOL (controle e 60 °C)
 1071 agruparam-se na região superior direita, associadas à elevada atividade metabólica e
 1072 consumo diversificado de substratos. O híbrido SHS ocupou posição intermediária,
 1073 com leve dispersão entre os tratamentos. Por outro lado, as amostras do genótipo
 1074 DKB, especialmente sob 70 °C, concentraram-se na porção inferior esquerda do
 1075 gráfico, indicando perda de funções metabólicas e baixa diversidade de consumo.



1076

1077 **Figura 19.** Análise de Componentes Principais (PCA) da evolução metabólica das
 1078 comunidades bacterianas ao longo do tempo de incubação. Os dois primeiros componentes
 1079 principais (PC1 = 75,5% e PC2 = 7,7%) explicam a maior parte da variabilidade observada. A
 1080 distribuição dos pontos evidencia diferenças entre genótipos e efeitos do tratamento térmico.

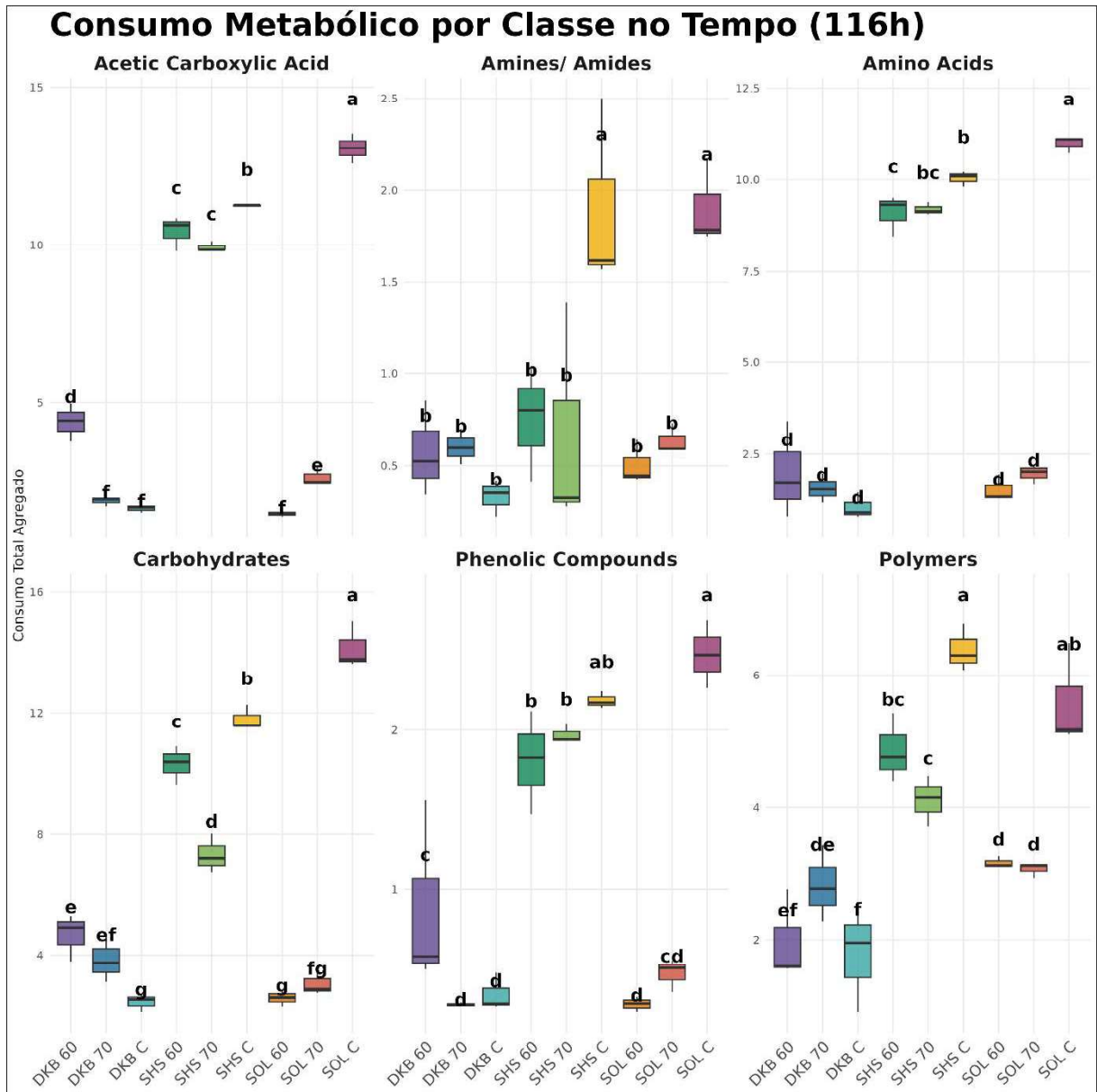
1081

1082 A análise do consumo total agregado por classe de substratos após 116 horas
 1083 (Figura 20) revelou diferenças significativas entre genótipos e tratamentos térmicos.
 1084 As comunidades associadas ao genótipo SOL demonstraram maior capacidade de
 1085 degradação e assimilação de carboidratos, ácidos carboxílicos e aminos/amidas, tanto
 1086 no controle quanto sob termoterapia. O tratamento SOL 60 apresentou consumo
 1087 expressivo de polímeros e compostos fenólicos, sugerindo manutenção da
 1088 versatilidade metabólica mesmo sob aquecimento moderado.

1089 O genótipo DKB apresentou os menores valores em quase todas as classes,
 1090 destacando-se pela baixa oxidação de carboidratos e compostos fenólicos,
 1091 principalmente a 70 °C. O híbrido SHS exibiu perfil intermediário, com redução gradual
 1092 do consumo à medida que a temperatura aumentou. Os dados indicam que o calor
 1093 intenso restringe a capacidade catabólica microbiana, afetando preferencialmente

1094 rotas relacionadas ao metabolismo de carbono e compostos aromáticos. Esse efeito
 1095 pode ser atribuído à seleção de grupos microbianos com metabolismo mais restrito,
 1096 capazes de sobreviver, mas com desempenho funcional limitado.

1097



1098

1099 **Figura 20.** Consumo total de substratos separado por classes funcionais após 116 horas de
 1100 incubação na Ecoplaca Biolog™. Letras iguais não apresentam diferença significativa entre si
 1101 pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

1102

1103 O perfil de consumo das 31 fontes de carbono testadas na Ecoplaca Biolog™
 1104 após 116 horas de incubação revelou diferenças significativas entre os genótipos e os

1105 tratamentos térmicos, refletindo o impacto da termoterapia sobre a amplitude
1106 metabólica das comunidades bacterianas associadas às sementes (Figura 21). O
1107 padrão de cores do heatmap, variando de tons claros (baixo consumo) a tons intensos
1108 de vermelho (alto consumo), evidenciou a diferença na utilização dos substratos entre
1109 as amostras.

1110 Nos tratamentos controle, os genótipos crioulos (SOL) apresentaram os
1111 maiores níveis de oxidação para a maioria dos substratos, especialmente para α -
1112 cyclodextrina, α -D-lactose, D-galacturônico, glucose-1-phosphate, putrescina e L-
1113 arginina. Esses compostos estão associados a vias metabólicas de hidrólise de
1114 polímeros complexos, metabolismo energético e ciclos de nitrogênio, indicando alta
1115 diversidade funcional e presença de microrganismos com ampla capacidade
1116 enzimática. Além disso, o consumo expressivo de D-glucosamina e D-mannitol sugere
1117 atividade de bactérias capazes de metabolizar açúcares derivados de
1118 exopolissacarídeos e componentes estruturais da parede celular vegetal, o que pode
1119 refletir uma adaptação ecológica ao ambiente da rizosfera.

1120 No tratamento SOL 60, a intensidade de consumo manteve-se elevada para a
1121 maioria dos substratos, com destaque para compostos como beta-methyl-D-
1122 glucoside, D-galactônico acid γ -lactone, pyruvic acid methyl ester e Tween 40,
1123 indicando resiliência metabólica ao aquecimento moderado. Esse perfil sugere que a
1124 termoterapia a 60 °C não comprometeu significativamente a funcionalidade da
1125 comunidade microbiana associada às sementes crioulas, possivelmente por
1126 selecionar populações termotolerantes com metabolismo ativo.

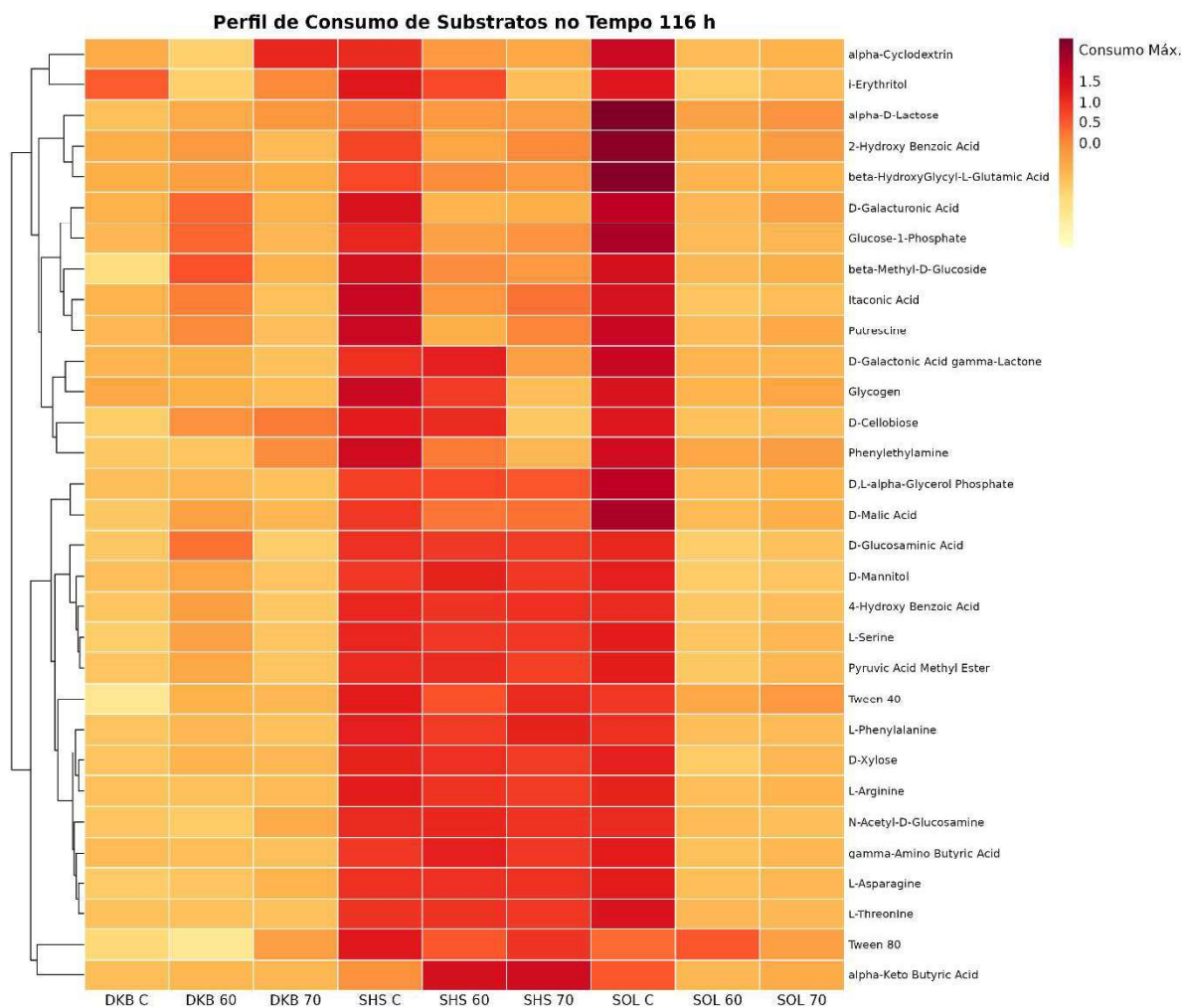
1127 Em contrapartida, o tratamento SOL 70 apresentou discreta redução na
1128 intensidade geral de consumo, porém ainda manteve elevada oxidação de substratos
1129 energéticos e de compostos do tipo carboxílico e fenólico, como D-málico e 4-
1130 hidroxibenzóico, o que sugere a persistência de microrganismos catabolicamente
1131 versáteis capazes de sustentar a atividade metabólica mesmo sob estresse térmico
1132 elevado.

1133 Para o genótipo SHS, o padrão de consumo foi intermediário, com maior
1134 atividade nos tratamentos controle e 60 °C, particularmente em substratos como D-
1135 galacturônico, D-glucosamina e glicogênio. No entanto, observou-se redução

1136 acentuada a 70 °C, refletindo sensibilidade da comunidade microbiana à alta
1137 temperatura e possível perda de diversidade funcional. Esse declínio é coerente com
1138 a diminuição do AWCD observada nas análises anteriores, reforçando a influência
1139 negativa do calor sobre a capacidade catabólica dessas comunidades.

1140 O genótipo DKB exibiu o padrão mais restrito de consumo entre todos os
1141 genótipos. No tratamento controle, poucas vias mostraram oxidação significativa, com
1142 destaque para L-asparagina e L-serina, enquanto os substratos mais complexos
1143 permaneceram pouco utilizados. A 60 °C, houve leve estímulo no consumo de alguns
1144 açúcares simples, mas a 70 °C observou-se uma drástica redução na intensidade
1145 global, com coloração predominantemente amarelada no mapa, indicando baixa
1146 atividade metabólica e perda da diversidade funcional. Esse comportamento sugere
1147 que a termoterapia intensa causou forte seleção microbiana, favorecendo grupos com
1148 metabolismo restrito ou reduzida capacidade de crescimento sob estresse.

1149 De forma geral, o heatmap evidencia que as comunidades bacterianas
1150 associadas às sementes crioulas (SOL) apresentaram maior amplitude e estabilidade
1151 funcional frente à termoterapia, enquanto as associadas aos genótipos comerciais
1152 (SHS e, principalmente, DKB) demonstraram redução expressiva na capacidade de
1153 consumo de substratos com o aumento da temperatura. Esse resultado reforça a
1154 hipótese de que os microbiomas associados a sementes de origem tradicional
1155 mantêm um repertório funcional mais diverso e resiliente, capaz de sustentar a
1156 atividade metabólica mesmo sob condições adversas.



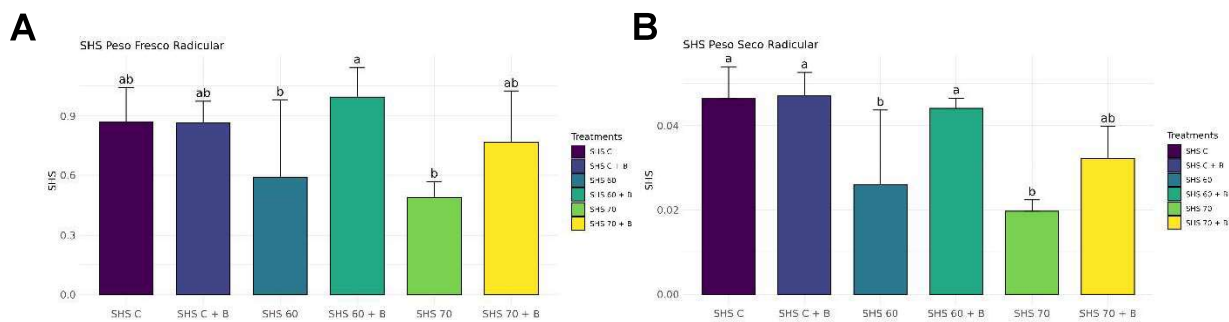
1157

1158 **Figura 21.** Perfil de consumo de substratos específicos pelas comunidades bacterianas
 1159 associadas às sementes de milho após 116 horas de incubação.

1160

1161 **Ensaio de inoculação de comunidades em casa de vegetação**

1162 Foram avaliados os parâmetros biométricos: comprimento da parte aérea,
 1163 comprimento radicular, peso fresco da parte aérea e radicular e peso seco da parte
 1164 aérea e radicular, calculados por planta de acordo com o número de plantas
 1165 germinadas (g/planta). Apenas o genótipo SHS tratamento 60°C apresentou diferença
 1166 estatística significativa, quando inoculado com sua respectiva comunidade microbiana
 1167 proveniente da Ecoplaca, com incremento do peso fresco de 67,8% (Figura 22A),
 1168 enquanto o peso seco radicular apresentou um incremento de 69,2% (Figura 22B). Os
 1169 outros tratamentos e genótipos não apresentaram diferença estatística significativa
 1170 quando inoculados.



1171

1172 **Figura 22.** Parâmetros biométricos de plantas crescidas em casa de vegetação, inoculadas
 1173 com suas respectivas comunidades crescidas no ensaio de Ecoplaca Biolog™. Peso Fresco
 1174 Radicular de SHS (A) e Peso Seco Radicular de SHS (B). Letras iguais não apresentam
 1175 diferença significativa entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

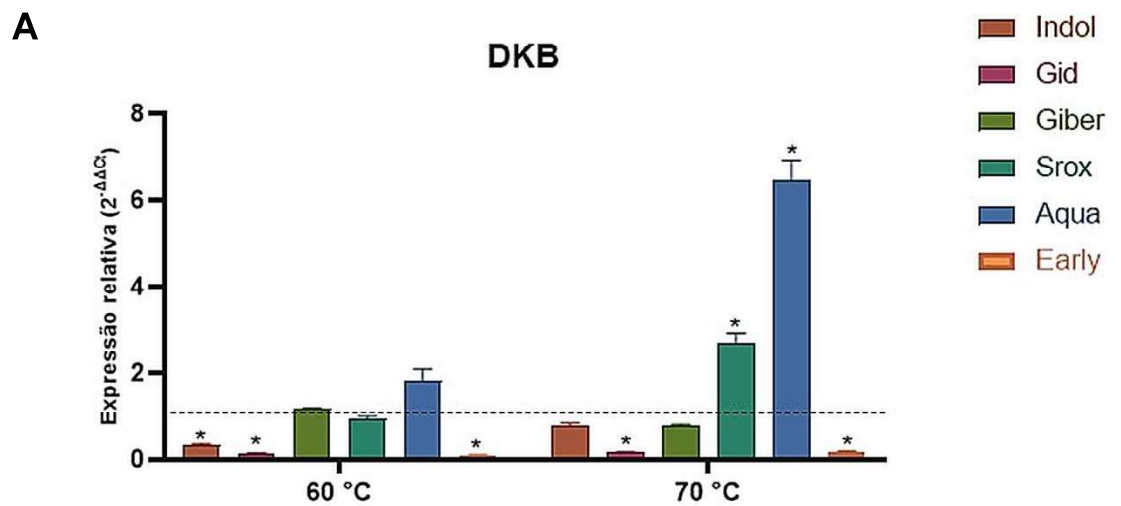
1176

1177 PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR)

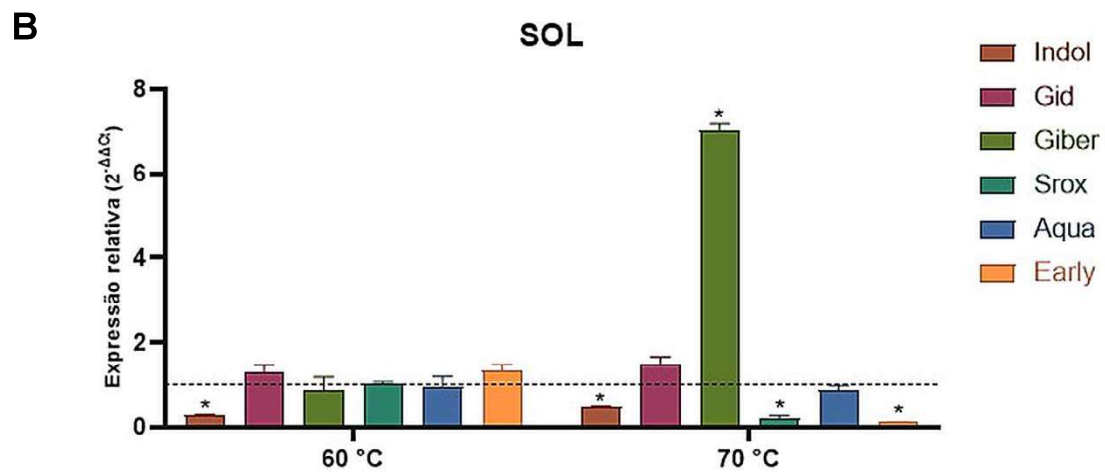
1178 Os resultados de expressão gênica das raízes das plântulas dos diferentes genótipos,
 1179 tratadas ou não por termoterapia mostrou que no genótipo DKB (Figura 23A), a 60 °C observa-
 1180 se expressão próxima ao basal para a maioria dos marcadores, com discreta indução de
 1181 aquaporina (Aqua) e giberelina/biossíntese GA (Giber). Já no tratamento de 70 °C ocorre um
 1182 padrão mais dirigido: Aqua tem forte indução (pico ~6–7×), Srox aumenta de forma moderada
 1183 (~3×), enquanto Giber, Indol/auxina, Gid e Early ficam próximas ao basal ou levemente
 1184 reprimidas. Após a termoterapia das sementes, as plantas do genótipo DKB privilegia o ajuste
 1185 hidráulico (aquaporinas) e defesa/redox (SROX), com pouca ativação de vias hormonais de
 1186 crescimento.

1187 No genótipo SOL (Figura 23B), tratado a 60 °C, todos os marcadores ficam próximos
 1188 a 1–1,5×, sugerindo estabilidade. No tratamento a 70 °C aparece uma resposta pontual muito
 1189 intensa de Giber (pico ~7–8×), acompanhada por leve aumento de Gid. Em contrapartida,
 1190 Aqua e Srox são reduzidos para valores abaixo do basal. Indol e Early permanecem baixos.
 1191 Esse perfil indica que, após o tratamento de termoterapia das sementes de SOL, as plântulas
 1192 desse genótipo usam sobretudo a sinalização de giberelinas e mantém reprimidos ajustes
 1193 hidráulicos/ROS.

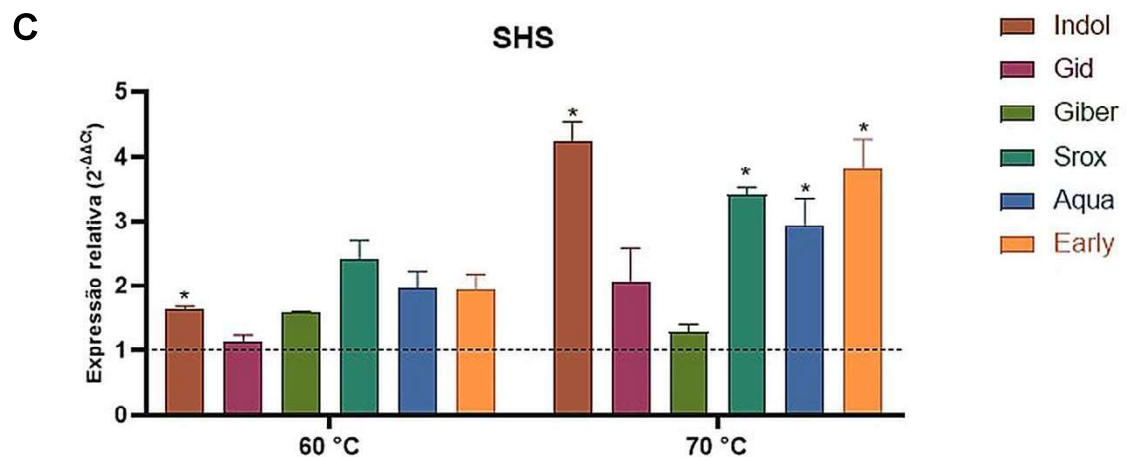
1194 As plântulas do genótipo SHS apresentaram aumentos coordenados em Srox, Aqua e
 1195 Giber (~1,5–2,5×) no tratamento a 60 °C (Figura 23C). Já no tratamento a 70 °C, vários
 1196 marcadores sobem simultaneamente: Indol (~4×), Early (~3×), Srox (~3×) e Aqua (~2–3×),
 1197 com Gid e Giber em níveis moderados. O perfil sugere uma estratégia multieixo (auxina,
 1198 aquaporinas, redox e genes de resposta precoce), compatível com plasticidade, porém
 1199 energeticamente custosa.



1200



1201



1202

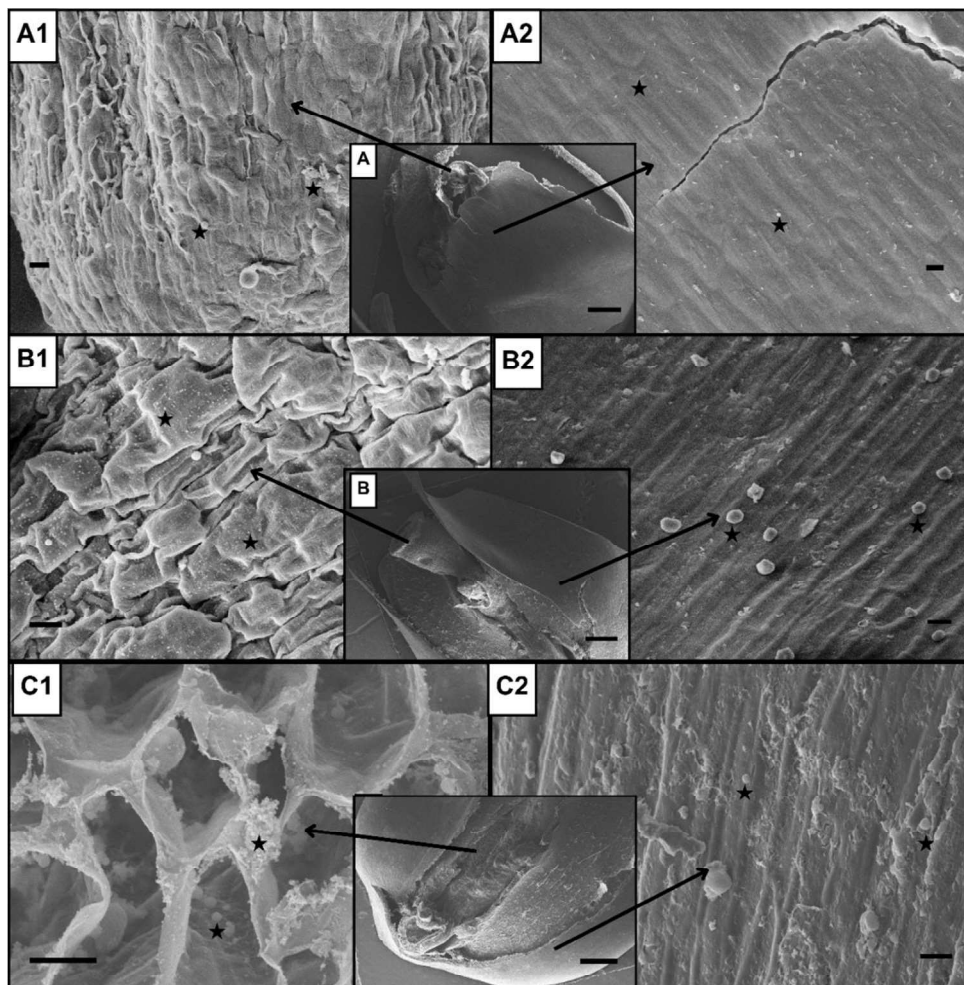
1203 **Figura 24.** Expressão relativa de genes associados à resposta ao tratamento de altas
 1204 temperaturas das sementes em plântulas de milho após 7 dias de germinação, sendo DKB
 1205 (A), SOL (B), SHS (C).

1206

1207

1208 **Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das sementes**

1209 Utilizando imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), é possível
1210 observar o padrão de colonização bacteriana das sementes pré-germinadas por 48
1211 horas, tanto na região de emergência da radícula quanto no pericarpo da semente
1212 (Figuras 18, 19 e 20). O cultivar SHS controle apresentou grande número de células
1213 bacterianas fusiformes ao longo do pericarpo, além da presença de cocos no
1214 pericarpo e na radícula (Figura 18). No tratamento a 60°C, observa-se a presença de
1215 bactérias em forma de bastonete, formando aglomerados bacterianos e cocos no
1216 pericarpo e na radícula, com formação de biofilme bacteriano. No tratamento a 70°C,
1217 a formação de biofilme é ainda mais intensa, e também são observadas células
1218 bacterianas em forma de cocos, embora em menor quantidade em comparação aos
1219 tratamentos anteriores.

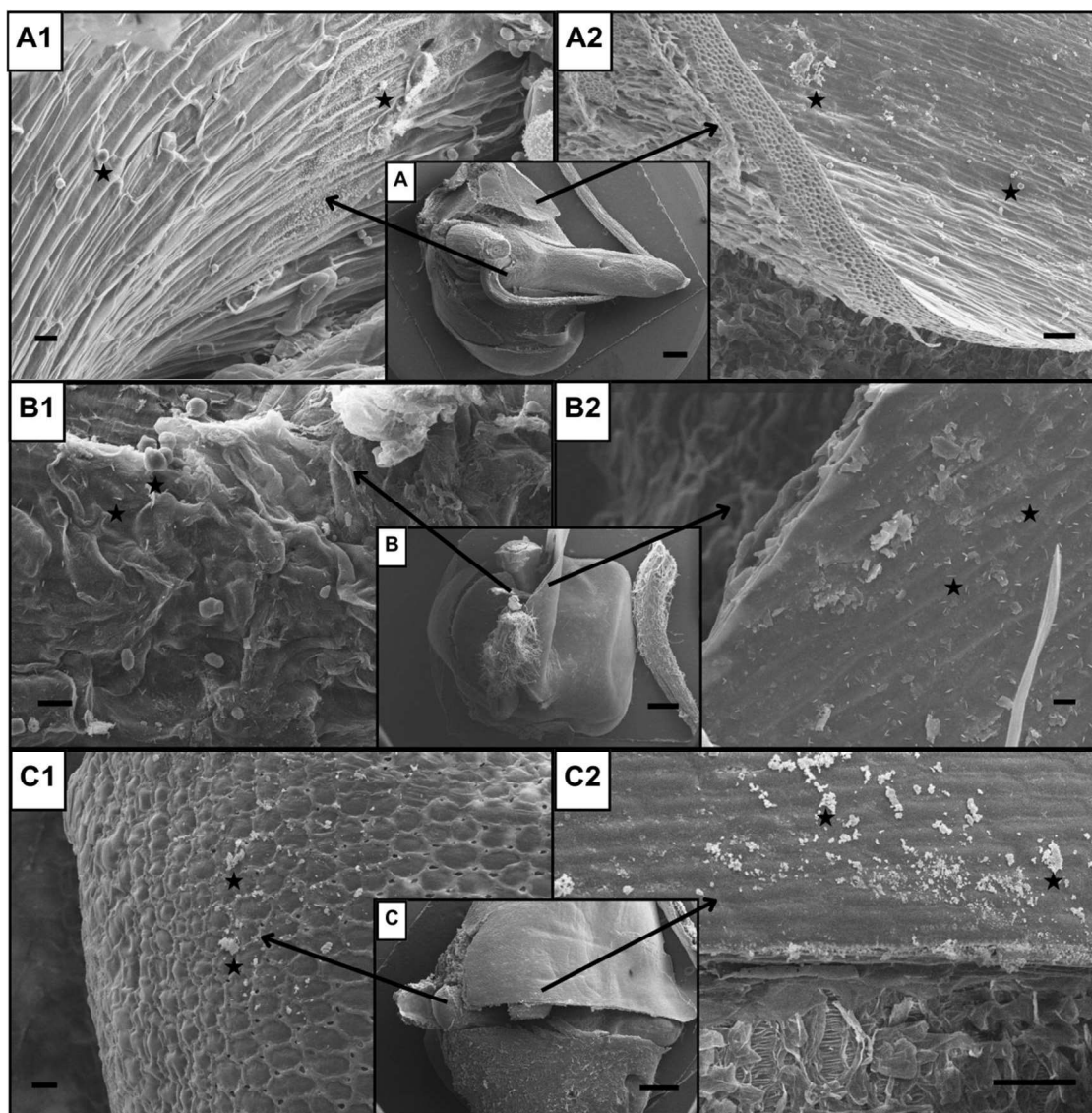


1220

1221 **Figura 18.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando a colonização
1222 bacteriana em sementes pré-germinadas do genótipo SHS. A: Controle, B: 60°C, C: 70°C; 1:
1223 Radícula, 2: Pericarpo. As células bacterianas, aglomerados e biofilmes estão indicados com
1224 asteriscos. Barras de escala: A1, A2, B1, B2, C1 e C2 = 20 µm; A, B, C = 1 mm.

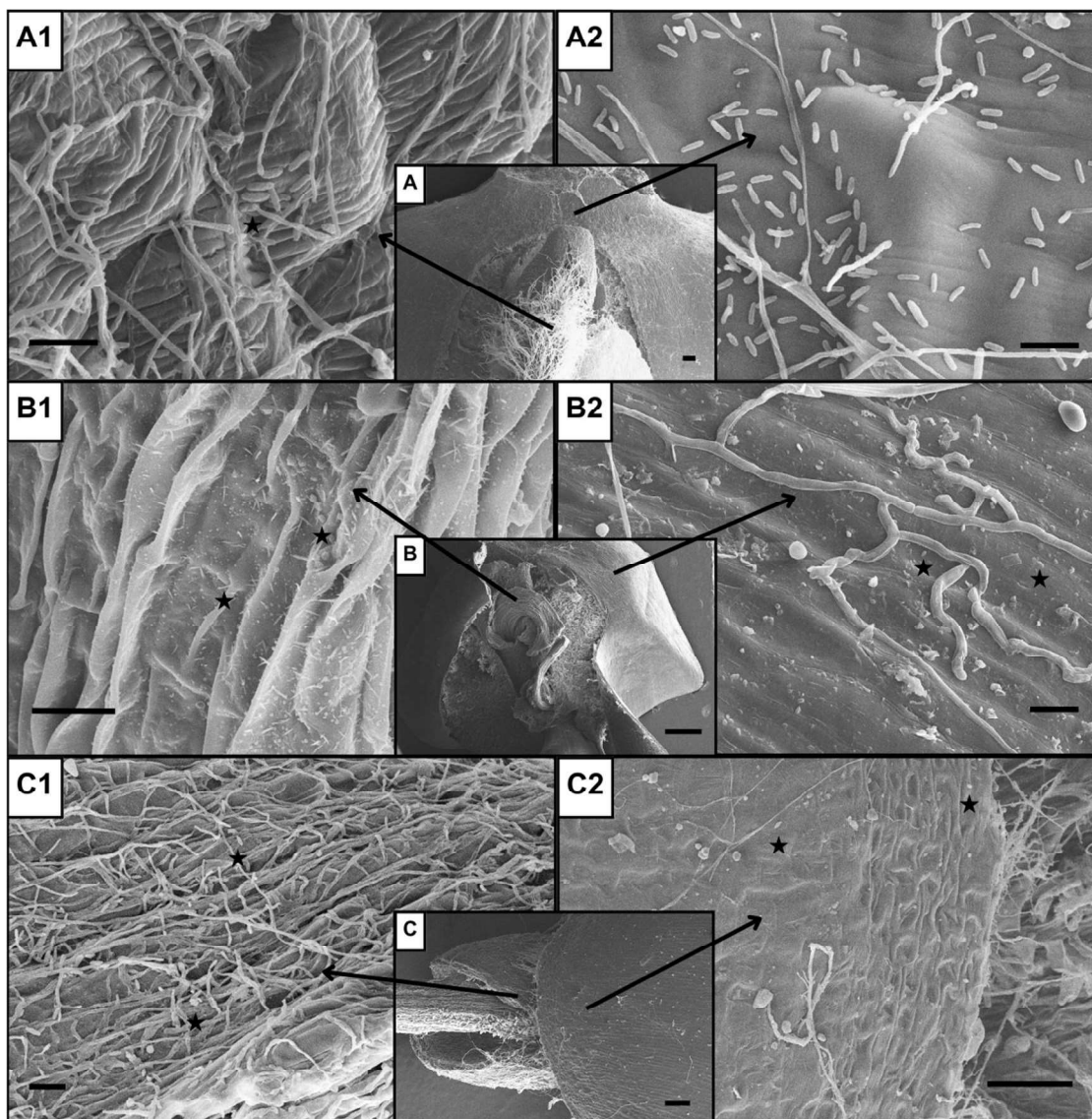
1225

1226 As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do cultivar DKB
1227 mostraram colonização intensa em todos os tratamentos, com a presença de cocos e
1228 células fusiformes (Figura 19), além da formação de biofilme bacteriano nos
1229 tratamentos a 60°C e 70°C. O cultivar SOL apresentou maior diversidade bacteriana,
1230 com a presença de cocos, bactérias em forma de bastonete e células fusiformes
1231 (Figura 20). Nos tratamentos a 60°C e 70°C, também foram detectadas hifas fúngicas,
1232 acompanhadas de redução da população bacteriana à medida que as temperaturas
1233 aplicadas aumentaram.



1234

1235 **Figura 19.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando a colonização
 1236 bacteriana em sementes pré-germinadas do genótipo DKB. A: Controle, B: 60°C, C: 70°C; 1:
 1237 Radícula, 2: Pericarpo. As células bacterianas, aglomerados e biofilmes estão indicados com
 1238 asteriscos. Barras de escala: A1, B1, B2 e C1 = 20 μm; A2 e C2 = 100 μm; A, B, C = 1 mm.



1239

1240 **Figura 20.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando a colonização
 1241 bacteriana em sementes pré-germinadas do genótipo SOL. A: Controle, B: 60°C, C: 70°C; 1:
 1242 Radícula, 2: Pericarpo. As células bacterianas, aglomerados e biofilmes estão indicados com
 1243 asteriscos. Barras de escala: A1, B1, B2 e C1 = 20 µm; A2 e C2 = 100 µm; A, B, C = 1 mm.

1244

1245 DISCUSSÃO

1246 O presente trabalho teve como objetivo comparar o efeito dos tratamentos
 1247 térmicos a 60°C e 70°C sobre a comunidade bacteriana associada às sementes de
 1248 milho provenientes de genótipos contrastantes (crioulo, híbrido comercial e
 1249 geneticamente modificado). Os resultados reforçam as diferenças entre as
 1250 comunidades bacterianas de genótipos distintos de uma mesma cultura e mostram
 1251 como essas comunidades respondem de forma diferenciada a estresses abióticos,

1252 como a temperatura, um fator importante a ser considerado em estudos voltados às
1253 mudanças climáticas.

1254 Os resultados do teste bioquímico de tetrazólio e do teste de germinação
1255 revelam informações significativas sobre o impacto da termoterapia na vigor e
1256 viabilidade das sementes de diferentes genótipos de milho. Waqas et al. (2021)
1257 reforçam que diferentes cultivares de milho apresentam variação genética que
1258 influencia a resposta das plantas ao estresse térmico. Segundo Tas (2022), altas
1259 temperaturas podem afetar negativamente processos fisiológicos cruciais, como o
1260 vigor e a germinação das sementes, efeito que pode ser atribuído à produção de
1261 espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais causam danos às membranas celulares
1262 e degradação de proteínas (Djalovic et al., 2024).

1263 No entanto, Djalovic et al. (2024) relatam que genótipos de milho
1264 geneticamente modificados podem apresentar maior tolerância ao estresse térmico,
1265 devido à produção de fatores e proteínas de choque térmico. Casaretto et al. (2016)
1266 compararam a expressão gênica em linhagens de milho transgênico e não transgênico
1267 sob estresse térmico, observando que a superexpressão do gene OsMYB55 mitigou
1268 os efeitos do estresse abiótico nas linhagens transgênicas. Além disso,
1269 microrganismos associados às plantas, como bactérias promotoras de crescimento
1270 vegetal (PGPB), podem atenuar os efeitos negativos do estresse térmico e hídrico,
1271 por meio da produção de exopolissacarídeos (EPS), da redução dos níveis de ROS,
1272 da regulação osmótica e da formação de barreiras físicas que retêm umidade (Bhagat
1273 et al., 2021).

1274 Observou-se uma redução na densidade bacteriana dos três genótipos de
1275 milho com o aumento das temperaturas aplicadas nos tratamentos térmicos. No
1276 estudo de Santos et al. (2021), após a desinfecção de sementes de milho SHS com
1277 1,25% de hipoclorito de sódio, houve redução nas populações bacterianas,
1278 especialmente do gênero *Burkholderia*, resultando em queda no percentual e na taxa
1279 de germinação. Com a reconstituição parcial da microbiota das sementes, os autores
1280 observaram aumento significativo nos parâmetros de germinação, atingindo níveis
1281 semelhantes ao controle.

1282 De forma semelhante, Cui et al. (2022) relataram que o tratamento térmico a
1283 seco de sementes de pepino suprime a ocorrência de fungos e bactérias. Foram
1284 testadas temperaturas de 60, 70, 80, 90 e 100°C, com tempos de exposição de 2 a 12
1285 horas, e observou-se que o tratamento a 70°C por 4 horas foi o mais eficaz para
1286 inativar microrganismos sem comprometer a germinação. Da mesma forma, Kurniasih
1287 et al. (2020) reportaram redução de 99,38% da bactéria fitopatogênica *Burkholderia*
1288 *glumae* em sementes de arroz tratadas a 55°C por 5 horas, sem afetar a germinação.

1289 A atividade microbiana, quantificada pelo método de hidrólise do FDA, mostrou
1290 forte correlação com a quantificação bacteriana em meio de cultura. A população
1291 microbiana cultivável do solo do genótipo SOL foi superior à do DKB, assim como a
1292 atividade microbiana registrada. No entanto, no genótipo SHS, observou-se o
1293 comportamento inverso: enquanto a população cultivável diminuiu no tratamento a
1294 60°C, a atividade microbiana foi elevada. Esse fenômeno pode ser explicado pela
1295 dinâmica bacteriana sob estresse e competição ambiental, em que as bactérias
1296 podem entrar em um estado viável, mas não cultivável (VBNC). Morawska & Kuipers
1297 (2022) descreveram essa capacidade adaptativa em *Bacillus subtilis*, que sob
1298 estresse osmótico entra em estado dormente, tornando-se tolerante à canamicina,
1299 durante o qual as células não são cultiváveis, mas permanecem viáveis.

1300 A análise de PCoA demonstra que a termoterapia altera as comunidades
1301 bacterianas das sementes de milho entre diferentes genótipos, especialmente no
1302 genótipo transgênico DKB. Os agrupamentos distintos observados nos gráficos
1303 sugerem que o microbioma de cada genótipo responde de forma particular ao estresse
1304 térmico, o que pode estar relacionado a diferenças intrínsecas na composição
1305 microbiana das sementes (Wolfgang et al., 2020) e influenciar sua resiliência ou
1306 suscetibilidade às variações de temperatura. Morales Moreira et al. (2021) analisaram
1307 cinco linhagens e duas gerações de trigo, canola e lentilha, relatando que as
1308 comunidades bacterianas epifíticas de sementes variaram entre as linhagens,
1309 especialmente em trigo (28,37%). A diversidade beta entre linhas parentais foi de
1310 73,84%, enquanto entre as progênes foi de 41,43%, evidenciando a influência do
1311 melhoramento genético na diversidade bacteriana das sementes.

1312 A predominância do gênero *Burkholderia* em sementes de milho já havia sido
1313 relatada por Santos et al. (2021), que descreveram sua influência positiva na
1314 germinação, mobilização de reservas e crescimento de plântulas. O gênero *Dyella*
1315 também foi dominante neste estudo, sendo conhecido por características promotoras
1316 de crescimento vegetal. Domínguez-Castillo et al. (2021) isolaram cinco bactérias dos
1317 gêneros *Dyella*, *Luteimonas*, *Enterobacter*, *Paraburkholderia* e *Bacillus* de solos
1318 rizosféricos de pinheiros, observando que *Dyella* sp. SD2037TM e *Enterobacter* sp.
1319 SD330TM apresentaram os melhores resultados na produção de auxina e giberelina,
1320 além de solubilização de fosfato.

1321 O aumento de bactérias gram-positivas formadoras de esporos, como *Bacillus*
1322 e *Paenibacillus*, em resposta às altas temperaturas, pode trazer benefícios à saúde
1323 das plantas. Esses gêneros são amplamente reconhecidos por suas propriedades
1324 promotoras de crescimento, incluindo fixação de nitrogênio (Masood et al., 2020),
1325 solubilização de fósforo e zinco (Ahmad et al., 2021), produção de quitinase (Du et al.,
1326 2021), biossíntese de auxinas (Wang et al., 2021) e produção de exopolissacarídeos
1327 (Huang et al., 2024). O aumento da abundância relativa desses gêneros em sementes
1328 submetidas à termoterapia pode favorecer a tolerância das plantas a estresses
1329 bióticos e abióticos, contribuindo para melhor crescimento e produtividade sob
1330 condições adversas.

1331 Os resultados demonstram também que a termoterapia de sementes promove
1332 alterações expressivas no potencial metabólico e na atividade funcional das
1333 comunidades bacterianas provenientes das sementes que colonizam a rizosfera
1334 durante a germinação. Essas alterações refletem a seleção diferencial de
1335 microrganismos com distintas capacidades de termotolerância, conforme descrito em
1336 estudos recentes sobre microbiomas de sementes expostas a estresse térmico
1337 (Karlsson et al., 2024). A redução na diversidade funcional está de acordo com
1338 evidências de que a termoterapia, embora eficaz no controle de patógenos, também
1339 impacta microrganismos benéficos associados às sementes (Romão et al., 2025).

1340 De forma complementar, os resultados da Ecoplaca Biolog confirmam o
1341 aumento da atividade catabólica sob altas temperaturas, com maior consumo de
1342 açúcares, aminoácidos e compostos aromáticos nos tratamentos a 70°C. Este padrão

1343 implicaria a regulação positiva de vias catabólicas para a rápida obtenção de energia
1344 e equilíbrio redox, conforme inferido pelas vias KEGG de glicólise, fermentação e
1345 metabolismo de poliaminas, previstas pelo PICRUST2 (Wang et al., 2022).

1346 Estudos anteriores demonstraram que o calor seleciona comunidades com
1347 metabolismo mais dinâmico, capazes de adaptar seu consumo de substrato para
1348 aliviar o estresse abiótico em plantas (Liu et al., 2025). A ligação entre a função predita
1349 e o resultado da Ecoplaca indicou que o potencial metabólico das comunidades estava
1350 relacionado à sua resposta funcional. As vias preditas de glicólise, fermentação
1351 homoláctica e metabolismo de aminoácidos coincidiram com o aumento do consumo
1352 de carboidratos e aminoácidos observado experimentalmente.

1353 A conservação das vias de degradação de compostos aromáticos e
1354 nitrogenados no genótipo SOL é corroborada pelo maior consumo desses substratos
1355 na Ecoplaca, indicando uma comunidade metabolicamente mais diversa. Essa
1356 característica reforça ainda mais a noção de que o estresse térmico muda as
1357 prioridades dos microrganismos para a produção de energia, manutenção das funções
1358 celulares e a aquisição de tolerância ao estresse térmico (Ullah et al. 2025; Islam et
1359 al. 2024). Fuggle et al. (2025), demonstraram que microrganismos termotolerantes
1360 utilizam preferencialmente o metabolismo fermentativo e produzem osmolitos que são
1361 muito importantes para a estabilização de proteínas e membranas.

1362 O equilíbrio entre as vias biossintéticas e degradativas mostrado aqui indica
1363 que o estresse térmico não exclui os processos metabólicos, mas causa um rearranjo
1364 funcional em direção à tolerância ao calor. A maior resistência funcional do genótipo
1365 SOL em comparação com os genótipos comerciais indica que os genótipos
1366 tradicionais conservam uma microbiota mais resistente na presença de estresse
1367 térmico. Esses achados estão alinhados com relatos de que o melhoramento de
1368 plantas influencia a estrutura e a função do microbioma vegetal (Zhang et al., 2023b).
1369 Quando genótipos de milho foram comparados, a microbiota a variedade crioula exibiu
1370 maior capacidade metabólica e tolerância ao estresse abiótico (Romão et al., 2025).

1371 A maior responsividade à temperatura do genótipo transgênico DKB foi
1372 evidenciada por seu maior desvio no PCA e maior redução nas vias metabólicas. Essa
1373 suscetibilidade pode ter surgido de modificações nos genes introduzidos durante o

1374 processo de melhoramento, que, mesmo que indiretamente, influenciam a seleção e
1375 a persistência de seu microbioma (Su et al., 2024). Os resultados têm implicações
1376 práticas para o desenho de estratégias de manejo que reconciliem o manejo
1377 fitossanitário com a conservação do microbioma benéfico. A perda de funcionalidades
1378 microbianas após estresse térmico exige o desenvolvimento de protocolos que
1379 reduzam o impacto em microrganismos promotores de crescimento. Pesquisadores
1380 propuseram recentemente o uso de consórcios de microbioma termotolerante para
1381 inoculação de sementes após tratamentos térmicos para recuperar funcionalidades
1382 metabólicas (Ulla et al., 2025).

1383 A resiliência das funcionalidades bacterianas registradas nas sementes
1384 crioulas sugere que elas podem ser usadas como fonte de microrganismos
1385 termotolerantes para o desenvolvimento de inóculos específicos. Além do valor da
1386 conservação e uso de germoplasma local para a diversidade genética de plantas,
1387 pode também ser importante para a manutenção de microbiomas funcionalmente
1388 relevantes. No geral, os insights genômicos e fenotípicos fornecidos por este estudo
1389 sugerem que essas variedades abrigam microbiomas metabolicamente mais ativos e
1390 tolerantes ao estresse térmico, destacando ainda mais a relevância desses cultivares
1391 como um reservatório de microrganismos de interesse biotecnológico para o
1392 desenvolvimento de bioinoculantes. A predição funcional acoplada ao perfil
1393 metabólico confirma a ideia de que a resiliência do microbioma é um traço funcional
1394 herdável que se manifesta no nível da interação planta-microrganismo (Liu et al.,
1395 2025; Fadiji et al., 2023).

1396 A expressão diferencial dos genes rastreados evidenciou padrões distintos de
1397 resposta ao calor entre os genótipos de milho. Os níveis de expressão indicam
1398 diferentes estratégias de adaptação fisiológica e molecular que envolvem vias de
1399 sinalização hormonal, equilíbrio redox e controle do balanço hídrico. Um aumento
1400 acentuado na aquaporina (Aqua) no genótipo DKB, especialmente após o tratamento
1401 a 70 °C, sugere um mecanismo de adaptação relacionado à água e ao fluxo. As
1402 aquaporinas são proteínas de membrana envolvidas no transporte de água e
1403 pequenas moléculas, cujas expressões são afetadas pela seca, salinidade e
1404 temperatura (Suslov et al., 2024). Isso sugere que, como proposto, a DKB depende
1405 da regulação positiva de genes relacionados ao transporte de água como um

1406 mecanismo de enfrentamento para contrapor a desidratação induzida pelo calor
1407 (Abdeldaym et al., 2024). A expressão proteica regulada diferencialmente entre os
1408 genótipos também foi associada à plasticidade da expressão gênica do gene PIP2;5
1409 no milho, dependendo do estresse e do genótipo (Maistriaux et al., 2024).

1410 O genótipo crioulo SOL apresentou um perfil distinto, com forte indução do gene
1411 Giber (giberelina) a 70 °C, acompanhado pela repressão de Aqua e Srox. Esse padrão
1412 sugere que o SOL utiliza um mecanismo de tolerância hormonal, priorizando a
1413 sinalização por giberelinas em detrimento dos ajustes hidráulicos. As giberelinas
1414 mediam a termomorfogênese e processos de recuperação pós-estresse associados à
1415 promoção do alongamento celular e plasticidade de crescimento ao calor (Nagar et
1416 al., 2021). Tal processo foi recentemente descrito como um mecanismo fisiológico de
1417 resiliência que permite a planta manter o crescimento sob condições de estresse (Jing
1418 et al., 2023).

1419 No genótipo SHS, por sua vez, genes associados à auxina (Indol), giberelina
1420 (Giber), aquaporina (Aqua), regulação redox (Srox) e resposta precoce (Early) foram
1421 acionados simultaneamente. Essa resposta multilateral indica alta plasticidade
1422 fisiológica em SHS, que é eficiente para alterar prontamente várias vias metabólicas.
1423 No entanto, uma resposta integrada como essa pode não ser econômica para a planta,
1424 o que representa um trade-off entre resiliência e economia de energia. A indução de
1425 genes de resposta precoce, que são semelhantes aos genes ENOD-like, está
1426 envolvida na reorganização mitocondrial e na eficiência do uso de nitrogênio, que
1427 contribuem para o equilíbrio energético sob condições de estresse térmico (Lee et al.,
1428 2024; Ntui et al., 2024).

1429 Genes da família SRO/RCD1 (Srox), que foram induzidos em DKB e SHS,
1430 estão envolvidos na regulação redox e regulação transcricional sob condições de
1431 estresse e são necessários para proteger espécies reativas de oxigênio e manter a
1432 estabilidade proteica (Vainonen et al., 2023; Jiang et al., 2024). O calor provoca
1433 acúmulo de ROS e altera a homeostase mitocondrial, e a ativação de SRO representa
1434 um mecanismo protetor de estabilização das funções metabólicas (Selinski et al.,
1435 2024; DüNDAR et al., 2025).

1436 A ausência desse efeito em SOL a 70 °C pode indicar que a abordagem
1437 mediada por giberelina diminui a necessidade de expressão gênica de alto estresse
1438 oxidativo, reduzindo os custos energéticos. Esses contrastes apresentam marcadores
1439 moleculares específicos de genótipo para tolerância ao calor, o que é esperado devido
1440 às variações genótípicas e fenotípicas entre os genótipos de milho. O estresse térmico
1441 altera os equilíbrios hídrico e hormonal-redox, e as plantas utilizam módulos gênicos
1442 contrastantes para manter o crescimento e a estabilidade celular (Jing et al., 2023;
1443 Dündar et al., 2025).

1444

1445 **CONCLUSÕES**

1446 Este estudo desvendou um panorama da resposta ao estresse térmico da
1447 comunidade bacteriana que habita sementes de milho expostas ao estresse térmico
1448 a 60 °C e 70 °C, revelando diferenças acentuadas entre os genótipos Sol da Manhã
1449 (SOL), Santa Helena (SHS 5050) e Dekalb (DKB 177). A análise integrada de vigor
1450 de sementes, germinação, diversidade taxonômica da comunidade, metabolismo
1451 bacteriano e expressão gênica demonstra que a temperatura é capaz de modular a
1452 estrutura, o funcionamento e a resiliência da comunidade bacteriana de maneira
1453 dependente do genótipo.

1454 O genótipo crioulo SOL apresenta maior resiliência funcional e de microbioma
1455 em altas temperaturas, onde um microbioma funcionalmente mais plástico é menos
1456 afetado pela perda de diversidade. Tal resiliência maior parece estar relacionada à
1457 presença de microrganismos com maior plasticidade fisiológica e ao domínio de vias
1458 metabólicas relacionadas à biossíntese de moléculas protetoras como GABA e
1459 exopolissacarídeos. Tais resultados reforçam o papel dos cultivares tradicionais como
1460 reservatórios de microbiomas adaptados, com potencial para o desenvolvimento de
1461 bioinoculantes termotolerantes e para estratégias de manejo agrícola sustentáveis.

1462 Em contraste, o genótipo DKB apresentou maior sensibilidade funcional à
1463 termoterapia, com redução expressiva na diversidade e no potencial metabólico,
1464 acompanhada por forte ativação de mecanismos moleculares de compensação, como
1465 o aumento na expressão de aquaporinas e genes da família SRO/RCD1. As respostas

1466 obtidas foram uma mudança metabólica em direção à regulação redox e manutenção
1467 da água com grandes despesas energéticas e uma provável redução dos benefícios
1468 microbianos.

1469 O genótipo SHS mostrou uma resposta intermediária com grande plasticidade
1470 que desencadeou vários mecanismos hormonais e antioxidantes, provavelmente
1471 como um mecanismo de tolerância de curto prazo. Embora tal plasticidade possa
1472 melhorar a capacidade de sobrevivência em ambientes em mudança, também
1473 mostrou um provável desequilíbrio funcional das comunidades microbianas, o que
1474 pode prejudicar o desempenho da planta no futuro próximo em cenários de
1475 aquecimento global.

1476 A convergência entre os resultados de predição funcional (PICRUSt2) e de
1477 atividade catabólica (Ecoplaca Biolog) demonstra que o calor induz uma
1478 reprogramação metabólica microbiana voltada à manutenção de energia e
1479 homeostase celular, com predominância de vias fermentativas e de metabolismo de
1480 aminoácidos. Essa mudança caracteriza o conceito de que o estresse térmico não é
1481 um supressor geral da função do microbioma, mas sim um remodelador de suas
1482 funcionalidades que poderia ser aproveitado em programas biotecnológicos.

1483 Em conclusão, este estudo mostra que as respostas bacterianas foram
1484 dependentes do genótipo, sugerindo processos coevolutivos entre plantas e seu
1485 microbioma. Embora o método utilizado de termoterapia seja bem-sucedido na
1486 redução de microrganismos patogênicos, ele também altera a microbiota benéfica.
1487 Novos protocolos de tratamento por termoterapia que combinem o uso de altas
1488 temperaturas com reinoculação de comunidades benéficas poderia servir para
1489 restabelecer as funcionalidades do microbioma, e que este tratamento também pode
1490 promover um aumento na tolerância das plantas ao calor.

1491 Os resultados reforçam a ideia de que sementes crioulas devem ser mantidas
1492 para conservar as diversidades genéticas e de microbioma como base para a
1493 estabilidade agroecológica em um cenário de aquecimento global. Além disso, o uso
1494 de abordagens genômicas, funcionais e fisiológicas fornece uma nova perspectiva
1495 sobre o envolvimento do microbioma de sementes na adaptação das plantas ao calor,

1496 abrindo caminho para o desenvolvimento de bioinoculantes e práticas agrícolas mais
1497 sustentáveis para uma agricultura termotolerante.

1498

1499

1500

1501

1502

1503

1504

1505

1506

1507

1508

1509

1510

1511

1512

1513

1514

1515

1516

1517

1518

1519

1520 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1521 Abdeldaym, E. A., Hassan, H. A., El-Mogy, M. M., Mohamed, M. S., Abuarab, M. E., &
1522 Omar, H. S. (2024). Elevated concentrations of soil carbon dioxide with partial root-zone drying
1523 enhance drought tolerance and agro-physiological characteristics by regulating the expression
1524 of genes related to aquaporin and stress response in cucumber plants. *BMC Plant Biology*,
1525 24(1), 917.
- 1526 Abdelfattah, A., Tack, A. J., Lobato, C., Wassermann, B., & Berg, G. (2023). From seed
1527 to seed: the role of microbial inheritance in the assembly of the plant microbiome. *Trends in*
1528 *Microbiology*, 31(4), 346-355.
- 1529 Abdul Rahman, N. S. N., Abdul Hamid, N. W., & Nadarajah, K. (2021). Effects of abiotic
1530 stress on soil microbiome. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 9036.
- 1531 Ahmad, I., Ahmad, M., Hussain, A. et al. (2021). Integrated use of phosphate-
1532 solubilizing *Bacillus subtilis* strain Ia6 and zinc-solubilizing *Bacillus sp.* strain Ia16: a promising
1533 approach for improving cotton growth. *Folia Microbiologica*, 66, 115–125.
- 1534 Allaby, R. G., Ware, R. L., & Kistler, L. (2019). A re-evaluation of the domestication
1535 bottleneck from archaeogenomic evidence. *Evolutionary Applications*, 12(1), 29-37.
- 1536 Altschul, S. F., & Lipman, D. J. (1990). Protein database searches for multiple
1537 alignments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(14), 5509-5513.
- 1538 Alves, G. C., dos Santos, C. L. R., Zilli, J. E., Fabio, B., Marriel, I. E., Breda, F. A. F., &
1539 Boddey, R. M. (2021). Agronomic evaluation of *Herbaspirillum seropedicae* strain Zae94 as
1540 an inoculant to improve maize yield in Brazil. *Pedosphere*, 31(4), 583–595.
- 1541 Aziz, M. A., & Masmoudi, K. (2025). Molecular breakthroughs in modern plant breeding
1542 techniques. *Horticultural Plant Journal*, 10(2), 375-390.
- 1543 Baldani, J. I., Reis, V. M., Videira, S. S. et al. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing
1544 bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for
1545 microbiologists. *Plant and Soil*, 384, 413–431.
- 1546 Barnes, C. J., Bünner, M. S., Ramírez-Flores, M. R., Nielsen, I. B., Ramos-Madrigal,
1547 J., Zharikova, D., ... & Sawers, R. J. (2024). The ancestral environment of teosinte populations
1548 shapes their root microbiome. *Environmental Microbiome*, 19(1), 64.
- 1549 Berg, G., & Cernava, T. (2022). The plant microbiota signature of the Anthropocene as
1550 a challenge for microbiome research. *Microbiome*, 1–12.
- 1551 Bhagat, N., Raghav, M., Dubey, S., & Bedi, N. (2021). Bacterial exopolysaccharides:
1552 Insight into their role in plant abiotic stress tolerance. *Journal of microbiology and*
1553 *biotechnology*, 31(8), 1045.

- 1554 Bogati, K., & Walczak, M. (2022). The impact of drought stress on soil microbial
1555 community, enzyme activities and plants. *Agronomy*, 12(1), 189.
- 1556 Borghetti, F., & Ferreira, A. G. (2004). Interpretação de resultados de germinação. In:
1557 Ferreira, A. G.; Borghetti, F. (orgs.). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed,
1558 209-222.
- 1559 Brasil. (2009). Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e
1560 Abastecimento, 395 p.
- 1561 Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes,
1562 S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature*
1563 *Methods*, 13(7), 581-583.
- 1564 Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A.,
1565 Turnbaugh, P. J., ... & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of
1566 millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,
1567 108(supplement_1), 4516-4522.
- 1568 Casaretto, J. A., El-Kereamy, A., Zeng, B., Stiegelmeyer, S. M., Chen, X., Bi, Y.-m., &
1569 Rothstein, S. J. (2016). Expression of OsMYB55 in maize activates stress-responsive genes
1570 and enhances heat and drought tolerance. *Bmc Genomics*, 17(1), 312.
- 1571 Cassán, F., Coniglio, A., López, G., Molina, R., Nievas, S., de Carlan, C. L. N., Donadio,
1572 F., Torres, D., Rosas, S., & Pedrosa, F. O. (2020). Everything you must know about
1573 *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biology and Fertility of Soils*, 56(4),
1574 461–479.
- 1575 Ceballos-Aguirre, N., Cuellar, J. A., Restrepo, G. M., & Sánchez, Ó. J. (2023). Effect of
1576 the application of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its interaction with nitrogen and
1577 phosphorus fertilization on carrot yield in the field. *International Journal of Agronomy*, 2023(1),
1578 6899532.
- 1579 Clement, C. R., Casas, A., Parra-Rondinel, F. A., Levis, C., Peroni, N., Hanazaki, N.,
1580 ... & Mazzochini, G. G. (2021). Disentangling domestication from food production systems in
1581 the Neotropics. *Quaternary*, 4(1), 4.
- 1582 Cochran, W. G. (1950). Estimation of bacterial densities by means of the “Most
1583 Probable Number”. *Biometrics*, 6, 105–116.
- 1584 Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant
1585 microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of*
1586 *advanced research*, 19, 29-37.
- 1587 Conab - Companhia Nacional de Abastecimento. (2024). Acompanhamento da Safra
1588 Brasileira de Grãos. Brasília, Df, v. 11, safra 2023/24, n. 9, junho.

- 1589 Cui, X. L., Yun, X. F., Tian, X. C., Wu, R. H., & Liu, J. C. (2022). Effect of dry-heat on
1590 the inactivation efficacy of cucumber seed with fungi and bacteria.
- 1591 Das, P. P., Singh, K. R., Nagpure, G., Mansoori, A., Singh, R. P., Ghazi, I. A., Kumar,
1592 A., & Singh, J. (2022). Plant-soil-microbes: a tripartite interaction for nutrient acquisition and
1593 better plant growth for sustainable agricultural practices. *Environmental Research*, 214,
1594 113821.
- 1595 Delaporte-Quintana P, Grillo-Puertas M, Lovaisa NC, Teixeira KR, Rapisarda VA,
1596 Pedraza RO (2017) Contribution of *Gluconacetobacter diazotrophicus* to phosphorus nutrition
1597 in strawberry plants. *Plant Soil* 419(1–2):335–347
- 1598 Delitte, M., Caulier, S., Bragard, C., & Desoignies, N. (2021). Plant microbiota beyond
1599 farming practices: a review. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 624203.
- 1600 Djalovic, I.; Kundu, S.; Bahuguna, R. N.; Pareek, A.; Raza, A.; Singla Pareek, S. L. et
1601 al. Maize and heat stress: Physiological, genetic, and molecular insights. *The Plant Genome*,
1602 v. 17, n. 1, e20378, 2024.
- 1603 Domínguez-Castillo, C., Alatorre-Cruz, J. M., Castañeda-Antonio, D. et al. (2021).
1604 Potential seed germination-enhancing plant growth-promoting rhizobacteria for restoration of
1605 *Pinus chiapensis* ecosystems. *Journal of Forestry Research*, 32, 2143–2153.
- 1606 Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C.
1607 M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome
1608 functions. *Nature Biotechnology*, 38, 685–688.
- 1609 Du, J., Duan, S., Miao, J., Zhai, M., & Cao, Y. (2021). Purification and characterization
1610 of chitinase from *Paenibacillus sp.* *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68(1), 30-40.
- 1611 Dündar, G., Ramirez, V. E., & Poppenberger, B. (2025). The heat shock response in
1612 plants: new insights into modes of perception, signaling, and the contribution of hormones.
1613 *Journal of Experimental Botany*, 76(7), 1970-1977.
- 1614 Etesami, H., Jeong, B. R., & Glick, B. R. (2023). Potential use of *Bacillus* spp. as an
1615 effective biostimulant against abiotic stresses in crops - A review. *Current Research in*
1616 *Biotechnology*, 5, 100128.
- 1617 Fadiji, A. E., Yadav, A. N., Santoyo, G., & Babalola, O. O. (2023). Understanding the
1618 plant-microbe interactions in environments exposed to abiotic stresses: An overview.
1619 *Microbiological Research*, 271, 127368.
- 1620 Fitzpatrick, C. R., Salas-González, I., Conway, J. M., Finkel, O. M., Gilbert, S., Russ,
1621 D., Teixeira, P. J. P. L., & Dangl, J. L. (2020). The plant microbiome: From ecology to
1622 reductionism and beyond. *Annual Review of Microbiology*, 74, 81–100.
- 1623 Fuggle, R., et al. (2025). Multiple stressors shape microbial function rather than
1624 taxonomy across environments. *Isme Journal*, 19(3), 1256–1270.

- 1625 Fuller, D. Q., Denham, T., & Allaby, R. (2023). Plant domestication and agricultural
1626 ecologies. *Current Biology*, 33(11), R636-R649.
- 1627 Ghazala, I., Chiab, N., Saidi, M. N., & Gargouri-Bouzid, R. (2023). The plant growth-
1628 promoting bacteria strain *Bacillus mojavensis* I4 enhanced salt stress tolerance in durum
1629 wheat. *Current Microbiology*, 80(5), 178.
- 1630 Gómez-Godínez, L. J., Aguirre-Noyola, J. L., Martínez-Romero, E., Arteaga-Garibay,
1631 R. I., Ireta-Moreno, J., & Ruvalcaba-Gómez, J. M. (2023). A look at plant-growth-promoting
1632 bacteria. *Plants*, 12(8), 1668.
- 1633 Guo, K., Yang, J., Yu, N., Luo, L., & Wang, E. (2023). Biological nitrogen fixation in
1634 cereal crops: progress, strategies, and perspectives. *Plant Communications*, 4, 100499.
- 1635 Gutierrez, A., & Grillo, M. A. (2022). Effects of domestication on plant–microbiome
1636 interactions. *Plant and Cell Physiology*, 63(11), 1654-1666.
- 1637 Huang, X. Y., Ye, X. P., Hu, Y. Y., Tang, Z. X., Zhang, T., Zhou, H., ... & Shi, L. E.
1638 (2024). Exopolysaccharides of *Paenibacillus polymyxa*: A review. *International Journal of*
1639 *Biological Macromolecules*, 261, 129663.
- 1640 Irineu, L. E. S. S., Soares, C. de P., Bittencourt, P. P., Passos, L. C., de Souza, S. B.,
1641 Roesch, L., Façanha, A. R., & Olivares, F. L. (2022). Multiomic approaches reveal hormonal
1642 modulation and nitrogen uptake and assimilation in the initial growth of maize inoculated with
1643 *Herbaspirillum seropedicae*. *Plants*, 12(1), 48.
- 1644 Islam, S. N. U., Kouser, S., Hassan, P., Asgher, M., Shah, A. A., & Khan, N. A. (2024).
1645 Gamma-aminobutyric acid interactions with phytohormones and its role in modulating abiotic
1646 and biotic stress in plants. *Stress Biology*, 4(1), 36.
- 1647 Jiang, H., Zhang, Y., Li, J., Tang, R., Liang, F., Tang, R., ... & Zhang, C. (2024).
1648 Genome-wide identification of SIMILAR to RCD ONE (SRO) gene family in rapeseed (*Brassica*
1649 *napus* L.) reveals their role in drought stress response. *Plant Signaling & Behavior*, 19(1),
1650 2379128.
- 1651 Jing, H., Wilkinson, E. G., Sageman-Furnas, K., & Strader, L. C. (2023). Auxin and
1652 abiotic stress responses. *Journal of Experimental Botany*, 74(22), 7000-7014.
- 1653 Johnston-Monje, D., Gutiérrez, J. P., & Lopez-Lavalle, L. A. B. (2021). Seed-
1654 transmitted bacteria and fungi dominate juvenile plant microbiomes. *Frontiers in Microbiology*,
1655 12, 737616.
- 1656 Karlsson, M. E., Forsberg, G., Rosberg, A. K., Thaning, C., & Alsanius, B. (2024).
1657 Impact of thermal seed treatment on spermosphere microbiome, metabolome and viability of
1658 winter wheat. *Scientific Reports*, 14(1), 27197.

- 1659 Khanal, S., Imran, M., Zhou, X. G., & Antony-Babu, S. (2024). Characterization of
1660 differences in seed endophytic microbiome in conventional and organic rice by amplicon-based
1661 sequencing and culturing methods. *Microbiology Spectrum*, 12(4), e03662-23.
- 1662 Khoury, C. K., Brush, S., Costich, D. E., Curry, H. A., De Haan, S., Engels, J. M., ... &
1663 Thormann, I. (2022). Crop genetic erosion: understanding and responding to loss of crop
1664 diversity. *New Phytologist*, 233(1), 84-118.
- 1665 Kistler, L., Thakar, H. B., VanDerwarker, A. M., Domic, A., Bergström, A., George, R.
1666 J., Harper, T. K., Allaby, R. G., Hirth, K., Kennett, D. J. (2020). Archaeological Central
1667 American maize genomes suggest ancient gene flow from South America. *Proceedings of the*
1668 *National Academy of Sciences*, 117(52), 33124-33129.
- 1669 Koide, R. T. (2023). On holobionts, holospecies, and holoniches: the role of microbial
1670 symbioses in ecology and evolution. *Microbial Ecology*, 85(4), 1143-1149.
- 1671 Kumar, A., Naroju, S. P., Kumari, N., Arsey, S., Kumar, D., Gubre, D. F.,
1672 Roychowdhury, A., Tyagi, S., Saini, P. (2024). The role of drought response genes and plant
1673 growth-promoting bacteria on plant growth promotion under sustainable agriculture: A review.
1674 *Microbiological Research*, 286, 127827.
- 1675 Kumar, K., Gambhir, G., Dass, A., Tripathi, A. K., Singh, A., Jha, A. K., Yadava, P.,
1676 Choudhary, M, Rakshit, S. (2020). Genetically modified crops: current status and future
1677 prospects. *Planta*, 251(4), 91.
- 1678 Kurniasih, K.; Giyanto, G.; Sinaga, M.s.; Mutaqin, K.h.; Widajati, E. (2020) Control of
1679 *Burkholderia glumae* in rice seed by dry heat and clove oil treatments. *Jurnal Fitopatologi*
1680 *Indonesia* (jfi), v. 16, n. 3, p. 123-134, 2020.
- 1681 Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., ... &
1682 Barka, E. A. (2022). Biological control of plant pathogens: A global perspective.
1683 *Microorganisms*, 10(3), 596.
- 1684 Lee, C. P., Le, X. H., Gawryluk, R. M., Casaretto, J. A., Rothstein, S. J., & Millar, A. H.
1685 (2024). EARLY NODULIN93 acts via cytochrome c oxidase to alter respiratory ATP production
1686 and root growth in plants. *The Plant Cell*, 36(11), 4716-4731.
- 1687 Li, D., Chen, W., Luo, W., Zhang, H., Liu, Y., Shu, D., & Wei, G. (2025). Seed
1688 microbiomes promote *Astragalus mongholicus* seed germination through pathogen
1689 suppression and cellulose degradation. *Microbiome*, 13(1), 23.
- 1690 Liu, H., Su, Y., Ye, C., Zuo, D., Wang, L., Mei, X., ... & Zhu, S. (2025). Nucleotides
1691 enriched under heat stress recruit beneficial rhizomicrobes to protect plants from heat and
1692 root-rot stresses. *Microbiome*, 13(1), 160.
- 1693 Liu, H., Brettell, L. E., Qiu, Z., & Singh, B. K. (2020). Microbiome-mediated stress
1694 resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 25(8), 733-743.

- 1695 Liu, J., Zheng, Y., Lin, X., Li, Y., & Cao, R. (2021). microeco: An R package for data
1696 mining in microbial community ecology. *Fems Microbiology Ecology*, 97(12), fiab151.
- 1697 Liu, S., Wu, J., Cheng, Z., Wang, H., Jin, Z., Zhang, X., ... & Xie, J. (2025). Microbe-
1698 mediated stress resistance in plants: the roles played by core and stress-specific microbiota.
1699 *Microbiome*, 13(1), 111.
- 1700 Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using
1701 real-time quantitative Pcr and the 2⁻ ΔΔct method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- 1702 Maguire, J. (1962). Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling
1703 emergence and vigor. *Crop Science*, 2, 176-177.
- 1704 Maistriaux, L. C., Laurent, M. J., Jeanguenin, L., Prado, S. A., Nader, J., Welcker, C.,
1705 ... & Chaumont, F. (2024). Genetic variability of aquaporin expression in maize: From eQTLs
1706 to a MITE insertion regulating PIP2; 5 expression. *Plant Physiology*, 196(1), 368-384.
- 1707 Maitra, S., & Singh, V. (2021). Invited review on 'maize in the 21st century' Emerging
1708 trends of maize biorefineries in the 21st century: Scientific and technological advancements in
1709 biofuel and bio-sustainable market. *Journal of Cereal Science*, 101, 103272.
- 1710 Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput
1711 sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), 10–12.
- 1712 Masood, S., Zhao, X. Q., & Shen, R. F. (2020). *Bacillus pumilus* promotes the growth
1713 and nitrogen uptake of tomato plants under nitrogen fertilization. *Scientia Horticulturae*, 272,
1714 109581.
- 1715 McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible
1716 interactive analysis and graphics of microbiome census data. *Plos One*, 8(4), e61217.
- 1717 Mesny, F., Hacquard, S., & Thomma, B. P. (2023). Co-evolution within the plant
1718 holobiont drives host performance. *EMBO Reports*, 24(9), e57455.
- 1719 Molina-Romero, D., Baez, A., Quintero-Hernández, V., Castañeda-Lucio, M., Fuentes-
1720 Ramírez, L. E., Bustillos-Cristales, M. D. R., Rodríguez-Andrade, O., Morales-García, Y. E., &
1721 Muñoz-Rojas, J. (2021). A bacterial consortium interacts with different varieties of maize,
1722 promotes the plant growth, and reduces the application of chemical fertilizer under field
1723 conditions. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 616757.
- 1724 Moore, E. R., Carter, K. R., Heneghan, J. P., Steadman, C. R., Nachtsheim, A. C.,
1725 Anderson-Cook, C., ... & Albright, M. B. (2023). Microbial drivers of plant performance during
1726 drought depend upon community composition and the greater soil environment. *Microbiology
1727 Spectrum*, 11(2), e01476-22.
- 1728 Morales Moreira, Z. P., Helgason, B. L., & Germida, J. J. (2021). Crop, genotype, and
1729 field environmental conditions shape bacterial and fungal seed epiphytic microbiomes.
1730 *Canadian Journal of Microbiology*, 67(2), 161-173.

- 1731 Morawska, L. P., & Kuipers, O. P. (2022). Antibiotic tolerance in environmentally
1732 stressed *Bacillus subtilis*: physical barriers and induction of a viable but nonculturable state.
1733 *MicroLife*, 3, uqac010.
- 1734 Nagar, S., Singh, V. P., Arora, A., Dhakar, R., Singh, N., Singh, G. P., ... & Shiv
1735 Ramakrishnan, R. (2021). Understanding the role of gibberellic acid and paclobutrazol in
1736 terminal heat stress tolerance in wheat. *Frontiers in Plant Science*, 12, 692252.
- 1737 Ngalimat, M. S., Mohd Hata, E., Zulperi, D., Ismail, S. I., Ismail, M. R., Mohd Zainudin,
1738 N. A. I., ... & Yusof, M. T. (2021). Plant growth-promoting bacteria as an emerging tool to
1739 manage bacterial rice pathogens. *Microorganisms*, 9(4), 682.
- 1740 Ntui, V. O., Tripathi, J. N., Shah, T., & Tripathi, L. (2024). Targeted knockout of early
1741 nodulin-like 3 (*MusaENODL3*) gene in banana reveals its function in resistance to
1742 *Xanthomonas* wilt disease. *Plant Biotechnology Journal*, 22(5), 1101-1112.
- 1743 Okon, Y., Albrecht, S. L., & Burris, R. H. (1977). Methods for growing *Spirillum*
1744 *lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Applied and*
1745 *Environmental Microbiology*, 33, 85-88.
- 1746 Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'hara, R. B., ...
1747 & Oksanen, M. J. (2013). Package 'vegan'. *Community Ecology Package, version*, 2(9), 1-295.
- 1748 Orozco-Mosqueda, M. D. C., Santoyo, G., & Glick, B. R. (2023). Recent advances in
1749 the bacterial phytohormone modulation of plant growth. *Plants*, 12(3), 606.
- 1750 Pantigoso, H. A., Newberger, D., & Vivanco, J. M. (2022). The rhizosphere microbiome:
1751 Plant–microbial interactions for resource acquisition. *Journal of Applied Microbiology*, 133(5),
1752 2864-2876.
- 1753 Purugganan, M. D. (2022). What is domestication?. *Trends in Ecology & Evolution*,
1754 37(8), 663-671.
- 1755 Telles, T. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2023). Economic benefits of biological
1756 nitrogen fixation in Brazilian soybean farming systems. *Environmental Technology &*
1757 *Innovation*, 32, 103130.
- 1758 Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., &
1759 Glöckner, F. O. (2013). The Silva ribosomal Rna gene database project: Improved data
1760 processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(d1), D590–d596.
- 1761 Rana, R., & Patil, P. B. (2024). *Xanthomonas sontii*, and not *Xanthomonas sacchari*, is
1762 the predominant, vertically transmitted core rice seed endophyte. *Phytopathology*, 114(4), 891-
1763 901.
- 1764 Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2021). Phosphate-
1765 solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake.
1766 *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21(1), 49-68.

- 1767 Raza, A., Zahra, N., Hafeez, M. B., Ahmad, M., Iqbal, S., Shaukat, K., & Ahmad, G.
1768 (2020). Nitrogen fixation of legumes: Biology and Physiology. In *The plant family Fabaceae:
1769 biology and physiological responses to environmental stresses* (pp. 43-74). Singapore:
1770 Springer Singapore.
- 1771 Romão, I. R., do Carmo Gomes, J., Silva, D., & Vilchez, J. I. (2025). The seed
1772 microbiota from an application perspective: an underexplored frontier in plant–microbe
1773 interactions. *Crop Health*, 3(1), 12.
- 1774 Santos, L. F., Souta, J. F., Soares, C. P., Rocha, L. O., Santos, M. L. C., Grativol, C.,
1775 ... & Olivares, F. L. (2021). Insights into the structure and role of seed-borne bacteriome during
1776 maize germination. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(4), fiab024.
- 1777 Selinski, J., Frings, S., & Schmidt-Schippers, R. (2024). Perception and processing of
1778 stress signals by plant mitochondria. *The Plant Journal*, 120(6), 2337-2355.
- 1779 Sena, L., Mica, E., Valè, G., Vaccino, P., Pecchioni, N. (2024) Exploring the potential
1780 of endophyte-plant interactions for improving crop sustainable yields in a changing climate.
1781 *Frontiers in Plant Science*, v. 15, p. 1349401.
- 1782 Silva, A. M. S., Carmo, M. G. F., Olivares, F. L., & Pereira, A. J. (2002). Termoterapia
1783 via calor seco no tratamento de sementes de tomate: eficiência na erradicação de
1784 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e efeitos sobre a semente. *Fitopatologia Brasileira*,
1785 27(6), 586–593.
- 1786 Simonin, M., Dasilva, C., Terzi, V., Ngonkeu, E. L., Diouf, D., Kane, A., ... & Moulin, L.
1787 (2020). Influence of plant genotype and soil on the wheat rhizosphere microbiome: evidences
1788 for a core microbiome across eight African and European soils. *FEMS Microbiology Ecology*,
1789 96(6), fiaa067.
- 1790 Sofo, A., & Ricciuti, P. (2019). A standardized method for estimating the functional
1791 diversity of soil bacterial community by Biolog® EcoPlates™ assay—the case study of a
1792 sustainable olive orchard. *Applied Sciences*, 9(19), 4035.
- 1793 Su, P., Kang, H., Peng, Q., Peng, W., Sun, S. E., Du, X., ... & Zhang, D. (2025). Host
1794 metabolites explain microbiome variation between different rice genotypes. *Microbiome*, 13(1),
1795 185.
- 1796 Suslov, M., Daminova, A., & Egorov, J. (2024). Real-time dynamics of water transport
1797 in the roots of intact maize plants in response to water stress: the role of aquaporins and the
1798 contribution of different water transport pathways. *Cells*, 13(2), 154.
- 1799 Tas, T. Physiological and biochemical responses of hybrid maize (*Zea mays* L.)
1800 varieties grown under heat stress conditions. *PeerJ*, v. 10, p. e14141, 2022.
- 1801 Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2023). Plant growth-promoting
1802 soil bacteria: nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophore production, and other
1803 biological activities. *Plants*, 12(24), 4074.

- 1804 Timofeeva, A., Galyamova, M., & Sedykh, S. (2022). Prospects for using phosphate-
1805 solubilizing microorganisms as natural fertilizers in agriculture. *Plants*, 11(16), 2119.
- 1806 Triantafyllou, A., Kamou, N., Papadopoulou, A., Leontidou, K., Mellidou, I., &
1807 Karamanoli, K. (2023). Evaluation of the biocontrol potential of PGPB strains isolated from
1808 drought-tolerant tomatoes against fungal pathogens. *Journal of Plant Pathology*, 105(3), 1013-
1809 1029.
- 1810 Trivedi, P., Batista, B. D., Bazany, K. E., & Singh, B. K. (2022). Plant–microbiome
1811 interactions under a changing world: Responses, consequences and perspectives. *New*
1812 *Phytologist*, 234(6), 1951–1959.
- 1813 Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2020). Plant–microbiome
1814 interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11),
1815 607-621.
- 1816 Tufail, M. A., Touceda-González, M., Pertot, I., & Ehlers, R.-u. (2021).
1817 *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 enhances plant robustness status under the
1818 combination of moderate drought and low nitrogen stress in *Zea mays* L. *Microorganisms*, 9(4),
1819 870.
- 1820 Ullah, F., Ali, S., Siraj, M., Akhtar, M. S., & Zaman, W. (2025). Plant Microbiomes
1821 Alleviate Abiotic Stress-Associated Damage in Crops and Enhance Climate-Resilient
1822 Agriculture. *Plants*, 14(12), 1890.
- 1823 Vainonen, J. P., Gossens, R., Krasensky-Wrzaczek, J., De Masi, R., Danciu, I.,
1824 Puukko, T., ... & Kangasjärvi, J. (2023). Poly (ADP-ribose)-binding protein RCD1 is a plant
1825 PARylation reader regulated by Photoregulatory Protein Kinases. *Communications Biology*,
1826 6(1), 429.
- 1827 Verma, S. K., Kingsley, K., Irizarry, I., Bergen, M., Kharwar, R. N., & White Jr, J. F.
1828 (2017). Seed-vectored endophytic bacteria modulate development of rice seedlings. *Journal*
1829 *of Applied Microbiology*, 122(6), 1680-1691.
- 1830 Vishwakarma, K., Kumar, N., Shandilya, C., Mohapatra, S., Bhayana, S., & Varma, A.
1831 (2020). Revisiting plant–microbe interactions and microbial consortia application for enhancing
1832 sustainable agriculture: a review. *Frontiers in Microbiology*, 11, 560406.
- 1833 Wahid, F., Fahad, S., Danish, S., Adnan, M., Yue, Z., Saud, S., ... & Datta, R. (2020).
1834 Sustainable management with mycorrhizae and phosphate solubilizing bacteria for enhanced
1835 phosphorus uptake in calcareous soils. *Agriculture*, 10(8), 334.
- 1836 Wang, S., Na, X., Yang, L., Liang, C., He, L., Jin, J., ... & Bi, Y. (2021). *Bacillus*
1837 *megaterium* strain WW1211 promotes plant growth and lateral root initiation via regulation of
1838 auxin biosynthesis and redistribution. *Plant and Soil*, 466(1), 491-504.

1839 Wang, S., Wang, Y., Liu, H., Li, X., Zhao, J., Dong, Z., ... & Shao, T. (2022). Using
1840 PICRUSt2 to explore the functional potential of bacterial community in alfalfa silage harvested
1841 at different growth stages. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 9(1), 98.

1842 Wani, S. H., Samantara, K., Razzaq, A., Kakani, G., & Kumar, P. (2022). Back to the
1843 wild: mining maize (*Zea mays* L.) disease resistance using advanced breeding tools. *Molecular*
1844 *Biology Reports*, 49(6), 5787-5803.

1845 Waqas, M. A., Wang, X., Zafar, S. A., Noor, M. A., Hussain, H. A., Azher Nawaz, M., &
1846 Farooq, M. (2021). Thermal stresses in maize: effects and management strategies. *Plants*,
1847 10(2), 293.

1848 Ware, I. M., Van Nuland, M. E., Schweitzer, J. A., Bailey, J. K., & Gehring, C. A. (2021).
1849 Climate-driven divergence in plant–microbiome interactions influences phenology.
1850 *Communications Biology*, 4(1), 841.

1851 Wolfgang, A., Zachow, C., Müller, H., Grand, A., Temme, N., Tilcher, R., & Berg, G.
1852 (2020). Understanding the impact of cultivar, seed origin, and substrate on bacterial diversity
1853 of the sugar beet rhizosphere and suppression of soil-borne pathogens. *Frontiers in Plant*
1854 *Science*, 11, 560869.

1855 Yang, C., Mai, J., Cao, X., Burberry, A., Cominelli, F., Zhang, L., Liu, Q., Xu, L., Ma, J.,
1856 Zhang, M., Jiang, X., & Ma, A. (2023). ggpicrust2: An R package for PICRUSt2 predicted
1857 functional profile analysis and visualization. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1186684.

1858 Zhang, M., Kong, D., & Wang, H. (2023a). Genomic landscape of maize domestication
1859 and breeding improvement. *Seed Biology*, 2(1).

1860 Zhang, J., Liu, W., Bu, J., Lin, Y., & Bai, Y. (2023b). Host genetics regulate the plant
1861 microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, 72, 102268.

1862

1863

1864

1865

1866

1867

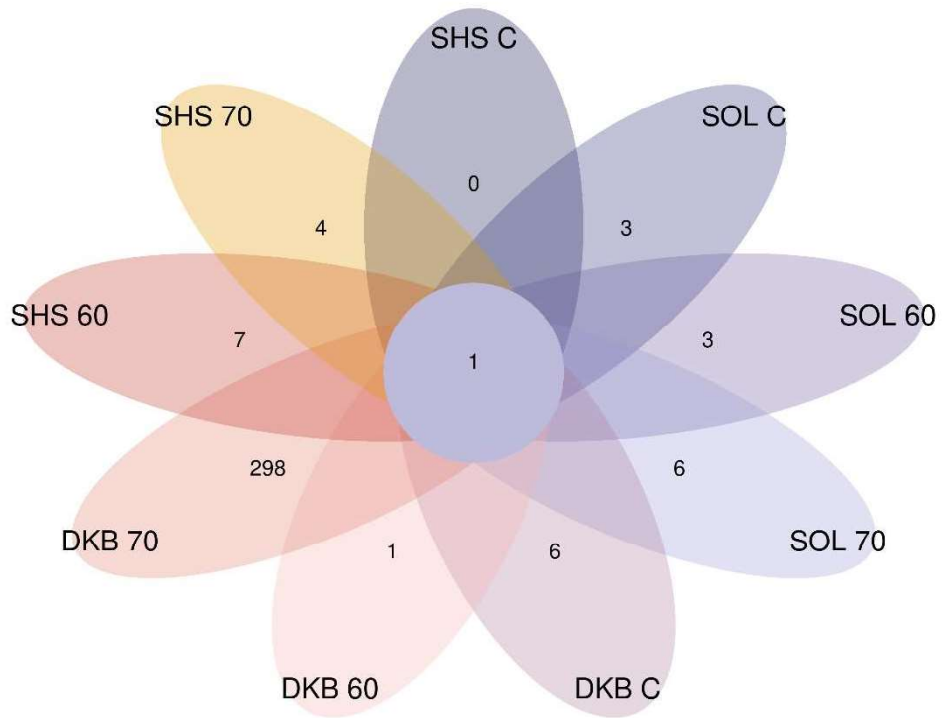
1868

1869

1870

APÊNDICES

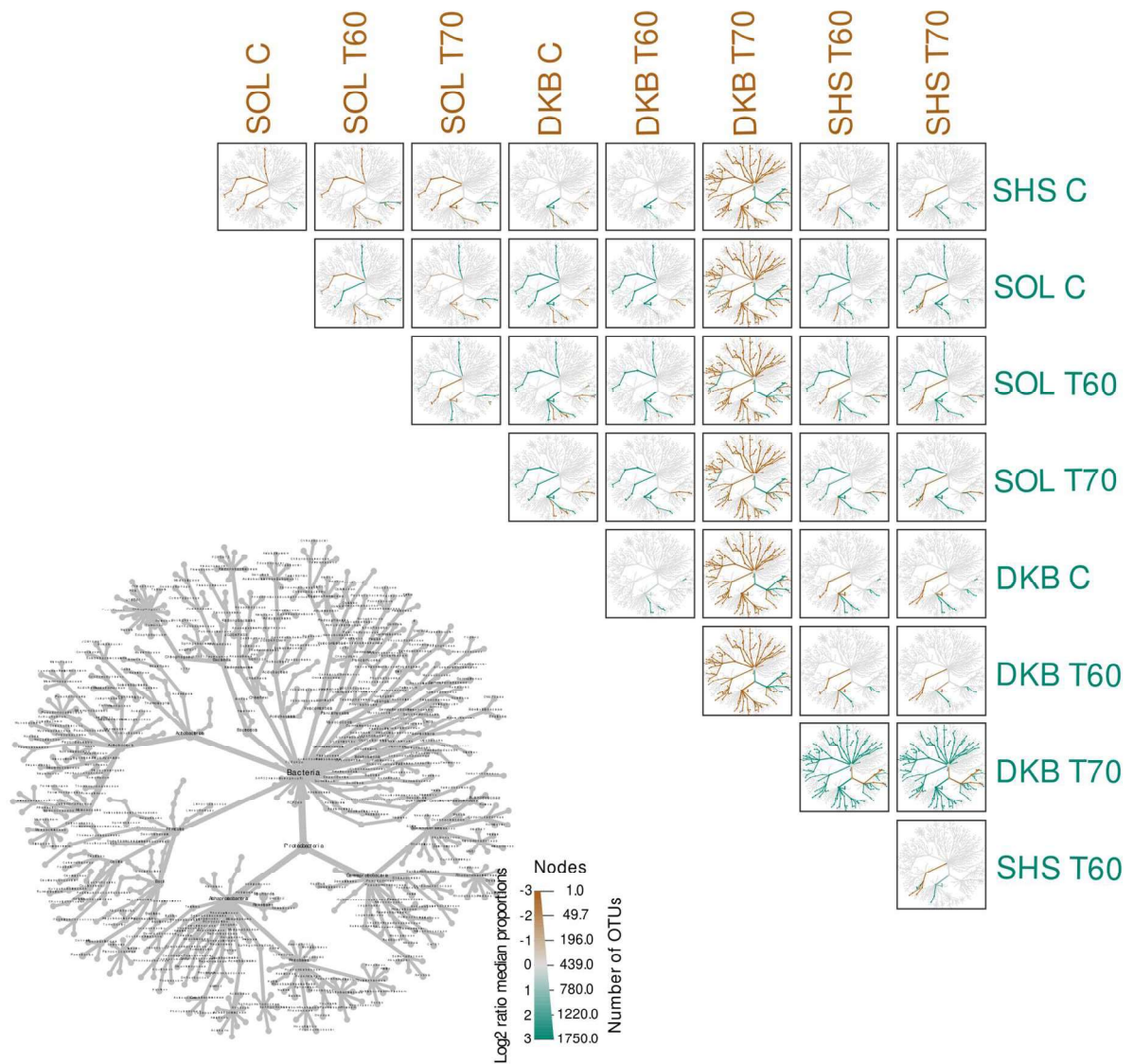
1871



1872

1873 **Figura S1.** Gráfico de pétalas comparando todos os tratamentos e todas as cultivares testadas
1874 neste trabalho em relação ao número de ASVs exclusivas e compartilhadas.

1875



1876

1877 **Figura S2.** Matriz de *heat tree* para todas as comparações pareadas entre genótipos e
 1878 tratamentos. Os ramos marrons ou azuis são estatisticamente significativos para o respectivo
 1879 tratamento indicado pelas legendas marrons ou azuis.

1880

1881

1882

1883

1884

1885
1886
1887

Tabela S1. Fontes de carbono da Biolog EcoPlate™ com seus respectivos grupos funcionais e posições na placa de 96 poços, incluindo o controle (água), segundo o catálogo do fabricante (Catalog No. 1506).

Grupo funcional	Fonte de carbono	Posição na placa
Amina	Putrescina	H4, H8, H12
	Feniletilamina	G4, G8, G12
Aminoácidos	L-Asparagina	B4, B8, B12
	L-Treonina	E4, E8, E12
	L-Fenilalanina	C4, C8, C12
	L-Serina	D4, D8, D12
	L-Arginina	A4, A8, A12
	Ácido β-hidroxi-glicil-L-glutâmico	F4, F8, F12
Carboidratos	β-Metil-D-glicosídeo	A2, A6, A10
	Ácido D-galactônico γ-lactona	A3, A7, A11
	D-Xilose	B2, B6, B10
	i-Eritritol	C2, C6, C10
	D-Manitol	D2, D6, D10
	N-Acetil-D-glicosamina	E2, E6, E10
	D-Celobiose	G1, G5, G9
	Glicose-1-fosfato	G2, G6, G10
	α-D-Lactose	H1, H5, H9
	D,L-α-Glicerol-fosfato	H2, H6, H10
	Ácido D-málico	H3, H7, H11
Ácidos Carboxílicos	Éster metílico do ácido pirúvico	B1, B5, B9
	Ácido D-galacturônico	B3, B7, B11
	Ácido γ-aminobutírico (GABA)	E3, E7, E11
	Ácido D-glicosamínico	F2, F6, F10
	Ácido itacônico	F3, F7, F11
	Ácido α-cetobutírico	G3, G7, G11
Fenóis	Ácido 2-hidroxibenzóico	C3, C7, C11
	Ácido 4-hidroxibenzóico	D3, D7, D11

Polímeros	Tween 40	C1, C5, C9
	Tween 80	D1, D5, D9
	α -Ciclodextrina	E1, E5, E9
	Glicogênio	F1, F5, F9
Água		A1, A5, A9

1888

1889 **Tabela S2.** Primers desenhados com base em sequências depositadas no banco de dados
 1890 GenBank e sintetizados pela empresa Exxtend Biotechnology.
 1891

Sigla	Produto do gene	Acesso	Sequência do primer (5'-3')
<i>Giber</i>	Gibberellin-regulated protein	NM_001301603.1	F: GCACCTACGGCAACAAGAAC R: GAGAGGGAGGGCTACTAGGG
<i>Early</i>	Early responsive to dehydration protein	NM_001114650.2	F: CTATCCCTACCAACAAATCAGC R: CACAGCCTCATACTTTTCTCAG
<i>Gid</i>	Gibberellin receptor GID1L2	NM_001156762.2	F: TCGAGCTGTTTCGAGTCTAAGG R: ACGATCCGCTCCTGTAGTG
<i>Indol</i>	Indole-3-acetaldehyde oxidase	NP_001105309.2	F: GAACACTGCAACCATAGGTG R: AGTGAAGCACAGCCTTTTG
<i>Srox</i>	SOD Superoxide dismutase [Cu-Zn]	NM_001320832.1	F: CCTGAACATTCGGAGACATC R: TTCAGTCCATCGGTTGCTAC
<i>Aqua</i>	Aquaporin pip1-5	NM_001111661.1	F: CATCTGCTATTGTTTCGTCATA R: GCGAGAGAGAACTAAACAGAG

1892