

**O MICROBIOMA RESIDENTE DO MILHO E SEU POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO**

SARAH HENAUT JACOBS

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JANEIRO - 2023**

O MICROBIOMA RESIDENTE DO MILHO E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

SARAH HENAUT JACOBS

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Orientador: Dr. Thiago Motta Venancio

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
JANEIRO - 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

J17

Jacobs, Sarah Henaut.

O microbioma residente do milho e seu potencial biotecnológico / Sarah Henaut Jacobs. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

35 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.

Orientador: Thiago Motta Venancio.

1. Bioinformática. 2. Microbioma nativo. 3. Metagenômica. 4. PGPB. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 660.6

SARAH HENAUT JACOBS

**O MICROBIOMA RESIDENTE DO MILHO E SEU POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia Vegetal.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2024

Banca Avaliadora:



Documento assinado digitalmente
THIAGO MOTTA VENANCIO
Data: 05/03/2024 14:22:31-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. Thiago Motta Venancio (UENF) - Orientador



Documento assinado digitalmente
ALESSANDRO DE MELLO VARANI
Data: 05/03/2024 15:36:15-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. Alessandro de Mello Varani (UNESP)



Documento assinado digitalmente
CAIO CEZAR GUEDES CORREIA
Data: 06/03/2024 16:40:24-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. Caio Cesar Guedes Corrêa (UENF)



Documento assinado digitalmente
VITOR BATISTA PINTO
Data: 07/03/2024 15:42:38-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. Vitor Batista Pinto (UENF)

Agradecimentos

Primeiramente aos meus pais, Renata e Adriano, por sempre confiarem em mim. Sei que irão apoiar todas as minhas decisões e que querem o meu melhor o tempo todo.

Ao meu orientador, Thiago Motta Venancio, por, não apenas me guiar cientificamente e ajudar a realizar meu projeto, mas por contribuir no meu crescimento profissional.

Aos meus colegas de laboratório, principalmente ao Francisnei, à Dayana e à Kevelin, por contribuírem com várias discussões científicas além de fazerem meus dias um pouco mais felizes.

Aos colaboradores de fora do laboratório Fábio, Beatriz e Samuel, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

Aos muitos amigos que estiveram ao meu lado sempre que precisei, fosse pra reclamar ou pra distrair.

Às minhas nenéns Lady, Fiona, Amora e Lisa por serem o apoio emocional que eu preciso quando nenhum ser humano pode ser.

Sumário

Resumo	7
Introdução geral	8
Revisão bibliográfica	9
A importância da biotecnologia na crise alimentar	9
O bacterioma recrutado do solo e o uso de inoculantes	11
O microbioma residente	12
A metagenômica e as perspectivas futuras para o estudo de microbioma	13
Bibliografia	15
Comparative metagenomic profiling of seed-borne microbiomes in a landrace and a hybrid maize variety	21
Abstract	21
Introduction	21
Methods	22
Maize varieties	22
Planting	23
16S and metagenomic sequencing	23
Metagenome-Assembled Genomes (MAGs)	23
Results and discussion	24
The sequenced seed-borne microbiome is virtually free from soil DNA contamination	24
Metagenomics sequencing depth satisfactorily captured sample diversity	24
The hybrid maize genotype harbors a homogeneous seed-borne bacteriome	25
The seed-borne microbiome harbors multiple phosphate solubilization genes but is likely unable to fix nitrogen	27
Seed-borne microbiome may affect phytohormone production	28
Metagenome-assembled genomes (MAGs)	29
Concluding remarks	30
Data availability	30
Supplementary tables	30
Conclusão geral	37

Resumo

O avanço das tecnologias de sequenciamento de DNA e das metodologias de análise genômica têm sido fundamentais no estudo de microbiomas. A compreensão das interações entre microrganismos e plantas sempre foi uma questão central na biotecnologia. Sabe-se que o microbioma das plantas é uma combinação complexa de microrganismos com origens diversas, sendo uma delas a herança vertical da planta-mãe. Essa parcela do microbioma, denominada microbioma residente ou nativo, desempenha um papel fundamental no desenvolvimento inicial da planta e tem sua composição influenciada por diversos fatores. Aprofundar o conhecimento sobre o microbioma residente tem o potencial de guiar o desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas para a agricultura. Neste trabalho, realizamos uma análise comparativa dos bacteriomas residentes de uma variedade híbrida e outra semi-domesticada de milho. Nossos resultados demonstram que o microbioma residente da variedade semi-domesticada é mais diverso e heterogêneo do que aquele da variedade híbrida. O perfil funcional dos microbiomas também se mostrou mais abrangente na variedade semi-domesticada, demonstrando maior potencial para produção de fitormônios. Também encontramos 18 Genomas Metagenome-assembled genomes (MAGs), quatro pertencentes a potenciais novas espécies. Em última análise, esse tipo de pesquisa pode contribuir para o desenvolvimento metodologias biotecnológicas de manipulação do microbioma.

Introdução geral

As interações entre microrganismos e plantas desempenham um papel fundamental na ecologia e na saúde dos ecossistemas. Essas relações podem ser categorizadas em três principais tipos: comensalismo, parasitismo e mutualismo. No comensalismo, alguns microrganismos podem, por exemplo, habitar a superfície das plantas, obtendo abrigo e nutrientes sem causar danos significativos. Nestas relações, é possível citar fitopatógenos ¹, microrganismos, como bactérias e micorrizas em parcerias simbióticas com as plantas ², resistência a patógenos e adaptação a condições adversas. Assim, a simbiose e a cooperação entre plantas e microrganismos são elementos-chave na ecologia vegetal, promovendo a sustentabilidade e a produtividade das plantas em ecossistemas diversos. Dando destaque às bactérias benéficas, temos as bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPBs) que atuam diretamente no crescimento da planta através de uma série de mecanismos (e.g. a solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e biocontrole de potenciais patógenos) ³.

O milho, *Zea mays* L. é um modelo altamente relevante para investigações relacionadas às interações microrganismo-planta, especialmente no contexto agrícola. O milho é a segunda *commodity* agrícola mais produzida globalmente, correspondendo a uma produção anual superior a 1 bilhão de toneladas ⁴, refletindo sua posição estratégica na segurança alimentar. Além disso, o milho é objeto de atenção em várias áreas da biotecnologia, onde esforços têm sido direcionados no desenvolvimento de variedades adaptadas a uma ampla gama de condições ambientais ^{5,6}. A importância do milho como cultura agrícola reside não apenas em sua produção em larga escala, mas também em sua história de domesticação, que resultou em variedades com características bem definidas e conhecidas ^{7,8}. A combinação de importância econômica, facilidade de cultivo e conhecimento acumulado sobre suas características genéticas e fisiológicas, faz do milho um modelo para o estudo das interações microrganismo-planta.

Revisão bibliográfica

A importância da biotecnologia na crise alimentar

Estima-se que a população mundial atingirá aproximadamente 9,7 bilhões de indivíduos até 2050 ¹. Esse número representa um aumento de quase 25% em comparação com os atuais 7,9 bilhões. Embora geograficamente desigual, o crescimento populacional é um fenômeno global e contínuo. Neste cenário, a disponibilidade de recursos passa a ser um tópico de muita discussão. Utilizando o milho como referência no cenário nacional, em 2023, 39,4% da oferta total da commodity foram destinados ao setor pecuário, enquanto cerca de 36,9% foram exportados, 12,3% utilizados na indústria e apenas 1,9% diretamente utilizados no consumo humano direto. Outros destinos incluem estoque para o próximo ano (5,4%), outros usos (2,6%), perdas (1,4%) e seleção de sementes (0,1%) (Abimilho, 2023). Assim, tanto o milho quanto outras *commodities* produzidas em larga escala (soja, arroz e feijão por exemplo), precisam ter sua produção aumentada de acordo com sua demanda. Neste cenário, previsões otimistas já sugerem um aumento de quase a metade da demanda alimentícia atual até 2050 ², enfatizando a importância do planejamento e gestão sustentável dos recursos naturais para garantir a segurança alimentar e o bem-estar da população global. Além disso, o aumento de área de produção agrícola não é uma opção viável nesta escala, com o aumento de rendimento sendo a alternativa ideal para alcançar tal demanda ³.

Outro aspecto importante é a má distribuição de recursos no contexto da segurança alimentar. Quando observamos a quantidade de alimentos produzidos em comparação àquela necessária para atender à população global, percebemos que a insegurança alimentar não se restringe à produção, mas está também intimamente relacionada ao acesso à alimentação adequada ^{4,5}. Mais uma vez, o aumento da produção de *commodities* leva a uma redução dos preços, o que torna os alimentos mais acessíveis para as camadas de baixa renda da sociedade. É importante ressaltar que apenas o aumento da produção alimentar não representa uma solução abrangente para a garantia da segurança alimentar universal. Desde 1990, temos observado um aumento da produção de alimentos *per capita*, mesmo sem uma correspondente diminuição do número de pessoas em condição de desnutrição ⁶. Entretanto, é importante notar que a melhoria na qualidade da produção em larga escala viabiliza a disponibilidade de alimentos seguros e nutritivos, especialmente em países em desenvolvimento ⁷. Uma prática sustentável em larga escala de produção de alimentos traria impactos positivos diretos para um grande contingente populacional, ampliando significativamente a disponibilidade de recursos alimentares para aqueles que deles necessitam.

Um dos principais desafios biotecnológicos da atualidade é: como aumentar de forma sustentável a produção de alimentos? Muitas técnicas de manejo que comprovadamente aumentam a produção trazem efeitos negativos que podem ser

irreversíveis ^{8,9}. Práticas convencionais, como por exemplo a utilização de defensivos e fertilizantes químicos podem contaminar o solo e as águas subterrâneas. Um estudo conduzido por Grondona *et al.* na região do Caribe e América do Sul identificou mais de 70 pesticidas em águas subterrâneas ¹⁰. O glifosato, herbicida amplamente utilizado, tem sido associado a câncer em seres humanos ¹¹. Além disso, devido à sua forma de ação, pesticidas têm efeito sobre insetos polinizadores ¹². Tais efeitos negativos não compensam o aumento da produção agrícola quando analisado em um contexto global e de longo prazo. Ademais, o aumento da produção bruta das plantas acarreta em dois fatores: em primeiro lugar, há a necessidade de expansão da área de cultivo, frequentemente atrelada ao desmatamento ^{13,14}; Em segundo lugar, o aumento do consumo de água associado a essa expansão agrícola acentua as já prementes preocupações quanto à disponibilidade de recursos hídricos ¹⁵.

Portanto, cresce a necessidade de abordagens biotecnológicas que maximizem a produção agrícola para atender às demandas alimentares da população. Muitas abordagens surgiram como alternativas mais seguras para aumentar a produção de alimentos evitando outros tipos de danos. Como por exemplo no uso de sistemas agrícolas de precisão, como sensores e tecnologias para aplicação de insumos que reduzem o contato de produtos químicos com o solo ¹⁶. A adoção de práticas agroecológicas, que empregam adubos naturais e controles biológicos em substituição a aditivos químicos, também emerge como um passo fundamental ^{17,18}. Paralelamente, os avanços na pesquisa agrícola têm possibilitado inovações no manejo, como o emprego de sistemas de gotejamento, que reduzem o desperdício de água e a lixiviação ¹⁹. Uma área que tem ganhado destaque em pesquisas biotecnológicas é a manipulação do microbioma das plantas, utilizando microrganismos promotores de crescimento vegetal para maximizar a produção ²⁰. Além disso, a incorporação de princípios da agricultura de baixa emissão de carbono também é crucial para enfrentar os desafios ambientais associados à agricultura intensiva ²¹. A implementação de práticas que visam a redução das emissões de gases de efeito estufa, como o manejo sustentável do solo e a integração de sistemas agrícolas, complementa essas inovações biotecnológicas, promovendo uma abordagem mais holística e sustentável na produção de alimentos.

Inúmeros estudos têm corroborado os efeitos benéficos da manipulação do microbioma de plantas. O uso de inoculantes surgiu na década de 1890, quando Beijerinck observou que poderia substituir fertilizantes nitrogenados por bactérias específicas que aumentavam a capacidade de fixação de nitrogênio em leguminosas. Em 1896, Nobbe e Hiltner utilizaram este estudo para desenvolver a patente do primeiro inoculante ²². Inoculantes podem ter efeitos no enraizamento de uma planta, em seu tamanho e massa ²³. Ademais, a introdução de microrganismos específicos não apenas estimula o crescimento vegetal, mas também pode conferir proteção contra patógenos potencialmente prejudiciais. *Bacillus subtilis*, por exemplo, é um microrganismo que apresenta mecanismos diretos e indiretos de biocontrole, os quais têm demonstrado eficácia na inibição de fungos pertencentes aos gêneros *Fusarium* e *Rosellinia*, bem como em combate a diversas bactérias

fitopatogênicas ²⁴. *Bacillus thuringiensis* também é um bioinseticida com funções bem conhecidas e uso consolidado, sendo popularmente chamado de BT ²⁵. Gêneros bacterianos como *Pseudomonas* também apresentam diversas formas de biocontrole e aplicações contra fungos ^{26,27}. Essas ações conferem um componente de resistência às plantas, minimizando o risco de infestações e doenças, o que pode contribuir significativamente para a produtividade e sustentabilidade dos sistemas agrícolas.

O microbioma vegetal é muito dinâmico e diverso, sendo essencialmente dividido em duas parcelas. A primeira fração é adquirida a partir do solo em que a planta cresce, dependendo da disponibilidade de microrganismos presentes no substrato. A segunda fração, denominada microbioma residente ou nativo, é transmitida pela planta mãe e caracteriza-se pelos microrganismos que são herdados durante a formação da semente. Já se demonstrou que o microbioma residente desempenha um papel particularmente benéfico no desenvolvimento inicial da semente ²⁸. Isso pode acontecer tanto através da facilitação da aquisição de nutrientes, quanto na proteção contra potenciais patógenos.

O bacterioma recrutado do solo e o uso de inoculantes

A modelagem do microbioma de uma planta não se restringe apenas à modificação direta, mas envolve também fatores ambientais e práticas de manejo ^{20,29}. Por exemplo, solos com características como alta argilosidade, compactação e escassez de nutrientes tendem a hospedar uma microbiota mais empobrecida e menos diversificada se comparados a solos bem adubados e aerados ^{30,31}. Portanto, a adaptação do microbioma às condições ambientais é uma resposta natural e pode impactar diretamente a saúde e o desenvolvimento das plantas. Isso ressalta a complexidade das interações entre as plantas, seu microbioma e o ambiente, bem como a necessidade de considerar tais interações ao implementar estratégias de manejo agrícola e biotecnológico que visem otimizar a produção de alimentos e a sustentabilidade dos sistemas agrícolas.

A adoção de inoculantes em plantações, especialmente aquelas destinadas ao cultivo de importantes *commodities* agrícolas como soja, milho e feijão, tem se revelado uma estratégia eficaz para aumentar a produtividade ³²⁻³⁴. Esses inoculantes introduzem deliberadamente na planta uma seleção de microrganismos benéficos, previamente escolhidos, com potencial de melhorar sua produção sem a necessidade de adição de fertilizantes químicos com efeitos colaterais ao ambiente. No entanto, a ampla adoção dessa prática enfrenta desafios, incluindo barreiras culturais e tecnológicas, como a produção em larga escala destas metodologias. Além disso, existe uma crescente demanda de inoculantes resistentes a episódios de estresse ambiental, como elevação de temperaturas e longas temporadas de seca ^{22,35}.

É evidente que o conhecimento sobre os benefícios dos bioinoculantes e a capacidade de utilizá-los de maneira eficiente são aspectos fundamentais para a plena integração dessa inovação na agricultura. À medida que novas formas de aplicação facilitada de inoculantes surgem, sua implementação efetiva pode se tornar uma prática comum, impulsionando a agricultura em direção a padrões mais produtivos e sustentáveis, alinhados com a atual dinâmica do setor.

O microbioma residente

O microbioma residente, também conhecido como microbioma nativo ou referido como "*seed-borne*" em termos em inglês, é adquirido pela planta durante seu desenvolvimento e estabelecido na semente antes desta entrar em contato com o solo. Durante o desenvolvimento, parte do microbioma da planta-mãe é incorporado na semente, resultando na estabilização de uma microbiota desde o momento inicial de vida das plantas. Pesquisas demonstraram que o microbioma residente desempenha um papel significativo na composição do microbioma da planta adulta, contribuindo com funções benéficas para o crescimento da planta e controle de fitopatógenos ³⁶⁻³⁸. Portanto, considerando que as plantas estão expostas a uma ampla diversidade de microrganismos presentes no solo, é razoável inferir que o método de seleção de microrganismos para serem transmitidos às sementes é, em sua maioria, benéfico. Essa seleção de microrganismos pelo microbioma residente tem implicações importantes para a saúde e o crescimento das plantas. Embora já seja conhecida a presença de fatores determinísticos na seleção do microbioma residente em culturas de arroz ³⁹, isso é, variedades diferentes divergem significativamente em microbioma residente, a compreensão completa dos mecanismos subjacentes a essa seleção ainda é desafiadora. Estudos do microbioma do milho ao longo dos anos também mostraram uma variação significativa entre acessos de milho ancestrais e modernos ⁴⁰.

Focando no bacterioma residente, já foi demonstrado que algumas cepas podem desempenhar diversas funções benéficas para o crescimento das plantas, como solubilização de fósforo ³⁷, fixação de nitrogênio ⁴¹ e produção de metabólitos secundários com potencial de biocontrole ⁴². Portanto, conhecer o microbioma residente é essencial para desenvolver microbiomas sintéticos para aplicação agrícola

No entanto, um dos maiores desafios na pesquisa do microbioma residente é identificar sua totalidade. Muitas das bactérias que compõem o microbioma residente não podem ser cultivadas em laboratório, dificultando investigações mais detalhadas ⁴³. À medida que a pesquisa continua a explorar o microbioma residente e suas implicações na agricultura, a combinação de novas tecnologias oferece um potencial significativo para compreender melhor quem são essas bactérias e o que elas são capazes de fazer. Isso pode levar a avanços na agricultura sustentável, na melhoria da saúde das plantas e na resiliência aos desafios ambientais.

A metagenômica e as perspectivas futuras para o estudo de microbioma

A vida terrestre é classificada em três principais domínios: Archaea, Bacteria e Eukarya. Dentre esses domínios, as bactérias exibem a maior diversidade ⁴⁴. Bactérias colonizam praticamente todos os ambientes. No entanto, uma parcela significativa dessas bactérias é considerada não cultivável ⁴⁵. Esse fenômeno resulta na chamada “matéria escura” microbiana ⁴⁶ que se refere ao desconhecimento sobre as características ou até mesmo a existência de determinados microrganismos devido à dificuldade em cultivá-los em laboratório. A matéria negra microbiana representa um desafio significativo para a microbiologia, uma vez que limita nosso entendimento sobre a diversidade microbiana e o papel dos microrganismos em ecossistemas naturais. Embora não cultiváveis em condições tradicionais, essas bactérias desempenham papéis ecológicos importantes e podem ter relevância em áreas como ciclagem de nutrientes, degradação de compostos orgânicos e resposta a mudanças ambientais.

Com os avanços nas metodologias de sequenciamento, a produção e exploração de dados genômicos têm atingido níveis sem precedentes ⁴⁷. Um dos desenvolvimentos mais significativos que surgiram a partir desses avanços é a metagenômica, que envolve o estudo da diversidade genômica dos microrganismos em seu ambiente natural, sem a necessidade de cultivo ⁴⁸. Portanto, a metagenômica permite analisar todo o material genético em uma amostra de qualquer origem, inclusive de amostras ambientais complexas, como solos, sedimentos aquáticos, microbiomas humanos e até mesmo ambientes extremos ⁴⁹. A metagenômica viabiliza o estudo de características genéticas e funcionais de comunidades de microrganismos amplamente desconhecidas até poucos anos. Além disso, essa tecnologia possibilita caracterizar o potencial funcional de um microbioma, revelando informações sobre as capacidades metabólicas e os processos biológicos que podem ser desempenhados pelos microrganismos presentes na amostra.

A aplicação da metagenômica na pesquisa de microrganismos promotores de crescimento vegetal oferece uma abordagem poderosa para identificar microrganismos benéficos para as plantas, mesmo quando eles não podem ser cultivados em laboratório. Por meio de estudos metagenômicos, é possível não apenas identificar candidatos a microrganismos promotores de crescimento vegetal, mas também descobrir genes específicos que podem ser usados para aumentar os efeitos benéficos de outros microrganismos ⁵⁰. Estas análises permitem também estudar a diversidade, co-ocorrência e a associação de microrganismos à resistência a fatores ambientais ⁵¹. Essa informação é essencial para entender como os microrganismos podem desempenhar um papel na proteção das plantas contra patógenos, mudanças climáticas e poluentes do solo.

A integração entre estudos metagenômicos com análises computacionais sofisticadas pode abrir um leque de aplicações biotecnológicas inovadoras, sendo a

engenharia de microbiomas uma das mais promissoras ⁵². No entanto, é importante reconhecer que ainda há enormes desafios científicos, de biossegurança e regulatórios envolvidos. Além disso, a implementação de tais tecnologias pode ser custosa, levantando questões sobre acessibilidade e viabilidade econômica. Ainda assim, a perspectiva de engenheirar microbiomas com base em dados de metagenômica tem o potencial de revolucionar o uso de microrganismos promotores de crescimento vegetal e o desenvolvimento de soluções mais eficazes e personalizadas para o aumento da produtividade de cultivos agrícolas, a promoção de práticas de manejo sustentáveis e a adaptação a mudanças ambientais.

Bibliografia

1. United Nations Publications. *World Population Prospects 2019: Highlights*. (2019).
2. Cleland, J. World population growth; Past, present and future. *Environ. Resour. Econ.* **55**, 543–554 (2013).
3. Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C. & Foley, J. A. Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLoS One* **8**, e66428 (2013).
4. Sen, A. *Poverty and Famines: An Essay on Entitlement and Deprivation*. (OUP Oxford, 1983).
5. Purvis, B., Mao, Y. & Robinson, D. Three pillars of sustainability: in search of conceptual origins. *Sustainability Sci.* **14**, 681–695 (2019).
6. Barrett, C. B. Measuring food insecurity. *Science* **327**, 825–828 (2010).
7. Hu, H.-W., Chen, Q.-L. & He, J.-Z. The end of hunger: fertilizers, microbes and plant productivity. *Microb. Biotechnol.* **15**, 1050–1054 (2022).
8. Rani, L. *et al.* An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *J. Clean. Prod.* **283**, 124657 (2021).
9. Parra-Arroyo, L. *et al.* Highly hazardous pesticides and related pollutants: Toxicological, regulatory, and analytical aspects. *Sci. Total Environ.* **807**, 151879 (2022).
10. Grondona, S. I., Lima, M. L., Massone, H. E. & Miglioranza, K. S. B. Pesticides in aquifers from Latin America and the Caribbean. *Sci. Total Environ.* **901**, 165992 (2023).
11. de Araujo, L. G., Zordan, D. F., Celzard, A. & Fierro, V. Glyphosate uses, adverse effects and alternatives: focus on the current scenario in Brazil. *Environ. Geochem. Health* (2023) doi:10.1007/s10653-023-01763-w.

12. Ndakidemi, B., Mtei, K. & Ndakidemi, P. A. Impacts of synthetic and botanical pesticides on beneficial insects. *Agric. Sci. China* **07**, 364–372 (2016).
13. Acheampong, E. O., Macgregor, C. J., Sloan, S. & Sayer, J. Deforestation is driven by agricultural expansion in Ghana's forest reserves. *Scientific African* **5**, e00146 (2019).
14. Armenteras, D., Rodríguez, N. & Retana, J. Landscape dynamics in northwestern Amazonia: an assessment of pastures, fire and illicit crops as drivers of tropical deforestation. *PLoS One* **8**, e54310 (2013).
15. Kang, Y., Khan, S. & Ma, X. Climate change impacts on crop yield, crop water productivity and food security – A review. *Prog. Nat. Sci.* **19**, 1665–1674 (2009).
16. Zhang, Q. *Precision agriculture technology for crop farming*. (CRC Press, 2021). doi:10.1201/b19336.
17. Lim, L. C. *Agroecology for Sustainable Food Systems*. (2018).
18. Tomich, T. P. *et al.* Agroecology: A review from a global-change perspective. *Annu. Rev. Environ. Resour.* **36**, 193–222 (2011).
19. C. M. Burt & B. Isbell. Leaching of accumulated soil salinity under drip irrigation. *Trans. ASAE* **48**, 2115–2121 (2005).
20. Dastogeer, K. M. G., Tumpa, F. H., Sultana, A., Akter, M. A. & Chakraborty, A. Plant microbiome—an account of the factors that shape community composition and diversity. *Curr. Plant Biol.* **23**, 100161 (2020).
21. Gurgel, A. C. & Laurenzana, R. D. Desafios e oportunidades da agricultura brasileira de baixo carbono. (2016).
22. Santos, M. S., Nogueira, M. A. & Hungria, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express* **9**, 205 (2019).

23. Trabelsi, D. & Mhamdi, R. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. *Biomed Res. Int.* **2013**, 863240 (2013).
24. Hashem, A., Tabassum, B. & Fathi Abd Allah, E. : A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi J. Biol. Sci.* **26**, 1291–1297 (2019).
25. Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T. & Christou, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol. J.* **9**, 283–300 (2011).
26. Thakkar, A. & Saraf, M. *Study of Pseudomonas as a Biocontrol Agent Against Fungal Pathogens*. (2016).
27. Bano, N. & Musarrat, J. Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Curr. Microbiol.* **46**, 324–328 (2003).
28. de Faria, M. R., Costa, L. S. A. S., Chiaramonte, J. B., Bettiol, W. & Mendes, R. The rhizosphere microbiome: functions, dynamics, and role in plant protection. *Trop. Plant Pathol.* **46**, 13–25 (2021).
29. Trivedi, P., Batista, B. D., Bazany, K. E. & Singh, B. K. Plant-microbiome interactions under a changing world: responses, consequences and perspectives. *New Phytol.* **234**, 1951–1959 (2022).
30. Wei, Z. *et al.* Initial soil microbiome composition and functioning predetermine future plant health. *Sci Adv* **5**, eaaw0759 (2019).
31. Zarraonaindia, I. *et al.* The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio* **6**, (2015).
32. de Souza, G. K. *et al.* Soybean inoculants in Brazil: an overview of quality control. *Braz. J. Microbiol.* **50**, 205–211 (2019).
33. Dubey, R. C. & Maheshwari, D. K. Role of PGPR in integrated nutrient

- management of oil seed crops. in *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management* 1–15 (Springer Berlin Heidelberg, 2011).
34. Kumar, B., Trivedi, P. & Pandey, A. *Pseudomonas corrugata*: A suitable bacterial inoculant for maize grown under rainfed conditions of Himalayan region. *Soil Biol. Biochem.* **39**, 3093–3100 (2007).
 35. Date, R. A. Advances in inoculant technology: a brief review. *Aust. J. Exp. Agric.* **41**, 321 (2001).
 36. Barret, M., Guimbaud, J.-F., Darrasse, A. & Jacques, M.-A. Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 791–795 (2016).
 37. Shao, J. *et al.* Rhizosphere microbiome assembly involves seed-borne bacteria in compensatory phosphate solubilization. *Soil Biol. Biochem.* **159**, 108273 (2021).
 38. Kim, J. *et al.* Culturable Endophytes Associated with Soybean Seeds and Their Potential for Suppressing Seed-Borne Pathogens. *Plant Pathol. J.* **38**, 313–322 (2022).
 39. Guo, J. *et al.* Seed-borne, endospheric and rhizospheric core microbiota as predictors of plant functional traits across rice cultivars are dominated by deterministic processes. *New Phytol.* **230**, 2047–2060 (2021).
 40. Wagner, M. R. *et al.* Microbe-dependent heterosis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, (2021).
 41. Bright, J. P. *et al.* Seed-borne probiotic yeasts foster plant growth and elicit health protection in black gram (*Vigna mungo* L.). *Sustain. Sci. Pract. Policy* **14**, 4618 (2022).
 42. Roy, S., Mili, C., Talukdar, R., Wary, S. & Tayung, K. Seed borne endophytic

- fungi associated with some indigenous rice varieties of North East India and their growth promotion and antifungal potential. *Indian J. Agric. Res.* (2020) doi:10.18805/ijare.a-5581.
43. Jiang, G. *et al.* Exploring rhizo-microbiome transplants as a tool for protective plant-microbiome manipulation. *ISME Commun.* **2**, (2022).
 44. Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6578–6583 (1998).
 45. Rappé, M. S. & Giovannoni, S. J. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 369–394 (2003).
 46. Robbins, R. J., Krishtalka, L. & Wooley, J. C. Advances in biodiversity: metagenomics and the unveiling of biological dark matter. *Stand. Genomic Sci.* **11**, 69 (2016).
 47. Levy, S. E. & Myers, R. M. Advancements in Next-Generation Sequencing. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **17**, 95–115 (2016).
 48. Garrido-Cardenas, J. A. & Manzano-Agugliaro, F. The metagenomics worldwide research. *Curr. Genet.* **63**, 819–829 (2017).
 49. Cowan, D. A., Ramond, J.-B., Makhalanyane, T. P. & De Maayer, P. Metagenomics of extreme environments. *Curr. Opin. Microbiol.* **25**, 97–102 (2015).
 50. Armanhi, J. S. L. *et al.* A Community-Based Culture Collection for Targeting Novel Plant Growth-Promoting Bacteria from the Sugarcane Microbiome. *Front. Plant Sci.* **8**, 2191 (2017).
 51. Ferreira, M. J. *et al.* The root microbiome of *Salicornia ramosissima* as a seedbank for plant-growth promoting halotolerant bacteria. *Appl. Sci.* **11**, 2233 (2021).

52. Hu, H. *et al.* Guided by the principles of microbiome engineering: Accomplishments and perspectives for environmental use. *mLife* **1**, 382–398 (2022).

Comparative metagenomic profiling of seed-borne microbiomes in a landrace and a hybrid maize variety

Henaut-Jacobs, S.^a; Cyríaco, B.E.B.^b; Pedrosa-Silva, F.^a; Olivares, F.L.^{b,*}; Venancio, T.M.^{a,*}

^a Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro 28013-602, Brazil.

^b Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro 28013-602, Brazil.

* Corresponding authors at Av. Alberto Lamego 2000, P5 sala 217; Parque California, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil.

E-mail addresses: tmvenancio@uenf.br; fabioliv@uenf.br

Abstract

The plant seed-borne microbiome comprises microorganisms vertically inherited from the mother plant. This microbiome is often linked to early-life protection and seedling growth promotion. Here, we compare the seed-borne bacteriomes of a commercial hybrid and a landrace maize variety. The landrace variety displays a more diverse seed-borne microbiome, featuring a variety of taxa across samples. In contrast, the microbiome of the hybrid variety is less diverse and more uniform across samples. Although both microbiomes lack a functional nitrogen fixation apparatus, we found a remarkably distinct presence of genes associated with phytohormone production and phosphate solubilization, particularly in the landrace variety. In addition, we recovered 18 metagenome-assembled genomes (MAGs), including four from potentially novel species. Collectively, our results allow a better understanding of the contrasting diversity between maize varieties and open important perspectives for designing synthetic microbial communities for agroecosystems.

Introduction

When examining the intricate world of microscopic ecosystems, plants are dynamic habitats in their own right. Plants rely heavily on the microbial communities within and around them ¹, engaging in myriad complex interactions that can be beneficial, antagonistic, or neutral ². The plant bacteriome comprises bacteria acquired from the surrounding soil and those vertically transmitted during seed development. These vertically inherited bacteria comprise the resident or seed-borne microbiome. The seed-borne microbiome is often associated with seed-to-seedling growth transition and protection ³.

Factors such as plant genotype and environmental conditions can influence the plant microbiome composition and functions, emphasizing the dynamic nature of these bacterial communities ⁴. Different plant genotypes are likely to diverge in their seed-borne

microbiomes due to artificial selection and recruitment of other bacteria from the soil ⁵. In addition, neighboring plants ⁶ and long-term processes such as global warming ⁷ can influence a plant microbiome. Maize is a suitable model for studying seed-borne microbiomes. Besides its great economic relevance as the second most produced agricultural commodity in the world ⁸, maize has a well-documented evolutionary and domestication history, valuable germplasm collections, and other genetic resources ^{9,10}. Although previous works have shown a difference in microbiome composition between hybrid and landrace maize varieties ¹¹, the roles of seed-borne bacteria and their implications for plant development remain unclear. Considering the collective benefits of numerous seed-borne bacteria and the increasing adoption of microbial inoculants, a deeper understanding of seed-borne microbiomes could help develop more effective biological products for agroecosystems. With a rising emphasis on eco-friendly practices in sustainable agriculture, bioinoculants have been adopted over the last four decades, a market that grows at an annual rate of 10% worldwide ¹². Hence, by combining the effects of environmentally compatible inoculants and this knowledge, we can alter the “stage 0” of the seed microbiome, focusing on increased crop productivity and protection ³.

Currently, the most effective way to increase crop production is through the widespread use of chemical pesticides and fertilizers. However, this need for chemical inputs increases dependency on imported products that compromise the sovereignty of several countries for food, fiber, and energy production ^{13,14}. Furthermore, the intensive use of agrichemicals is also associated with groundwater contamination ¹⁵, human diseases ¹⁶, and death of pollinating insects ¹⁷. In this scenario, the adoption of sustainable practices based on plant growth-promoting bacteria (PGPB) bioproducts constitutes an attractive alternative ¹⁸. Typically, PGPB promotes plant growth through diverse mechanisms of action such as biofertilization, bioprotection, or biostimulation ¹⁹.

In the present work, we investigate the seed-borne bacteriomes of maize varieties derived from two distinct breeding strategies. We evaluated the microbiome of a commercial hybrid and a landrace maize variety, the latter originating from organic production in an agroforestry ecosystem. We analyzed the structure and diversity of these microbiomes, with particular emphasis on their differences and potential to promote plant growth.

Methods

Maize varieties

We used the “SHS 5050” double hybrid commercial variety (SH) and the “Sol da Manhã” landrace variety (SOL). SH is a hybrid variety obtained from a local Santa Helena retailer with production in northwest Minas Gerais - Brazil. This company works to improve maize yield and uniformity, dealing with a large-scale production area irrigated under a central pivot. The SOL variety was donated by the family of the agribusiness farmer Jamil Bráz Corinto to Prof. Samuel Kamphorst (UNILA, Brazil). This variety originated from agricultural growth corridors in Santo Antônio do Rio Verde, Goiás, Brazil. SOL was initially cultivated in indigenous lands and has been cultivated in agroforestry systems for over 15 years, a period during which it has undergone meticulous participatory mass selection. The cultivation of SOL is a collaborative effort supported by EMBRAPA and with involvement from the Movimento Camponês Popular (MCP).

Planting

We washed maize seeds from both varieties with sterile distilled water five times and soaked them for five hours to break dormancy and standardize germination. We carefully distributed the seeds into sterile 2 L glass jars filled with 700 g of Basaplant substrate sieved through a 2 mm mesh and previously autoclaved for four one-hour cycles. We irrigated the substrate with 250 mL of autoclaved distilled water and divided it into three distinct sectors, each containing 10 seeds. We sealed the glass jars with cotton to allow gas exchange while maintaining the seedlings under axenic conditions throughout the incubation period. We conducted the experiment in a BOD incubator, maintaining the temperature at 28°C “day” and 25°C “night”, following a 12-hour light/12-hour dark cycle for 7 days.

16S and metagenomic sequencing

We collected the rhizospheric soil and conducted DNA extraction using the DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. We sequenced the microbiome DNA libraries using an Illumina NextSeq instrument at NGS (Piracicaba, Brazil). We also sequenced a DNA sample from the autoclaved substrate to serve as a negative control (“C1”) for contamination in shotgun sequencing. The raw sequencing reads were submitted to NCBI SRA under the BioProject PRJNA1069023. For 16S rRNA sequencing, we used the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) followed by sequencing using the Sanger method.

We used QIIME2 v. 2023.5.1²⁰ to process 16S metataxonomic data and remove data from mitochondrial and chloroplast 16S rRNA. We used the SILVA database Release 138²¹ to infer taxonomic classification.

For metagenomics analysis, we used Bowtie2 v. 2.3.4.3²² and Samtools v. 1.9²³ to remove fragments of maize DNA. We then evaluated sequence quality using FastQC v. 0.12.1 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) and trimmed low-quality fragments using Trimmomatic v. 0.39²⁴. The taxonomic distribution of the reads was conducted with Kaiju v. 1.6.2²⁵.

We inferred the microbiome biotechnological potential using an in-house database of genes associated with different plant growth promotion traits (i.e. nitrogen fixation, phosphate solubilization, phytases, ACC deaminase, and auxin production) (Pedrosa-Silva, Henaut-Jacobs, Venancio, in preparation). We constructed this database by selecting genes widely known for their plant growth promotion capabilities. We included copies of each gene from every different genera that are available in UniProt. Predicted microbiome genes were screened using this database with Usearch²⁶ employing a 60% identity threshold.

Metagenome-Assembled Genomes (MAGs)

We used SPAdes v. 3.15.5²⁷ to make the metagenomics assembly using the “--meta” parameter. Assembly quality was inferred using QUAST v. 5.0.2²⁸ to help choose the best assembly parameters based on assembly metrics. We retained only contigs longer than 1750 base pairs. MAGs were binned with MetaBAT2 v. 2.2.15²⁹. We used the GTDB toolkit Release 08-RS214³⁰ to infer the taxonomy and BUSCO v. 5.4.2³¹ to assess the completeness and duplication levels of the MAGs. The redundancy between the MAGs was estimated with pyani v. 0.2.12 and their genes were predicted with Prokka v. 1.13³². We

adopted the MIMAG methodology ³³ and retained only non-redundant MAGs considered High-quality or Finished for submission to Genbank.

Results and discussion

Metagenomics sequencing depth satisfactorily captured sample diversity

We started the analysis with the C1 control sample, which had 1881 operational taxonomic units (OTUs) (Table S1, Table S2). Most of these OTUs are exclusive to C1, suggesting that they result from residual DNA from bacteria killed during sterilization. Conversely, the OTUs from SH and SOL are remarkably more abundant than those of C1, most likely because of living bacteria in these samples. These results support the observation that the DNA reads sequenced from the SH and SOL samples were indeed from the seed-borne bacterial communities, with virtually no soil DNA contamination.

To ensure the coverage of our data, we estimated the taxa per sample (Figure 1) and computed Good's coverage index for each sample (Table 1). These analyses demonstrate that our sequencing efforts achieved robust taxonomic coverage. At 10 million reads, we captured over 80% of the microbial diversity in both varieties. Notably, the Good's index is in line with the rarefaction curves, with only a slight variation where SH exhibits marginally lower Good's indexes in comparison to SOL. SH samples also exhibited a more delayed plateau phase (Figure 1), which is consistent with their greater number of singletons (Table 1) that probably originated from low-abundance bacteria that are unlikely to contribute significantly to the community structure. Nevertheless, we kept these singletons for downstream analysis because of the overall low bacterial DNA amounts in our samples.

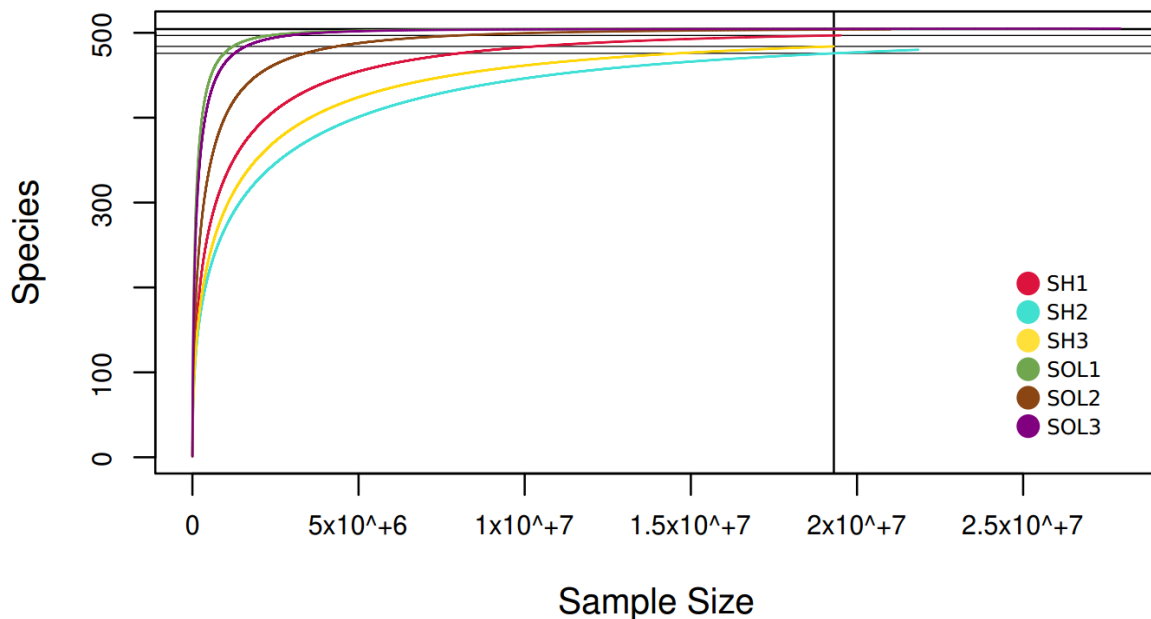


Figure 1: Saturation curve of OTUs found in each sample.

Table 1: Complete sample information with sample identification based on the Methods description (Santa Helena variety = SH; Sol da Manhã variety = SOL).

Sample	Variety	Number of OTUs in metagenomic data	Total read count	16S read count	Singletons	Good's index	Shannon's diversity index	Alpha diversity
SH1	SHS-5050	1741	17,853,454	40,046	123	99.99924	0.46	150.28
SH2	SHS-5050	1637	20,265,869	43,507	225	99.99879	0.44	138.62
SH3	SHS-5050	1670	17,844,958	41,191	209	99.99872	0.45	143.42
SOL1	Sol da Manhã	1899	18,881,650	41,568	40	99.99963	1.56	172
SOL2	Sol da Manhã	1821	18,250,328	41,631	69	99.99955	0.82	158.52
SOL3	Sol da Manhã	1888	20,837,848	37,682	38	99.99972	0.99	166.88

The hybrid maize genotype harbors a homogeneous seed-borne bacteriome

We sequenced 124,744 and 120,881 16S rRNA partial gene sequences in SH and SOL samples, respectively (Table 1). In our 16S metataxonomic data, we observed a substantial abundance of the Burkholderiaceae family in SH and SOL, mainly from the *Burkholderia* and *Paraburkholderia* genera (Figure 2.B). Previous studies reported the prevalence of the Burkholderiaceae family in maize rhizosphere microbiomes¹¹. Importantly, *Burkholderia* species have been associated with nitrogen fixation and stress resistance in maize^{34,35}. One of the most frequent species in both maize varieties was *Burkholderia cenocepacia* (Table S1), which is part of the *Burkholderia cepacia* complex that has been widely reported as associated with plant growth promotion³⁶. The inoculation of *B. cenocepacia* improved maize production (cob length, number of grains per cob, grain weight, and 100-grain weight) in the field, with better results when combined with *Alcaligenes aquatilis*³⁷.

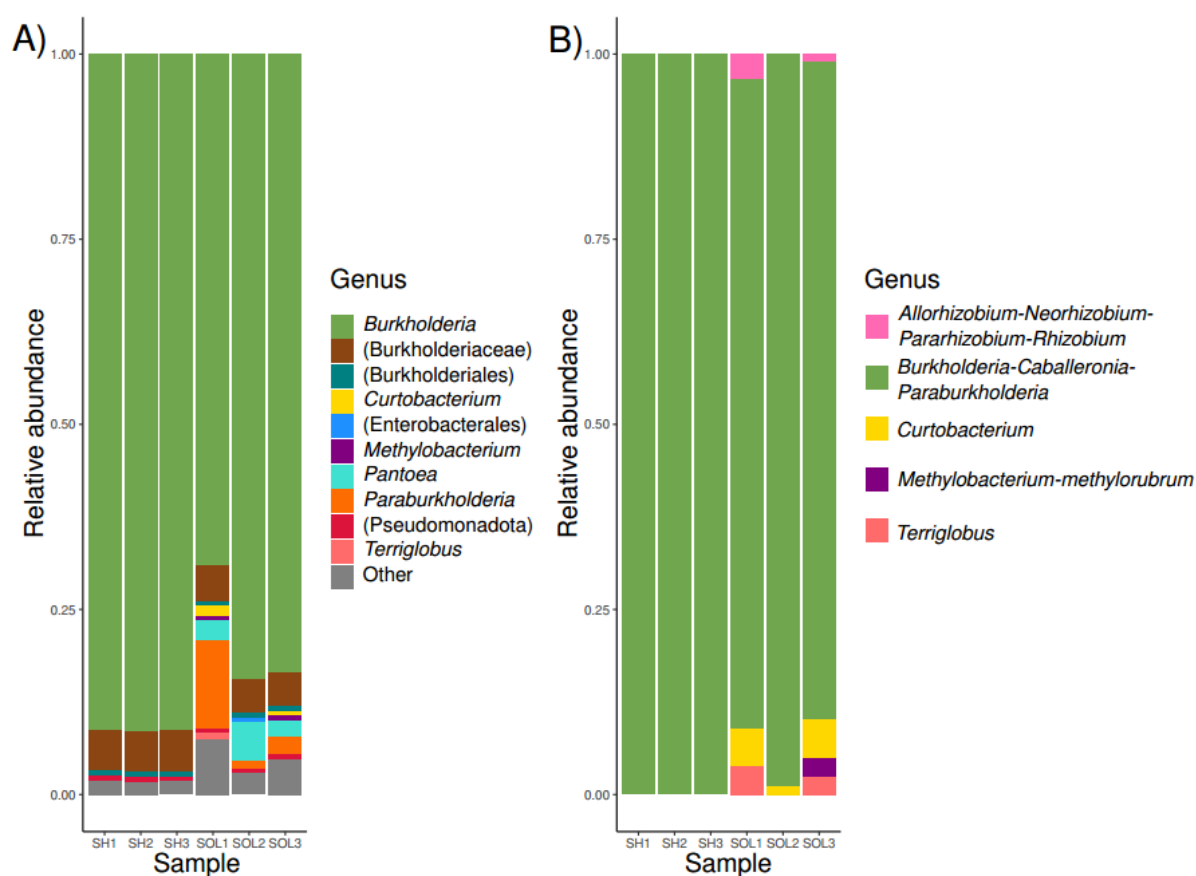


Figure 2: Relative abundance of OTUs. A) shotgun sequencing data (higher taxonomic levels were presented between parentheses), reads with less than 1% relative abundance across all samples and reads without taxonomic assignment were collectively classified as "Other"; B) 16S rRNA data.

It is important to acknowledge that some *B. cenocepacia* strains are pathogenic to humans, particularly to immunocompromised individuals³⁸. Conversely, other *B. cenocepacia* strains are non-pathogenic and deemed safe^{39,40}. Hence, it is feasible to strategically incorporate non-pathogenic strains in inoculants or synthetic microbiomes to harness the beneficial aspects of *B. cenocepacia* as a PGPB, while mitigating potential risks to human health.

Burkholderiaceae accounted for over 90% of the SH microbiome. In addition, all classified reads from the SH 16S metataxonomic data were assigned to the *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* genera (Figure 2b). In contrast, SOL samples displayed a substantial presence of various taxa and variable proportions of Burkholderiaceae in their composition. A Principal Component Analysis (PCA) further highlighted this distinction, with SH samples almost completely overlapping, while SOL samples were more dispersed (Figure 3).

The homogeneity found in SH samples mirrors the inherent genetic uniformity of the hybrid variety. It is well-established that the plant genotype profoundly influences the microbiome composition and that intensive agriculture can reduce microbiome diversity⁴¹. Prior research has demonstrated differences in microbiome recruitment in inbred maize varieties over time, with more recently developed germplasms recruiting fewer microbial taxa

with the genetic capability for sustainable nitrogen provisioning and larger populations of microorganisms that contribute to nitrogen loss ⁴². It is reasonable to assume that SH experienced a loss of microbiome diversity due to its long-term use in intensive agriculture when compared to SOL, which is also reflected in the high occurrence of singletons in those samples. Another critical aspect to consider is that the intensive use of chemical fertilizers and pesticides reduces the selective pressure on recruiting a supportive microbiome by plants ⁴³, which might also be the case in commercial varieties like SH.

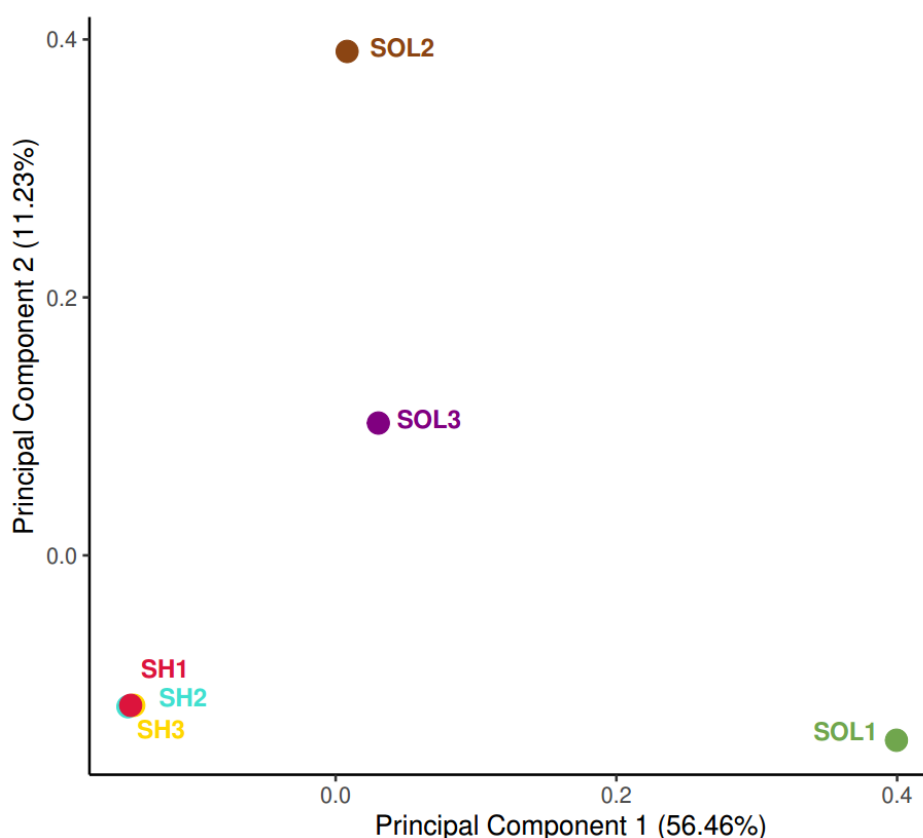


Figure 3: Principal Components Analysis using OTUs diversity per sample.

The seed-borne microbiome harbors multiple phosphate solubilization genes but is likely unable to fix nitrogen

Bacteria can promote plant growth through various mechanisms, either directly or indirectly. Here we use a list of manually curated genes to investigate the presence of direct plant-growth promotion mechanisms, including nitrogen fixation, phosphate solubilization, ACC deaminase, and auxin production.

We expected a greater abundance of nitrogen fixation genes in SOL because of the gene loss driven by extensive breeding and chemical nitrogen fertilization varieties like SH ^{42,44}. Contrary to our hypothesis, the *nifHDK* core nitrogenase genes were absent in both varieties. Nevertheless, we found *nifB* and *nifUS*, which are involved in the biosynthesis of the FeMo nitrogenase cofactor ^{45,46} and in providing the essential Fe-S clusters for the biosynthesis of FeMo-Co⁴⁷, respectively. In SH samples, we found *nifQ*, responsible for molybdenum incorporation, which acts in conjunction with other genes (*nifB*, *nifNV*, and *nifE*)

in the biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase ^{48,49} (Figure 4). The relevance of these *nif* genes in the absence of the core nitrogenase subunits is yet to be clarified. However, it is important to emphasize that even non-intensive agricultural management involves nitrogen fertilization. This recurrent nitrogen addition could result in a high abundance of nitrogen in the soil, reducing selective pressure for retaining diazotrophic microorganisms in the seed-borne microbiome. In addition, the seed reserves also play a key role in plant nutrition during seed-to-seedling plant development, which could also reduce the need for diazotrophic bacteria in the short term.

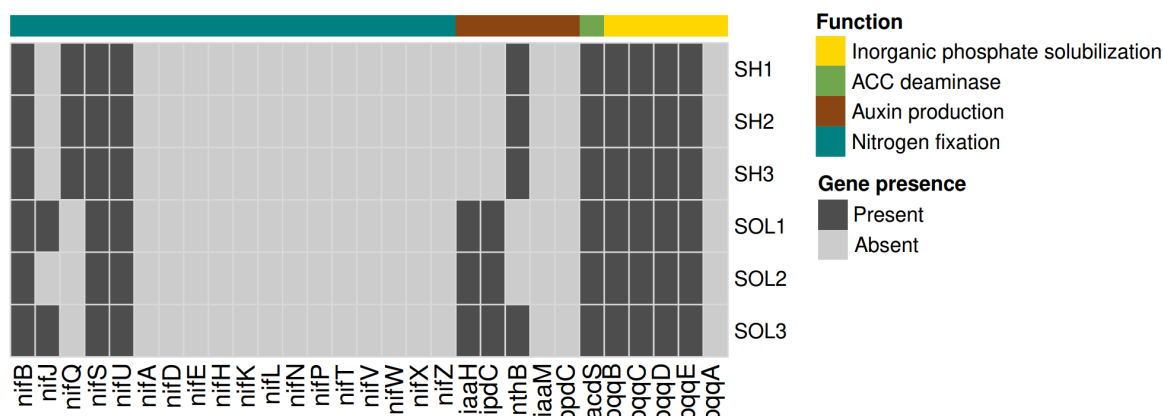


Figure 4: Functional heatmap of plant-growth promotion genes in each sample.

We found all the *pqq* genes for inorganic phosphate solubilization in all samples, except for the *pqqA* gene (not necessary for PQQ cofactor synthesis ⁵⁰). We found no phytase genes in the metagenomes, supporting the dominance of inorganic phosphate solubilization in the seed-borne microbiome. The evolution of the seed-borne microbiome to prioritize the solubilization of inorganic over organic phosphate is compatible with the general availability of phosphorus in soils used for intensive agriculture ⁵¹.

Seed-borne microbiome may affect phytohormone production

We found distinctive patterns of auxin biosynthesis genes, with SH harboring the *nthB* gene, while SOL showed a dominance of *ipdC* and *iaaH*. These results show a much greater auxin biosynthesis potential in the SOL seed-borne microbiome. In this context, we can hypothesize that increased utilization of nitrogen fertilizers and intensive breeding can make auxin-producing microorganisms dispensable ^{52,53}.

We also found the ACC deaminase gene *acdS* in all samples. ACC deaminases convert ACC in α -ketobutyrate and ammonia ^{54,55}, lowering ethylene levels in the plant ¹⁹. Reduced ethylene levels can delay senescence ⁵⁶, improve plant resistance to stressful environments ⁵⁷ and pathogen attacks ⁵⁸. Hence, the presence of *acdS* could also be favored by selection in intensive agriculture systems where plants are often under reduced stress.

Metagenome-assembled genomes (MAGs)

A total of 18 valid bacterial MAGs were recovered (Table 2). We identified ten high-quality MAGs, meeting the stringent criteria of at least 90% genome completeness and

up to 5% contamination. There were five medium-quality draft MAGs, with 50 to 90% completeness and less than 10% contamination, and one low-quality draft MAG, with less than 50% genome completeness and more than 10% contamination. Two MAGs exhibited duplication levels exceeding 10% and were likely contaminated.

Remarkably, we discovered four MAGs belonging to novel species, including two from the *Curtobacterium*, one from *Burkholderia*, and one from *Terriglobus*. These four novel species MAGs were found in SOL samples, with SOL1.2 being classified as high-quality according to the MIMAG methodology³³. Furthermore, the two unknown *Curtobacterium* MAGs were 99% identical, supporting their affiliation to the same novel species.

It is reasonable to assume that identifying a high-quality MAG is more common for abundant strains. Thus, the independent recovery of the same MAG in different samples strongly supports its robust occurrence in the seed-borne microbiome. Species such as *Burkholderia gladioli*, found in all six samples, might have an essential role in the seed-borne microbiome. Importantly, given the ANI values greater than 99%, we probably found the same *B. gladioli* strain in all six samples. *B. gladioli* has been previously reported as a beneficial seed-borne bacteria, showing a good repertoire of phosphatases and no nitrogen fixation genes⁵⁹, which is coherent with the results presented here. Another interesting MAG is the *B. cenocepacia* strain found in all SH samples. *B. cenocepacia* is a known biocontrol agent⁶⁰ generally associated with *Fusarium* wilt protection.

Table 2: MAGs characteristics and metadata. Classification is only at the genus level and is presented between parentheses.

Assembly	Contigs	Total length (bp)	GC (%)	N50	L50	Classification	Completeness (%)	Duplication (%)
SH1.2	67	7,326,046	66.84	159,765	12	<i>Burkholderia cenocepacia_B</i>	97.8	0.4
SH1.3	107	7,837,774	68.31	126,332	18	<i>Burkholderia gladioli</i>	91.9	0.6
SH2.1	71	7,313,029	66.85	179,016	14	<i>Burkholderia cenocepacia_B</i>	98.1	0.4
SH2.2	82	7,745,205	68.3	150,959	16	<i>Burkholderia gladioli</i>	92.1	0.4
SH3.1	66	7,322,313	66.84	188,414	14	<i>Burkholderia cenocepacia_B</i>	97.9	0.4
SH3.3	100	7,780,057	68.26	120,202	20	<i>Burkholderia gladioli</i>	93.9	0.4
SOL1.1	784	2,479,334	58	3,304	264	(<i>Terriglobus</i>)	49.2	0.3
SOL1.2	472	3,628,554	71.42	12,246	96	(<i>Curtobacterium</i>)	91.3	0
SOL1.7	504	9,566,513	67.44	35,148	78	<i>Burkholderia gladioli</i>	75.5	24
SOL1.9	18	4,819,029	57.46	374,213	5	<i>Pantoea dispersa</i>	69.2	0.9
SOL1.10	58	8,220,759	65.06	258,149	10	<i>Paraburkholderia tropica</i>	95.8	1.2
SOL1.11	182	5,852,377	68.83	47,277	37	(<i>Burkholderia</i>)	51	15
SOL2.3	12	4,843,396	57.44	690,450	2	<i>Pantoea dispersa</i>	73.6	0.9
SOL2.4	92	8,328,544	67.93	222,006	12	<i>Burkholderia gladioli</i>	99.2	0.7
SOL3.3	20	4,859,991	57.45	416,592	4	<i>Pantoea dispersa</i>	74.7	0.9
SOL3.4	661	3,263,738	71.34	5,741	171	(<i>Curtobacterium</i>)	76.1	0.3

SOL3.6	1435	8,789,041	64.69	8,009	303	<i>Paraburkholderia tropica</i>	59.2	3.1
SOL3.8	203	7,160,874	68.82	62,203	41	<i>Burkholderia gladioli</i>	95.2	0.4

Concluding remarks

In this study, we demonstrated that a landrace maize variety has a more diverse and less uniform (between samples) seed-borne microbiome than a hybrid commercial variety. We identified a higher phytohormone production potential in the landrace seed-borne microbiome. When exploring MAGs, we identified that some taxa are uniformly distributed between different varieties, supporting the existence of a core seed-borne microbiome. We also found an unexpected absence of *nif* genes in both varieties, which could be linked to the widespread use of nitrogen fertilization even in non-extensive agricultural environments. Understanding the dynamics of how seed-borne microbiomes evolve can guide the development of novel precision agriculture applications.

Author contributions

Conceptualization: SH-J, FLO, TMV; Formal analysis: SH-J; Computational methodology: SH-J, FP-S; Wet lab methodology: BEBC; Writing – original draft: SH-J, TMV; Writing - review & editing: SH-J, BEBC, FLO, TMV; Funding acquisition: FLO, TMV; Project administration: FLO, TMV.

Supplementary tables

Table S1: Metagenomics diversity.

Table S2: 16S metataxonomics diversity.

 Tabelas suplementares

References

1. Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A. & Dufresne, A. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* **206**, 1196–1206 (2015).
2. Lyu, D. *et al.* Plant Holobiont Theory: The Phytomicrobiome Plays a Central Role in Evolution and Success. *Microorganisms* **9**, (2021).
3. Jiang, M. *et al.* Home-based microbial solution to boost crop growth in low-fertility soil. *New Phytol.* **239**, 752–765 (2023).
4. de Faria, M. R., Costa, L. S. A. S., Chiaramonte, J. B., Bettiol, W. & Mendes, R. The rhizosphere microbiome: functions, dynamics, and role in plant protection. *Trop. Plant Pathol.* **46**, 13–25 (2021).
5. Zhang, J., Liu, W., Bu, J., Lin, Y. & Bai, Y. Host genetics regulate the plant microbiome. *Curr. Opin. Microbiol.* **72**, 102268 (2023).
6. Dastogeer, K. M. G., Tumpa, F. H., Sultana, A., Akter, M. A. & Chakraborty, A. Plant microbiome—an account of the factors that shape community composition and diversity. *Curr. Plant Biol.* **23**, 100161 (2020).
7. Trivedi, P., Batista, B. D., Bazany, K. E. & Singh, B. K. Plant-microbiome interactions under a changing world: responses, consequences and perspectives. *New Phytol.* **234**, 1951–1959 (2022).
8. Erenstein, O., Jaleta, M., Sonder, K., Mottaleb, K. & Prasanna, B. M. Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications. *Food Secur.* (2022) doi:10.1007/s12571-022-01288-7.
9. Eyre-Walker, A., Gaut, R. L., Hilton, H., Feldman, D. L. & Gaut, B. S. Investigation of the bottleneck leading to the domestication of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4441–4446 (1998).
10. Hake, S. & Ross-Ibarra, J. Genetic, evolutionary and plant breeding insights from the domestication of maize. *Elife* **4**, (2015).
11. Wagner, M. R., Roberts, J. H., Balint-Kurti, P. & Holland, J. B. Heterosis of leaf and rhizosphere microbiomes in field-grown maize. *New Phytol.* **228**, 1055–1069 (2020).
12. Elnahal, A. S. M. *et al.* The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. *Eur. J. Plant Pathol.* **162**, 759–792 (2022).
13. Chojnacka, K., Moustakas, K. & Witek-Krowiak, A. Bio-based fertilizers: A practical approach towards circular economy. *Bioresour. Technol.* **295**, 122223 (2020).
14. Grames, J. *et al.* Understanding feedbacks between economic decisions and the phosphorus resource cycle: A general equilibrium model including material flows. *Resour. Policy* **61**, 311–347 (2019).
15. Dugan, S. T., Muhammetoglu, A. & Uslu, A. A combined approach for the estimation of groundwater leaching potential and environmental impacts of pesticides for agricultural lands. *Sci. Total Environ.* **901**, 165892 (2023).
16. Kim, K.-H., Kabir, E. & Jahan, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* **575**, 525–535 (2017).
17. Ndakidemi, B., Mtei, K. & Ndakidemi, P. A. Impacts of synthetic and botanical pesticides on beneficial insects. *Agric. Sci. China* **07**, 364–372 (2016).
18. Fraser, E. *et al.* Biotechnology or organic? Extensive or intensive? Global or local? A critical review of potential pathways to resolve the global food crisis. *Trends Food Sci. Technol.* **48**, 78–87 (2016).
19. Olanrewaju, O. S., Glick, B. R. & Babalola, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 197 (2017).
20. Hall, M. & Beiko, R. G. 16S rRNA Gene Analysis with QIIME2. *Methods Mol. Biol.* **1849**, 113–129 (2018).
21. Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and

- web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**, D590–6 (2013).
22. Langdon, W. B. Performance of genetic programming optimised Bowtie2 on genome comparison and analytic testing (GCAT) benchmarks. *BioData Min.* **8**, 1 (2015).
 23. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
 24. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 (2014).
 25. Menzel, P., Ng, K. L. & Krogh, A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat. Commun.* **7**, 11257 (2016).
 26. Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, 2460–2461 (2010).
 27. Bankevich, A. *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **19**, 455–477 (2012).
 28. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. & Tesler, G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* **29**, 1072–1075 (2013).
 29. Kang, D. D. *et al.* MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies. *PeerJ* **7**, e7359 (2019).
 30. Chaumeil, P.-A., Mussig, A. J., Hugenholtz, P. & Parks, D. H. GTDB-Tk: a toolkit to classify genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* **36**, 1925–1927 (2019).
 31. Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V. & Zdobnov, E. M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* **31**, 3210–3212 (2015).
 32. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **30**, 2068–2069 (2014).
 33. Bowers, R. M. *et al.* Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. *Nat. Biotechnol.* **35**, 725–731 (2017).
 34. Mitter, B. *et al.* Genome analysis, ecology, and plant growth promotion of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. in *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* 865–874 (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2013).
 35. Bevivino, A., Dalmastrì, C., Tabacchioni, S. & Chiarini, L. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. *Biol. Fertil. Soils* **31**, 225–231 (2000).
 36. Rojas-Rojas, F. U. *et al.* [The controversial *Burkholderia cepacia* complex, a group of plant growth promoting species and plant, animals and human pathogens]. *Rev. Argent. Microbiol.* **51**, 84–92 (2019).
 37. Co-inoculation of *Bacillus velezensis* and *Stenotrophomonas maltophilia* enhances plant growth of maize (*Zea mays* L.) under green house and field condition. *Korean J. Agric. Sci.* **44**, (2017).
 38. Govan, J. R., Hughes, J. E. & Vandamme, P. *Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues. *J. Med. Microbiol.* **45**, 395–407 (1996).
 39. Cantón-Bulnes, M. L. *et al.* A case of pan-resistant *Burkholderia cepacia* complex bacteremic pneumonia, after lung transplantation treated with a targeted combination therapy. *Transpl. Infect. Dis.* **21**, e13034 (2019).
 40. Li, Q. & Ma, L.-P. Case Report: Community-Acquired *Burkholderia cepacia* Pneumonia of a Patient with Pulmonary Tuberculosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **107**, 86–88 (2022).
 41. Peixoto, R. S. *et al.* Harnessing the microbiome to prevent global biodiversity loss. *Nat Microbiol* **7**, 1726–1735 (2022).
 42. Favela, A., O Bohn, M. & D Kent, A. Maize germplasm chronosequence shows crop breeding history impacts recruitment of the rhizosphere microbiome. *ISME J.* **15**, 2454–2464 (2021).
 43. Barros-Rodríguez, A., Rangseekaew, P., Lasudee, K., Pathom-Aree, W. & Manzanera, M. Impacts of Agriculture on the Environment and Soil Microbial Biodiversity. *Plants* **10**, (2021).
 44. Vicente, E. J. & Dean, D. R. Keeping the nitrogen-fixation dream alive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 114 3009–3011 (2017).
 45. Rettberg, L. A. *et al.* Identity and function of an essential nitrogen ligand of the nitrogenase cofactor biosynthesis protein NifB. *Nat. Commun.* **11**, 1757 (2020).

46. Arragain, S. *et al.* Diversity and Functional Analysis of the FeMo-Cofactor Maturase NifB. *Front. Plant Sci.* **8**, 1947 (2017).
47. Zhao, D., Curatti, L. & Rubio, L. M. Evidence for nifU and nifS participation in the biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *J. Biol. Chem.* **282**, 37016–37025 (2007).
48. Imperial, J., Ugalde, R. A., Shah, V. K. & Brill, W. J. Role of the nifQ gene product in the incorporation of molybdenum into nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **158**, 187–194 (1984).
49. Hernandez, J. A. *et al.* Metal trafficking for nitrogen fixation: NifQ donates molybdenum to NifEN/NifH for the biosynthesis of the nitrogenase FeMo-cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 11679–11684 (2008).
50. Duine, J. A. Quinoproteins: enzymes containing the quinonoid cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinone. *Eur. J. Biochem.* **200**, 271–284 (1991).
51. Bhattacharya, A. Changing environmental condition and phosphorus-use efficiency in plants. in *Changing Climate and Resource Use Efficiency in Plants* 241–305 (Elsevier, 2019).
52. Gondek, K. & Mierzwa-Hersztek, M. Effect of soil-applied L-tryptophan on the amount of biomass and nitrogen and sulfur utilization by maize. *Agronomy (Basel)* **11**, 2582 (2021).
53. Ahmad, R., Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z. A. & Mahmood, T. Effect of compost enriched with N and L-tryptophan on soil and maize. *Agron. Sustain. Dev.* **28**, 299–305 (2008).
54. Blaha, D., Prigent-Combaret, C., Mirza, M. S. & Moënne-Loccoz, Y. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol. Ecol.* **56**, 455–470 (2006).
55. Sapre, S., Gontia-Mishra, I. & Tiwari, S. ACC deaminase-producing bacteria: A key player in alleviating abiotic stresses in plants. in *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability* 267–291 (Springer Singapore, Singapore, 2019).
56. Kader, A. A. Ethylene-induced senescence and physiological disorders in harvested horticultural crops. *HortScience* **20**, 54–57 (1985).
57. Morgan, P. W. & Drew, M. C. Ethylene and plant responses to stress. *Physiol. Plant.* **100**, 620–630 (1997).
58. Lund, S. T., Stall, R. E. & Klee, H. J. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell* **10**, 371–382 (1998).
59. Shao, J. *et al.* Rhizosphere microbiome assembly involves seed-borne bacteria in compensatory phosphate solubilization. *Soil Biol. Biochem.* **159**, 108273 (2021).
60. Ho, Y.-N. *et al.* In planta biocontrol of soilborne Fusarium wilt of banana through a plant endophytic bacterium, *Burkholderia cenocepacia* 869T2. *Plant Soil* **387**, 295–306 (2015).

Conclusão geral

A biotecnologia emerge como uma área crucial para a segurança alimentar, especialmente diante do aumento global da população e da premente necessidade de produzir alimentos de maneira sustentável. A manipulação do microbioma das plantas representa uma estratégia promissora para elevar a produtividade agrícola, reduzindo a dependência de aditivos químicos, como fertilizantes e pesticidas. Entretanto, a adoção dessas técnicas depara-se com obstáculos significativos, como a necessidade do desenvolvimento de inoculantes que não interfiram no microbioma local, evitando assim possíveis desequilíbrios ecológicos. Logo, entender mais sobre a parcela do microbioma das plantas que é herdada verticalmente pode fornecer insights sobre as interações ecológicas presentes neste meio e sua relevância para o microbioma da planta adulta.

Neste trabalho, delineamos como diferentes variedades de milho apresentam microbiomas residentes diferentes, que podem refletir as práticas de cultivo aplicadas nestas culturas ao longo dos anos. Vimos que uma variedade de milho que passou por uma longa exposição a um sistema de plantio industrial tem a diversidade de seu microbioma residente afetada quando comparada a uma variedade crioula produzida em um sistema de agrofloresta. Também identificamos fatores importantes no perfil funcional do microbioma residente do milho, como a ausência generalizada de genes de fixação de nitrogênio. Além disso, caracterizamos 18 MAGs do microbioma residente, sendo 4 de espécies novas. Uma compreensão mais profunda do microbioma residente e sua dinâmica ao longo do tempo e das condições de cultivo poderá inspirar o desenvolvimento de novos bioinsumos para a agricultura, além de contribuir para a identificação de potenciais candidatos para a formulação de consórcios microbianos benéficos.

1. Douglas, A. E. The microbial exometabolome: ecological resource and architect of microbial communities. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **375**, 20190250 (2020).
2. Lastovetsky, O. A. *et al.* Molecular Dialogues between Early Divergent Fungi and Bacteria in an Antagonism versus a Mutualism. *MBio* **11**, (2020).
3. Orozco-Mosqueda, M. del C. *et al.* Plant growth-promoting bacteria as bioinoculants: Attributes and challenges for sustainable crop improvement. *Agronomy (Basel)* **11**, 1167 (2021).
4. Erenstein, O., Jaleta, M., Sonder, K., Mottaleb, K. & Prasanna, B. M. Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications. *Food Secur.* (2022) doi:10.1007/s12571-022-01288-7.
5. Cairns, J. E. & Prasanna, B. M. Developing and deploying climate-resilient maize varieties in the developing world. *Curr. Opin. Plant Biol.* **45**, 226–230 (2018).
6. Becerril, J. & Abdulai, A. The impact of improved maize varieties on poverty in Mexico: A propensity score-matching approach. *World Dev.* **38**, 1024–1035 (2010).
7. Buckler, E. S. & Stevens, N. M. 4. Maize origins, domestication, and selection. in *Darwin's Harvest* (ed. Motley, T.) 67–90 (Columbia University Press, 2006).
8. Erenstein, O., Blümmel, M. & Grings, E. Potential for dual-purpose maize varieties to meet changing maize demands: Overview. *Field Crops Res.* **153**, 1–4 (2013).