



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CLEITON RIBEIRO DA SILVA

**PROTEÔMICA ASSOCIADA À INTERAÇÃO DA CANA-DE-  
AÇÚCAR COM RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO (RPGP)**

RECIFE

2024

CLEITON RIBEIRO DA SILVA

**PROTEÔMICA ASSOCIADA À INTERAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR COM  
RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO (RPGP)**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia da Universidade  
Federal de Pernambuco, como  
requisito parcial para obtenção do  
título de mestre em Biotecnologia

**Área de concentração:**  
Microbiologia, Bioprocessos e  
Bioprodutos.

Orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior

Coorientador: Prof. Dr. João de Andrade Dutra Filho

RECIFE

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Cleiton Ribeiro da.

Proteômica associada à interação da cana-de-açúcar com rizobactérias promotoras de crescimento (RPGP) / Cleiton Ribeiro da Silva. - Recife, 2025.

119f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2024.

Orientação: Tercilio Calsa Junior.

Coorientação: João de Andrade Dutra Filho.

Inclui referências.

1. Cultivares; 2. Condições de crescimento; 3. Diâmetro de colmo; 4. Inoculação; 5. Respostas fisiológicas. I. Calsa Junior, Tercilio. II. Dutra Filho, João de Andrade. III. Título.

## **Agradecimentos**

Os agradecimentos não poderiam começar de outra forma senão pela minha família. Aos meus avós, Josefa Nazaré, que gosta de ser chamada de Detinha, e Nicodemos Francisco, que sempre fizeram o possível e o impossível por mim. Eles me apoiaram em toda a minha jornada e não permitiram que eu desistisse. São minha base, minha inspiração e meu universo.

À minha família, que foi mais do que fundamental para a realização deste trabalho. Sempre estiveram ao meu lado e acreditaram em mim. À minha mãe, Josicleide Nazaré; aos meus irmãos, às minhas tias e à minha prima-irmã, Rute Miriam, meu profundo agradecimento.

Gostaria de expressar minha gratidão ao professor Tercilio Calsa, por ter me aceito no grupo de pesquisa, acreditado no meu potencial, orientado com dedicação e contribuído imensamente para meu crescimento acadêmico.

Agradeço também ao professor João de Andrade, que, além de coorientador, foi o responsável por me introduzir ao mundo científico e desempenhou o papel de um excelente amigo, sempre presente quando necessário.

Minha gratidão vai a todos os profissionais do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), pelo profissionalismo e dedicação ao programa. Sua atenção e compromisso tornaram este ambiente um espaço de excelência acadêmica e desenvolvimento humano.

Não poderia deixar de agradecer ao Paulo, do LGPP, por sua dedicação e por toda a ajuda que recebi profissionalmente. Sua colaboração foi fundamental durante minha jornada, e além de um colega de trabalho, ganhei um amigo para a vida.

A toda a equipe do LGPP, em especial a Paulo, Larissa, José, Lucas e demais colegas, sou profundamente grato. Vocês tornaram meus dias mais leves e alegres no laboratório, sempre me ajudando da melhor maneira possível.

Agradeço a todos que contribuíram no experimento de plantio do ACV. Sem a ajuda de Beatriz, Eduarda, Ayla, Gisele, Bianca e Geisi, a condução do experimento seria muito mais difícil.

Minha gratidão se estende à pesquisadora Fabiana, por me acolher, esclarecer dúvidas, e fornecer suporte técnico ao meu experimento.

Agradeço ainda aos professores Roberto e Reginaldo, pelo suporte nas análises de alguns resultados e pela colaboração durante este trabalho.

Gostaria de agradecer a Eduardo Carlos, por me apoiar e estar ao meu lado, e acreditar em meu potencial. Sua ajuda em diversas etapas da minha vida foi essencial, obrigado por tudo.

Agradeço imensamente a Erivânia, minha irmã de vida, esteve em meus melhores e piores momentos, uma amizade que se tornou minha família.

E como não agradecer a todos os meus amigos, que de forma direta ou indireta foram fundamentais para essa minha jornada.

Agradecer a CETENE pela ajuda na análises de alguns dados.

Agradeço a CAPES pelo fornecimento de bolsa, para a realização da pesquisa.

Gostaria de agradecer aos profissionais Milena e Welington, que sempre trouxeram alegria e vida para o prédio do DINE.

## RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) desempenha um papel crucial na economia brasileira, sendo responsável por uma parcela significativa do PIB nacional. Os produtos obtidos do seu plantio são diversificados, que incluem açúcar, etanol, álcool, bagaço, melaço, entre outros. Nesse contexto, estratégias voltadas para a melhoria da produtividade e da qualidade das plantações de cana-de-açúcar têm despertado interesse crescente em diversos países produtores. Destaca-se, entre essas estratégias, o uso de inoculantes bacterianos, como o *Bacillus subtilis*, que apresentam o potencial de promover o crescimento e a saúde e produtividade das plantas. Este estudo tem como objetivo avaliar a influência da bactéria *Bacillus subtilis* no desenvolvimento de cultivares de cana-de-açúcar e na expressão de genes específicos, e estudar como a inoculação bacteriana interfere no proteoma desses dois cultivares, a RB041443 e RB92579. A investigação foi conduzida por meio de uma abordagem integrativa, combinando avaliação de características agronômicas e análise proteômica. O experimento foi realizado em ambiente aberto, em condições parcialmente controladas, utilizando um delineamento experimental de blocos ao acaso em esquema fatorial 2 (cultivares) x 4 (condições de crescimento) x 6 (repetições), totalizando 48 unidades experimentais. Foi verificado a presença de *Bacillus subtilis*, análise de variância conjunta, comparação de teste de médias e análise de regressão. Foi possível observar que houve diferenças significativas no diâmetro do colmo sob aplicação da bactéria, com média maior na cultivar RB92579 inoculada. Esses resultados podem orientar o desenvolvimento de estratégias agrícolas para aumentar a produtividade e a sustentabilidade das plantações de cana-de-açúcar, contribuindo também para o avanço do conhecimento sobre interações planta-bactérias na agricultura. Pesquisas futuras podem responder as respostas por quais razões essas associações contribuíram para um maior aumento do diâmetro de colmo da cultivar de desenvolvimento lento, por meio de análises proteômicas.

**Palavras-chave:** cultivares, condições de crescimento, diâmetro de colmo, inoculação, respostas fisiológicas.

## ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum* spp.) plays a crucial role in the Brazilian economy, accounting for a significant portion of the national GDP. The products obtained from its cultivation are diverse, including sugar, ethanol, alcohol, bagasse, molasses, among others. In this context, strategies aimed at improving the productivity and quality of sugarcane plantations have attracted growing interest in various producing countries. Among these strategies, the use of bacterial inoculants, such as *Bacillus subtilis*, stands out, as they have the potential to promote growth, health, and productivity of plants. This study aims to evaluate the influence of the bacterium *Bacillus subtilis* on the development of sugarcane cultivars and the expression of specific genes, as well as to investigate how bacterial inoculation interferes with the proteome of two cultivars, RB041443 and RB92579. The investigation was conducted through an integrative approach, combining the assessment of agronomic characteristics and proteomic analysis. The experiment was carried out in an open environment under partially controlled conditions, using a randomized block experimental design in a factorial scheme of 2 (cultivars) x 4 (growth conditions) x 6 (repetitions), totaling 48 experimental units. The presence of *Bacillus subtilis* was verified, along with joint analysis of variance, comparison of means tests, and regression analysis. It was observed that there were significant differences in stalk diameter under bacterial application, with a higher average in the inoculated RB92579 cultivar. These results may guide the development of agricultural strategies to increase productivity and sustainability of sugarcane plantations, also contributing to the advancement of knowledge about plant-bacteria interactions in agriculture. Future research may address the reasons why these associations contributed to a greater increase in stalk diameter of the slow-growing cultivar through proteomic analyses.

**Keywords:** Cultivars, Growth conditions, Stalk diameter, Inoculation, Physiological responses.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Produtividade atingível de cana-de-açúcar em diferentes zonas homogêneas do Brasil ao longo de 30 anos para cada zonas homogêneas. Fonte: CONAB, 2024. ....	18
Figura 2 - Imagem ilustrativa de cana-de-açúcar da variedade RB92579 A e RB041443 B.....	19
Figura 3 - Ilustração de Mudas Pré-Brotadas. Fonte: Autor.....	21
Figura 4 - Fixação de nitrogênio por bactéria diazotrófica. Fonte: AGROADVANCE, 2022. ....	22
Figura 5 - Representação esquemática de bactérias promotoras de crescimento usados como Biofertilizantes I) Fixação biológica do nitrogênio, transformando o N <sub>2</sub> atmosférico em NO <sub>3</sub> - (nitrato) e NH <sub>4</sub> + (amônia) disponíveis para a planta. II) Solubilização de fosfato.....	23
Figura 6 - Esporos e células vegetativas de <i>B. subtilis</i> . (a) microscopia de contraste de fase, (b) microscopia eletrônica de varredura. Fonte: EMBRAPA, (2020). ....	25
Figura 7 - Figura (A) Imagem ilustrativa da cultivar RB 92579. Figura (B), imagem ilustrativa da cultivar RB041443. Fonte: RIDESA 2010. ....	30
Figura 8 - Processo de Preparação dos Vasos: (A) Furo realizado no fundo do vaso com mangueira conectada a uma garrafa PET. (B) Camada de pedra esmagada (brita) colocada no fundo do vaso. (C) Cobertura da brita com tecido não-tecido (TNT). (D) Preenchimento dos.....	33
Figura 9 - Preparação das covas nos vasos, e plantio de 3 gemas de cada tratamento das gemas de cana-de-açúcar. Fonte: Autor.....	35
Figura 10 - Dissolução do produto comercial de <i>Bacillus subtilis</i> dentro de um balde esterilizado, contendo 5 litros de água e com 0,15 litros do produto, alcançando uma concentração de 100 g p.c.ha <sup>-1</sup> . Fonte: Autor. ....	36
Figura 11 - Imagem dos brotos de cana-de-açúcar após 30 dias do plantio. Fonte: Autor. ....	37
Figura 12 - Vaso atingindo a capacidade de campo, momento em que o solo atinge sua capacidade máxima de retenção de água, resultando no escoamento através do furo no vaso. ....	38
Figura 13 - Crescimento em altura da cultivar RB041443 ao longo de 165 dias, sob quatro tratamentos: F- <i>B.subtilis</i> - (sem fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F+ <i>B.subtilis</i> - (com fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F- <i>B.subtilis</i> + (sem fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ), F+B <sub>s</sub> (com fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ).....	50
Figura 14 - Crescimento em altura da cultivar RB92579 ao longo de 165 dias, sob quatro tratamentos: F- <i>B.subtilis</i> - (sem fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F+ <i>B.subtilis</i> - (com fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F- <i>B.subtilis</i> + (sem fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ), F+B <sub>s</sub> (com fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ).....	51



Figura 15 - Número de colmos nas cultivars de cana-de-açúcar RB041443 (R) e RB92579 (L) sob diferentes tratamentos: F- <i>B.subtilis</i> - (sem fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F+ <i>B.subtilis</i> - (com fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F- <i>B.subtilis</i> + (sem fertilizante com <i>Bacillus subtilis</i> ), e F+ <i>B.subtilis</i> + (com fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ). .....	52
Figura 16 - Valores de °Brix nas cultivars de cana-de-açúcar RB041443 (R) e RB92579 (L) sob diferentes tratamentos: F- <i>B.subtilis</i> - (sem fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F+ <i>B.subtilis</i> - (com fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F- <i>B.subtilis</i> + (sem fertilizante com <i>Bacillus subtilis</i> ), e F+ <i>B.subtilis</i> + (com fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ). .....	53
Figura 17 - Diâmetro dos colmos em centímetros da cultivar RB041443 ao longo dos dias, sob quatro tratamentos: F- <i>B.subtilis</i> - (sem fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F+ <i>B.subtilis</i> - (com fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F- <i>B.subtilis</i> + (sem fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ), e F+ <i>B.subtilis</i> + (com fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ). .....	54
Figura 18 - Diâmetro dos colmos em centímetros da cultivar RB041443 ao longo dos dias, sob quatro tratamentos: F- <i>B.subtilis</i> - (sem fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F+ <i>B.subtilis</i> - (com fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F- <i>B.subtilis</i> + (sem fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F- <i>B.subtilis</i> + (sem fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ), e F+ <i>B.subtilis</i> + (com fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ). .....	55
Figura 19 - Valores de peso fresco nas cultivars de cana-de-açúcar RB041443 (R) e RB92579 (L) sob diferentes tratamentos ao final do período: F- <i>B.subtilis</i> - (sem fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F+ <i>B.subtilis</i> - (com fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F- <i>B.subtilis</i> + (sem fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ), e F+ <i>B.subtilis</i> + (com fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ). .....	56
Figura 20 - Valores de peso da folha seca nas cultivars de cana-de-açúcar RB041443 (R) e RB92579 (L) sob diferentes tratamentos ao final do período: F- <i>B.subtilis</i> - (sem fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F+ <i>B.subtilis</i> - (com fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F- <i>B.subtilis</i> + (sem fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ), e F+ <i>B.subtilis</i> + (com fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ). .....	57
Figura 21 - Valores de peso do colmo seco nas cultivars de cana-de-açúcar RB041443 (R) e RB92579 (L) sob diferentes tratamentos ao final do período: F- <i>B.subtilis</i> - (sem fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F+ <i>B.subtilis</i> - (com fertilizante e sem <i>Bacillus subtilis</i> ), F- <i>B.subtilis</i> + (sem fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ), e F+ <i>B.subtilis</i> + (com fertilizante e com <i>Bacillus subtilis</i> ). .....	58
Figura 22 - Resumo da análise de regressão do caractere diâmetro de colmos avaliado em dois ambientes distintos (Sem inoculação e com inoculação da <i>Bacillus subtilis</i> ) em experimento conduzido no Centro Acadêmico de Vitória em 08/03/2024. Fonte: Autor. ....	61
Figura 23 - Placas em meio LB para o crescimento bacteriano com setas que sugerem ser colônias de <i>B. subtilis</i> , o "T" seguido do número refere-se ao tipo do tratamento, e a respectiva diluição. T1 -2 (Tratamento 1 para a diluição de 10-2). TA: Tratamento controle com água destilada; TB: Tratamento controle com <i>Bacillus subtilis</i> . ....	62

Figura 24 - Gel de agarose a 1,2% de eletroforese dos produtos de PCR para detecção de *Bacillus subtilis* em amostras de DNA de folhas e raízes de cana-de-açúcar das cultivars RB041443 e RB92579, com e sem inoculação bacteriana. M: marcador molecular de 100 pb; 1-2: folhas sem bactéria (1: RB041443, 2: RB92579); 3-4: folhas com bactéria (3: RB041443, 4: RB92579); 5: controle negativo; 6: controle positivo; 7-8: raízes sem bactéria (7: RB041443, 8: RB92579); 9-10: raízes com bactéria (9: RB041443, 10: RB92579); 11: controle negativo; 12: controle positivo. Bandas visíveis nas amostras inoculadas e no controle positivo confirmam a presença de *B. subtilis*.

..... 63

Figura 25 - Amplificação do do gene *pycA* em cana-de-açúcar por qPCR para o tratamento cultivar RB92579 Lento “LS” sem *Bacillus subtilis*..... 64

Figura 26 - Amplificação do do gene *pycA* em cana-de-açúcar por qPCR para o tratamento cultivar RB92579 Lento “LC” inoculado com *Bacillus subtilis*..... 64

Figura 27 - Quantificação de clorofilas A, B, totais (A+B) e carotenóides em duas cultivars de cana-de-açúcar (RB041443 e RB92579) com e sem tratamento com *Bacillus subtilis*, após 180 dias de cultivo. Diferenças significativas entre tratamentos são indicadas por asteriscos ( $p < 0,001$ ). ..... 66

Figura 28 - SDS-PAGE em gel de poliácridamida 12,5% das proteínas solúveis totais de cana-de-açúcar submetidas a quatro tratamentos em duplicata: (1 e 2: RB041443 sem B.s; 3 e 4: RB92579 sem B.s; 5 e 6: RB041443 com B.s; 7 e 8: RB92579 com B.s ) Marcador de baixo peso molecular (MM) em KDa. .... 67

Figura 29 - Seleção de spots do gel 2-D PAGE enumerados de 1 a 20, tilizando o software Image Master 2D Platinum ..... 68

Figura 30 - Rede de interação das proteínas identificadas, mostrando associações funcionais entre proteínas envolvidas na transcrição, síntese proteica, sinalização de morte celular programada e regulação epigenética ... 73

Figura 31 - Imagens de géis 2D-PAGE com localização de spots utilizando extrato de proteínas totais de folha da cultivar RB92RB9579. A) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *B. subtilis*, B) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar não inoculadas com *B. subtilis*. ..... 74

Figura 32 - Resumo da quantidade de proteínas e sua categorização dos termos de ontologia gênica para proteínas diferencialmente acumuladas em cana-de-açúcar evidenciando as diferenças entre os tratamentos. Gráficos das proteínas diferenciais de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento sem inoculação bacteriana e com inoculação bacteriana na cultivar RB9579. localização subcelular, Função molecular e Processo biológico. .... 14

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Melhoria na planta utilizando <i>Bacillus subtilis</i> .....	25
Tabela 2 - Datas e Principais Tópicos da Condução do Experimento. ....	31
Tabela 3 - Análise do solo utilizado nos experimentos. Onde: H+Al: acidez potencial; SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca catiônica; V: saturação de bases; C: C orgânico; M: saturação de Al; MO: matéria orgânica. ....	32
Tabela 4 - Descrição dos tratamentos aplicados nos experimentos com os cultivares de cana-de-açúcar RB041443 (crescimento rápido, R) e RB92579 (crescimento lento, L), variando o ambiente, inoculação com <i>Bacillus subtilis</i> , e adição de fertilizante. ....	34
Tabela 5 - Primer utilizado para amplificações de genes <i>pycA</i> .....	41
Tabela 6 - Descrição dos genes e seus acessos referente a sua referência. ..	48
Tabela 7 - Resumo da análise de variância conjunta avaliada em dois ambientes distintos (Sem inoculação e com inoculação de <i>Bacillus subtilis</i> ) no experimento conduzido no Centro Acadêmico de Vitória de em 08/03/2024 ...	58
Tabela 8 - Comparação de médias dos caracteres avaliados em dois ambientes distintos (Sem inoculação e com inoculação de nome da <i>Bacillus subtilis</i> ) em experimento conduzido no Centro Acadêmico de Vitória em 08/03/2024.....	59
Tabela 9 - . Continuação .....	59
Tabela 10 - Identificação de proteínas de Cana-de-açúcar, proteínas acumuladas na presença de <i>B. subtilis</i> de 1 a 10 e sem inoculação de <i>B. subtilis</i> de 11 a 20. Anotação putativa a partir do MALDI ToF analisando via PMF na plataforma MASCOT. ....	69
Tabela 11 - Identificação de proteínas de Cana-de-açúcar, proteínas acumuladas na ausência da inoculação de <i>B. subtilis</i> de 1 a 6. Anotação putativa a partir do MALDI ToF analisando via PMF na plataforma MASCOT. ....	74
Tabela 12 - Identificação das DAPs de cana-de-açúcar, proteínas identificadas para o tratamento controle, sem a inoculação da bactéria e aplicação de fertilizante. ....	14
Tabela 13 - Identificação das DAPs de cana-de-açúcar, proteínas identificadas para o tratamento com aplicação da bactéria e sem a aplicação de fertilizante. ....	15
Tabela 14 - Tabela com a descrição das ontologias gênicas dos genes biomarcadores citados na literatura, e o por que foram pré-selecionados e os resultados esperados.....	15
Tabela 15 - Tabela com a descrição das ontologias gênicas dos genes biomarcadores citados na literatura, e o por que foram pré-selecionados e os resultados esperados.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**PSS** - Mudas pré-brotadas

**RPCPs** - Rizobactérias promotoras do crescimento das plantas

***B. subtilis***- *Bacillus subtilis*

***B.s*** - *Bacillus subtilis*

**IBA** - ácido indolbutírico

**IAA** - ácido indol acético

**DAPs** - Proteínas Diferencialmente Acumuladas

**CONAB** - Companhia Nacional de Abastecimento

**PIB** – Produto Interno Bruto

**IBA** - ácido indolbutírico

**IAA** - ácido indol acético

**PROÁLCOOL** – Programa Nacional do Alcool

**RIDESA** - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor  
Sucroenergético

**CTC** - Centro de Tecnologia Canavieira

**IAC** - Instituto Agrônomo de Campinas

**RB** - República do Brasil

**CV** - Canavialis

**CTC** - Centro Tecnológico Canavieira

**ATP** – Adenosina trifosfato

**NADH** - Dinucleótido de nicotinamida e adenina

**NADPH** - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

**BPCP** – Bactérias promotoras do crescimento

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**RNA** – Ácido ribonucleico

**TNT** – Tecido não tecido

**PET** - Politereftalato de etileno

**LB** - Luria Bertani

**BRIX** - unidade de medida da percentagem de açúcar numa solução

**F** - Fator

**V** - Variância

**T** – Tratamento

**A** - Ambiente

**F.V** – Fontes de Variação

**QMR** - Qualidade Média Resultante

## SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO .....	18
2.0 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivo Específico .....	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
3.1 Cana-de-açúcar .....	15
3.2 Importância econômica da cana-de-açúcar.....	16
3.3 Variedades de Cana-de-Açúcar .....	18
3.4 Melhoramento genético de cana-de-açúcar .....	20
3.5 Bactérias Diazotróficas .....	21
3.6 Rizobactérias Promotoras de Crescimento .....	22
3.7 <i>Bacillus subtilis</i> .....	24
3.8 Análise Proteômica .....	26
3.9 Eletroforese bidimensional 2D-PAGE .....	28
3.10 Interação planta-microrganismo .....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
4.1 Material Vegetal e Inóculo.....	30
4.2 Caracterização do local do experimento .....	30
4.3 Condução do experimento .....	31
4.4 Análise do solo .....	32
4.5 Preparação dos vasos para plantio .....	32
4.6 Delineamento de experimento .....	33
4.7 Descrição do plantio das cana-de-açúcar de controle.....	34
4.8 Descrição dos tratamentos com <i>Bacillus subtilis</i> .....	35
4.9 Condução do experimento .....	37
4.11 Análise estatística .....	38
4.12 Isolamento Bacteriano .....	39
4.13 Quantificação dos Pigmentos Fotossintetizantes .....	40
4.14 Extração de DNA total.....	40
4.15 Amplificações do genes <i>pycA</i> via PCR e qPCR .....	41
4.16 Extração de Proteínas Totais .....	41

3.17	Quantificação e Análise da Integridade das Proteínas .....	42
4.18	Análise Proteômica Através da Eletroforese em duas Dimensões (2d- Page).....	43
4.18.1	Focalização isoeletrica (1º dimensão).....	43
4.19	Digitalização dos Géis.....	44
4.20	Análise das Imagens.....	45
4.21	Digestão das bandas SDS-PAGE com Tripsina .....	45
4.22	Digestão dos spots 2D-PAGE com Tripsina.....	46
4.23	Análise dos peptídeos tripticos em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS).....	47
4.24	ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.....	47
4.24.1	Identificação das proteínas .....	47
4.24.2	Ontologia gênica (GO).....	48
4.25	Expressão de Genes Biomarcadores de Interação Planta- <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> POR RT-qPCR.....	48
5.0	RESULTADOS .....	50
5.1	Avaliação do crescimento .....	50
5.1.1	Análise de Crescimento das Plantas nos Tratamentos .....	50
5.1.2	Análise de Contagem do Número de Colmos da Planta dos Tratamentos .....	51
5.1.3	Análise do Valor De %Brix Das Plantas nos Tratamentos .....	52
5.1.4	Análise do Diâmetro do Colmo das Plantas nos Tratamentos .....	53
5.2	Peso Fresco.....	55
5.3	Peso Folha seca .....	56
5.4	Peso Colmo seco.....	57
5.5	Análise de variância conjunta .....	58
5.6	Comparação de médias .....	59
5.7	Análise de regressão .....	60
5.8	Isolamento Bacteriano .....	61
5.9	Quantificação da colonização por <i>Bacillus subtilis</i> por qPCR.....	62
5.10	qPCR.....	63
5.11	Quantificação de Pigmentos Fotossintéticos.....	65
5.13	Análise Proteômica SDS-PAGE.....	66
5.14	Identificação de Proteínas SDS-PAGE .....	68

5.15 Rede de interação das proteínas identificadas SDS-PAGE .....	71
5.16 Análise Proteômica 2D-PAGE.....	73
5.17 Identificação de Proteínas 2D-PAGE .....	74
5.18 Espectrometria de Massas e Identificação Presumível .....	75
5.19 Ontologia Gênica .....	14
5.19 Expressão de Genes Biomarcadores de Interação Planta- <i>Bacillus subtilis</i> POR RT-qPCR.....	15
6.0 DISCUSSÃO .....	17
6.1 Análise de crescimento das plantas .....	17
6.2 Análise de contagem do número de colmos da planta nos tratamentos .	17
6.3 Análise do valor de %brix das plantas nos tratamentos .....	18
6.4 Análise do diâmetro do colmo das plantas nos tratamentos.....	19
6.5 Peso Fresco.....	20
6.6 Peso Folha Seca.....	21
6.7 Peso colmo Seco .....	22
6.8 Análise de variância conjunta .....	22
6.9 Comparação de médias .....	24
6.10 Análise de regressão .....	24
6.11 Isolamento Bacteriano .....	25
6.12 Quantificação da colonização por <i>Bacillus subtilis</i> por qPCR.....	26
6.13 Quantificação dos pigmentos fotossintetizantes.....	27
6.14 Análise Proteômica SDS-PAGE .....	27
6.14.1 Proteínas Relacionadas ao Estresse e Adaptação.....	28
6.14.2 Metabolismo Energético e Fotossíntese.....	28
6.14.3 Fortalecimento Estrutural e Biossíntese de Lignina.....	28
6.14.4 Regulação Gênica e Respostas Epigenéticas .....	29
6.14.5 Discussão dos Escores Obtidos e Impacto da Inoculação .....	29
6.15 Proteômica 2D-PAGE .....	29
6.15.1 Eletroforese Bidimensional e Detecção de Spots Proteicos.....	30
6.15.2 Ribulose biphosphate carboxylase small subunit, chloroplastic (RuBisCO).....	30
6.15.3 Photosystem I Assembly Protein Ycf4 e Montagem do Fotossistema .....	30
6.15.4 DEAD-box ATP-dependent RNA Helicase 30 .....	30



6.15.5 UDP-glycosyltransferase 88F5 e Detoxificação .....	31
6.15.6 Implicações do Tratamento com <i>B. subtilis</i> .....	31
6.16 Análise proteômica LC MS/MS .....	31
6.16.1 Fotossíntese e Transporte de Elétrons .....	31
6.16.2 Defesa Antioxidante e Resposta ao Estresse Oxidativo.....	32
6.16.3 Regulação da Tradução e Metabolismo Celular .....	33
6.16.4 Comparação com Estudos Anteriores.....	33
6.16.5 Respostas ao Estresse Induzidas pela Inoculação .....	33
6.16.6 Melhoria da Eficiência Fotossintética e Metabolismo Energético ...	34
6.16.7 Regulação da Tradução e Atividade Metabólica .....	35
6.16.8 Comparação entre os Tratamentos.....	35
6.17 Expressão de genes biomarcadores de interação planta- <i>Bacillus subtilis</i> por RT-qPCR.....	35
8.0 CONCLUSÕES .....	37
9.0 REFERÊNCIAS .....	38

## 1.0 INTRODUÇÃO

O cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) no Brasil desempenha um papel significativo na economia, contribuindo com cerca de 2% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. Além de sua relevância econômica, a cultura é uma fonte diversificada de produtos, incluindo açúcar, etanol, etanol de segunda geração e bagaço, este último utilizado na geração de eletricidade (Almeida et al., 2009).

Com sua larga escala em produção mundial, e com notoriedade no Brasil, a compreensão no seu manejo e cultivo para que haja uma alta taxa de produtividade e altos valores de rendimento, instigam estratégias que visam a continuidade de tais desempenhos, que atendam às principais necessidades de produção em campo (Vedana et al., 2020).

No Brasil, líder mundial na produção de cana-de-açúcar, investimentos frequentes são realizados em sua produção, destacando-se a utilização de mudas pré-brotadas (PSS) que se referem a plantas germinadas previamente em condições controladas antes do transplante para assegurar um plantio uniforme e ajustado a altos padrões de fitossanidade (Gazola; et al., 2017). Além da adoção do sistema PSS, os inoculantes bacterianos emergem como uma alternativa promissora para obter material vegetal saudável e produtivo de maneira sustentável. Esta prática apresenta-se como uma alternativa para reduzir a dependência de fertilizantes minerais, frequentemente utilizados em larga escala (MBURU, 2021).

Microrganismos presentes no solo podem ser selecionados e empregados para promover o desenvolvimento das plantas, destacando-se as rizobactérias promotoras do crescimento das plantas (RPCPs) como simbiotes benéficos capazes de influenciar diversas fases de crescimento e desenvolvimento vegetal (LI, Mingjia et al., 2022).

Dentro deste grupo de rizobactérias, a espécie *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) exerce efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento das plantas por meio de mecanismos diversos, tais como a produção de ácido indolbutírico (IBA), sideróforos, ácido indol acético (IAA) e até mesmo a fixação do nitrogênio (via co-inoculação com rizóbio) (Mahapatra et al., 2022).

Os benefícios da utilização de *B. subtilis* nas plantações são notáveis, especialmente pela produção de endósporos duráveis, o que favorece a

qualidade nutricional do solo, reduzindo a necessidade de fertilizantes químicos devido ao aumento da eficiência de absorção pelas plantas (STÜLKE, Jörg et al., 2023).

A aplicação de *Bacillus subtilis* em plantações, como na cana-de-açúcar, vai além do objetivo de simplesmente promover o crescimento vegetal. Seus mecanismos simbióticos com as plantas não apenas contribuem para aumentar a capacidade de sobrevivência frente a estresses bióticos e abióticos, mas também demonstram a capacidade de mitigar os efeitos indesejados dos fertilizantes minerais, promovendo uma prática agrícola mais sustentável e minimizando impactos adversos no solo (Sun, Bo et al., 2020; Gilhar et al., 2022).

Compreender as formas pelas quais a aplicação de *B. subtilis* pode alterar o proteoma da planta e de que maneira ele age em diferentes cultivares de cana-de-açúcar pode fornecer informações valiosas. Se seu desempenho apresentar variações significativas de acordo com a cultivar à qual está associado, e como ele é capaz de alterar o desempenho das principais vias metabólicas, são aspectos que merecem investigação mais aprofundada (LI, Ao-Mei et al., 2023).

Estudos recentes, como o de Fonseca et al. (2022), destacam a eficácia do *Bacillus subtilis* na mitigação dos efeitos negativos do déficit hídrico em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), resultando em uma melhor otimização e eficiência no uso da água. A compreensão dos genes, proteínas e mecanismos moleculares envolvidos nesses benefícios impulsiona o desenvolvimento de novas metodologias aplicáveis à agricultura, aprimorando os parâmetros fisiológicos nas plantações de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.).

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a influência do *Bacillus subtilis* no crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar.

### 2.2 Objetivo Específico

- Avaliar o crescimento e desenvolvimento de dois cultivares comerciais de cana-de-açúcar, RB041443 e RB92579, sob a inoculação ou não de *B. subtilis* em comparação a utilização de fertilizantes e adubo.
- Avaliar expressão gênica de cana-de-açúcar na interação com *B. subtilis*.
- Identificar e selecionar proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) potencialmente associadas a interação cana x *B. subtilis*.
- Correlacionar as proteínas identificadas com maior crescimento utilizando ferramentas de bioinformática.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Cana-de-açúcar

As primeiras evidências da existência da cana-de-açúcar que se tem notícias, foram encontradas nas escrituras mitológicas dos hindus e nas Sagradas Escrituras. Eram consideradas remédio ou até mesmo artigo de luxo no século XVII. A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à família Poaceae com sua origem pertencendo ao Sudeste asiático (Daniels e Roach, 1987). A responsabilidade pela propagação na África, Europa e por todo mar mediterrâneo, foram constituídas pelos árabes (Cesnik, 2007).

Aproximadamente 30 anos após a chegada dos portugueses no Brasil, Martim Affonso de Souza trouxe a primeira muda de cana-de-açúcar para o Brasil, e já no final do século XVI, o Brasil era considerado o maior produtor e fornecedor mundial de açúcar do mundo, com uma produção anual estimada em 6000 toneladas, das quais cerca de 90% eram exportadas para Portugal e Europa (Fernandes, 2020).

Sua implementação no Brasil está ligada ao fato da própria história de desenvolvimento do nosso país, na qual participava do processo apenas de transformação em açúcar, mas hoje em dia, possui grande destaque também na produção de etanol (Fernandes, 2020). Com diversos produtos adjacentes da cana-de-açúcar, o açúcar e o etanol são os mais procurados e com maiores poderes no desenvolvimento econômico mundial, e o Brasil segue sendo líder em tais produções (Cesnik, 2007).

Em 1970, o Brasil testemunhou um notável avanço na produção de cana-de-açúcar, impulsionado por iniciativas governamentais. Um marco crucial ocorreu em 1975, com o lançamento do programa PROÁLCOOL. Este programa ambicioso foi concebido com o propósito de reduzir a dependência do Brasil em relação ao petróleo, resultando em ganhos substanciais em diversas esferas, incluindo a econômica, ambiental e tecnológica.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), é a cultura que mundialmente apresenta um dos maiores rendimentos devido ao metabolismo C4 e ciclo de vida perene sendo a principal matéria-prima para a fabricação de açúcar e etanol (Nayak et al., 2014; Santos e Diola, 2015). Somente no Brasil, a produtividade estimada para safra 2024/2025 é de 685,86 milhões de toneladas (Conab, 2024).

Seu cultivo comercial ocorre com todas as suas cultivares existentes hoje em dia, entre aproximadamente mais de 70 países e territórios, entre eles estão os

maiores produtores, sendo o Brasil, China e Índia. E com grande importância econômica, o Brasil é responsável por cerca de 50% de todas exportações mundiais do açúcar correspondem do Brasil (Unica, 2024).

De acordo com o levantamento da Conab (2024), estima-se que a produção de açúcar no Brasil na safra de 2024/2025 deve chegar à 46,29, milhões de toneladas, enquanto a produção de etanol para a mesma safra deve chegar à 34,18 bilhões de litros, um crescimento de 5,9% comparada à safra anterior.

As cultivares de cana-de-açúcar podem ser classificadas de acordo com suas características de crescimento e desenvolvimento, uma vez que essas características podem se destacar ou serem menos evidentes de acordo com a região geográfica que ela for plantada, e das condições que envolvem a planta para seu desenvolvimento (Silva, 2021).

A cana-de-açúcar, assim como qualquer outra planta, está exposta a diversos fatores bióticos e abióticos, que podem prejudicar sua produtividade causando impactos significativos na economia nacional e internacional (Wang et al., 2020). Dada a relevância dessa cultura, o Brasil tem aumentado seus investimentos na engenharia genética de novos cultivares mais resistentes e com maiores produtividades, no quais estão envolvidos vários programas de instituições públicas, como a RIDESA (Rede Interuniversitária de Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro), CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) e a empresa CanaVialis (Almeida, 2015).

A complexa dicotomia entre produtividade e sustentabilidade na cultura da cana-de-açúcar é um tema que suscita grande interesse nos programas de melhoramento genético. O foco está no desenvolvimento de cultivares mais adaptadas às condições específicas de cada região, capazes de demonstrar respostas positivas diante de diversos estresses, como patógenos, pragas, variações climáticas, salinidade e déficit hídrico. Este desafio estimula a busca por soluções inovadoras que conciliem eficiência produtiva com práticas sustentáveis, visando um equilíbrio entre os aspectos econômicos e ambientais da produção de cana-de-açúcar Farhate et al., (2020).

### **3.2 Importância econômica da cana-de-açúcar**

De acordo com a Conab (2024), a produção nacional de cana-de-açúcar na safra de 2024/2025 no Brasil tem estimativas de 685,86 milhões de toneladas. A

região Sudeste ganha destaque, sendo a maior região produtora nacional, com uma produção que pode chegar a 442,74 milhões de toneladas, enquanto a região nordeste deve se manter próxima a estabilidade, com aproximadamente uma produção de 56,65 milhões de toneladas.

Devido às diferenças climáticas entre as regiões com maiores produções de cana-de-açúcar no Brasil, é possível que haja a colheita durante o ano todo. Enquanto na região Centro-Sul as colheitas ocorrem entre os meses de abril e novembro, e na região do Norte-Nordeste as colheitas ocorrem entre os meses de setembro a fevereiro (Carvalho, 2022).

A partir da cana-de-açúcar, é possível se ter como seus principais processamentos o açúcar e o etanol. Mas sua industrialização vai muito além da produção desses dois derivados, é possível se obter de outros subprodutos com grandes importâncias econômica para o país, tais como bagaço, que podem ser utilizados para a alimentação animal, ou para a produção de energia renovável, a vinhaça, que é reaproveitada na fertirrigação de canaviais, que se tem uma grande disponibilidade de nutrientes (Miranda-Stalder & Burnquist, 1996).

O Brasil segue ganhando o ranque de maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, no qual possui um leque extenso em suas exportações de seus derivados, tanto nacionais, quanto internacionais. Na produção de etanol, o Brasil tem posição de segundo maior produtor, perdendo somente para os Estados Unidos (Vidal, 2020).

A indústria sucroenergética do Brasil desempenha um papel significativo na economia, contribuindo com cerca de 10% do PIB agrícola nacional e 2% do PIB total. E possui grandes estimativas de largas escalas crescentes de produtividade ao longo dos anos no Brasil (**Figura 01**). Essa cadeia produtiva movimenta anualmente aproximadamente R\$40 bilhões em transações econômicas (Unica, 2019).

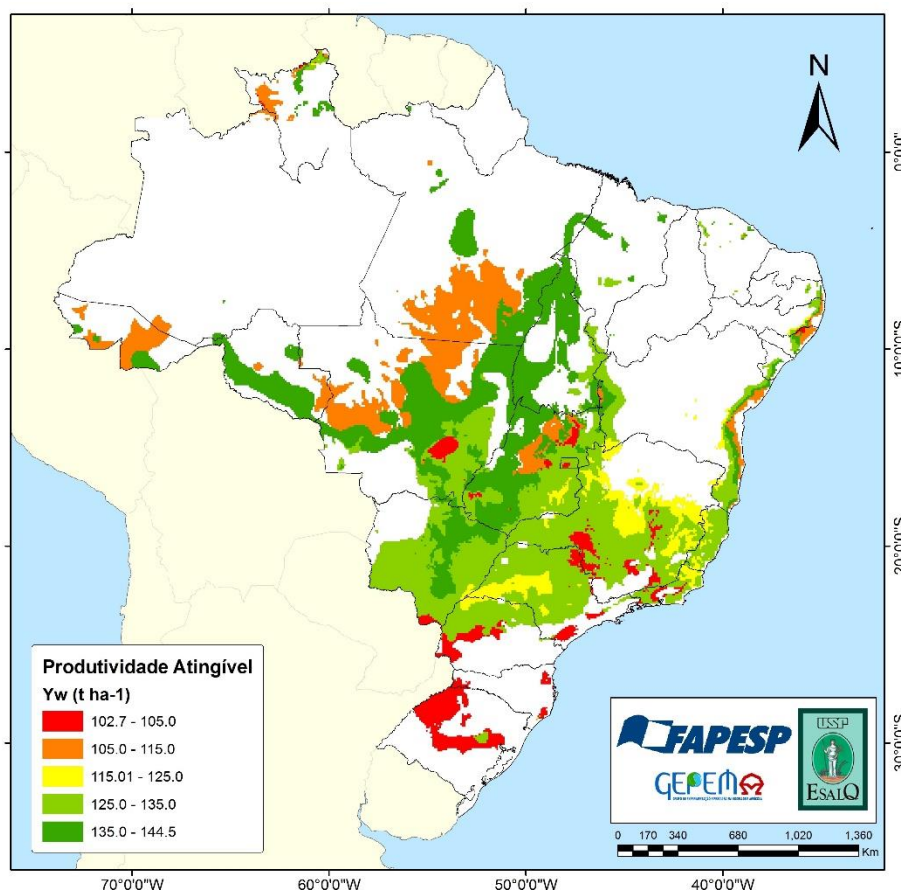


Figura 1 - Produtividade atingível de cana-de-açúcar em diferentes zonas homogêneas do Brasil ao longo de 30 anos para cada zonas homogêneas. Fonte: CONAB, 2024.

No ano de 2017 no Brasil, foi criada uma política pública, chamada de Política Nacional Biocombustíveis (RenovaBio), que tem como objetivo a visão de um país com mais iniciativas para implementação de biocombustíveis sendo utilizado dentro da nacionalidade, a fim de maior sustentabilidade tanto econômica, social, quanto ambiental. Esta política permite que haja uma maior produção de etanol no país, além da diminuição de carbono por transportes brasileiros (Cepea, 2018; Unica, 2019).

### 3.3 Variedades de Cana-de-Açúcar

As variedades de cana-de-açúcar representam cultivares desenvolvidos para atender a diferentes condições agroecológicas e demandas produtivas, que podem ser organizadas pela alta produtividade, resistência a estresses bióticos, e adaptação a condições abióticas, como fatores climáticos e de solo. Elas resultam de programas de melhoramento genético que combinam características desejáveis, como teor elevado de sacarose, vigor vegetativo e tolerância a estresses abióticos. Além disso, a escolha da variedade ideal desempenha papel crucial para maximizar a eficiência



produtiva e sustentável do cultivo, especialmente em sistemas agrícolas influenciados por fatores bióticos e abióticos regionais (YARA BRASIL, 2024; NUNES, 2020).

Dentre as variedades cultivadas pelo país, algumas são comumente mais encontradas cultivadas em regiões específicas, do que outras cultivares, a variedade RB92579, é a mais cultivada no Brasil durante os últimos 15 anos, com cerca de 15,7% da área recenseada com cana no Brasil, amplamente cultivada no estado de São Paulo, seguido de Goiás e Minas Gerais (AGROADVANCE, 2024) (**Figura 02-A**). Ela é uma cultivar que apresenta um desenvolvimento lento, alto teor de sacarose, com aspecto manchado e pouca cera, apresentando coloração roxa quando exposto ao sol amarelo-esverdeado sob a palha. Possui entrenós de comprimento e diâmetro médios, despalha difícil, gemas pouco salientes, folhas largas com pontas curvas e ausência de joçal. A variedade apresenta resistência intermediária ao carvão, ferrugem alaranjada e escaldadura, sendo tolerante à ferrugem marrom. Além disso, demonstra resistência ao mosaico (RIDESA, 2022).



Figura 2 - Imagem ilustrativa de cana-de-açúcar da variedade RB92579 A e RB041443 B.

A RB041443 possui relevância nas áreas do Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. É uma variedade com alta produtividade agrícola, um desenvolvimento rápido, com hábito de crescimento ereto, apresenta boa quantidade de cera, quando

exposta ao sol, e alto teor de sacarose, indicada para colheitas realizadas no meio e final da safra. É recomendada para plantio em áreas de sequeiro com irrigação de sobrevivência, apresentando rápida velocidade de crescimento. Demonstrou resistência ao nematoide *Meloidogyne incognita*, bem como à ferrugem alaranjada e ao carvão (RIDESA, 2022) (**Figura 02-B**).

### **3.4 Melhoramento genético de cana-de-açúcar**

O desenvolvimento genético da cana-de-açúcar teve início no final do século XIX, em estreita relação com o avanço do processo de plantio. À medida que as canas eram cultivadas, surgiam a necessidade de cultivares com características cada vez mais aprimoradas e adaptáveis. A Índia destaca-se como um dos principais centros de germoplasmas *saccharum*, englobando espécies como as dos gêneros *Saccharum*, *Erianthus*, *Sclerostachya*, *Narenga* e *Miscanthus* (Ram et al., 2022). No Brasil, o melhoramento genético de cana também teve início no final do século XIX, foi o período que o intercâmbio de materiais ganhou forças, no qual tinham o objetivo de buscar melhores cultivares, que possuem características mais desejáveis, como uma maior produtividade (Bezerra, 2018). Com o acesso a diferentes materiais, surgiu então a possibilidade de realizar cruzamentos com diferentes espécies, que resultaram em Híbridos interespecíficos que possuíam uma diversidade de características (Bezerra, 2018).

3 programas hoje em dia são voltados para o melhoramento de culturas, Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA), Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) que surgiram devido a implantação de 2 programas em Pernambuco que foram pioneiros, localizados nas cidades de Escada e Curado. Os cultivares que são produzidos por cada programa recebe uma classificação diferente, e as siglas são: IAC, CTC, RB, CV (MATSUOKA et al., 2005; BRESSIANI et al., 2006).

Os programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar têm como objetivo buscar e desenvolver cultivares com o maior número possível de características agroindustriais favoráveis para cada região de cultivo, dentre as quais se destacam: alta produtividade, elevado acúmulo de sacarose, bom perfilhamento, crescimento rápido, hábito de crescimento ereto, ausência de florescimento e de isoporização, boa brotação de soqueira, ampla adaptabilidade e estabilidade, tolerância a estresses, resistência às pragas e doenças, entre outras (Souza, 2021).

Os esforços em direção ao desenvolvimento de cultivares de cana-de-açúcar mais adequadas aos interesses econômicos e às necessidades humanas resultaram em avanços significativos nessa cultura, tornando-a uma das mais avançadas em termos de melhoramento genético, atualmente, as cultivares híbridas são predominantes nesse contexto (Pati et al., 2023).

Um dos sistemas que fazem parte do melhoramento genético de cana-de-açúcar para a seleção da própria, é o sistema de Mudanças Pré-Brotadas-MPB (**Figura 03**), desenvolvido pelo Instituto Agrônomo de Campinas-IAC (Landell et al., 2012). Esta seleção de novos cultivares de cana-de-açúcar é subdividida em quatro etapas, elas são: hibridação, seleção na população segregante, seleções clonais e validação (Xavier et al., 2016).



Figura 3 - Ilustração de Mudanças Pré-Brotadas. Fonte: Autor.

### 3.5 Bactérias Diazotróficas

O crescimento saudável das plantas requer a presença de alguns macronutrientes essenciais, dos quais o nitrogênio destaca-se como um elemento fundamental. Este elemento é crucial para diversas biomoléculas essenciais, tais como ATP, NADH, NADPH, clorofila, aminoácidos, proteínas e uma cultivar de enzimas (Thiebaut et al., 2022), desempenhando assim um papel central no desenvolvimento e funcionamento adequado das plantas.

As bactérias diazotróficas estabelecem uma interação simbiótica crucial com as plantas, na qual são capazes de colonizar as raízes e outros tecidos internos

vegetais, desempenhando um papel fundamental no seu desenvolvimento e crescimento. Por meio de mecanismos diretos e indiretos, essas bactérias têm a capacidade de aprimorar a absorção de nutrientes do solo, solubilizar fosfatos, produzir e liberar fito-hormônios para o hospedeiro, conferir resistência contra patógenos e, notavelmente, fixar nitrogênio, enriquecendo assim a nutrição das plantas. (Mandon et al., 2021).

No entanto, o nitrogênio em sua forma natural na rizosfera é escasso para as plantas, o que dificulta a continuidade desses mecanismos e afeta o desenvolvimento das plantas. Isso ressalta a importância crucial dessa relação simbiótica para a saúde e produtividade das plantas, destacando o papel fundamental das bactérias diazotróficas no ecossistema vegetal (Thiebaut et al., 2022) (**Figura 04**).

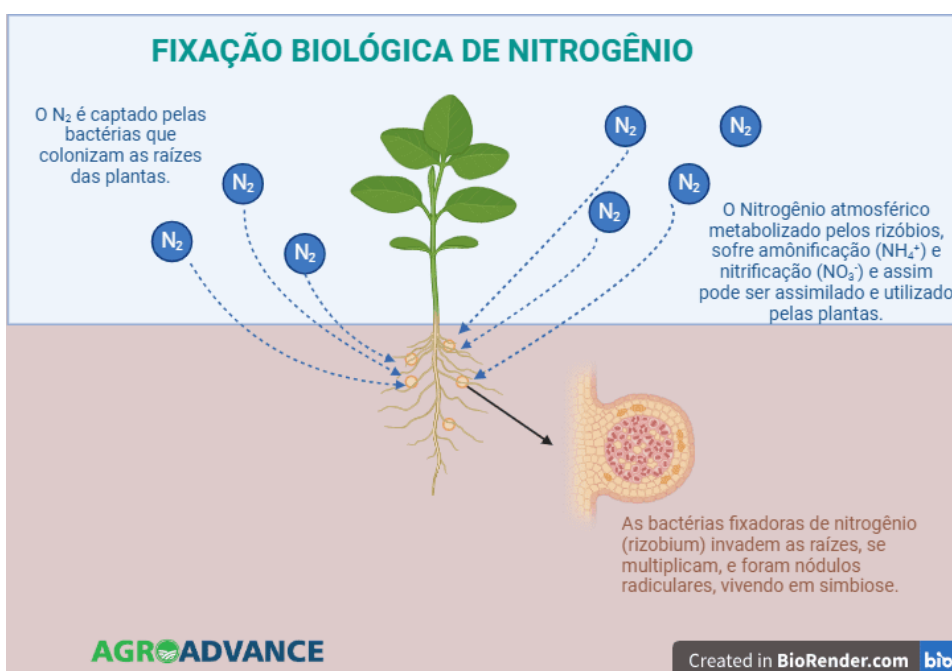


Figura 4 - Fixação de nitrogênio por bactéria diazotrófica. Fonte: AGROADVANCE, 2022.

### 3.6 Rizobactérias Promotoras de Crescimento

Rizobactérias Promotoras de Crescimento (RPCPs) são microrganismos que habitam a rizosfera, a região do solo onde as raízes se desenvolvem, sendo o principal local de absorção de nutrientes pelas plantas. Elas podem estabelecer associações tanto no interior quanto no exterior das plantas, proporcionando efeitos benéficos a esses organismos vegetais. Durante o mutualismo, as RPCPs demonstram a capacidade de influenciar positivamente as características do solo e o desenvolvimento das plantas (Teng, Zuting, 2023).



No contexto do crescimento das plantas, essas bactérias atuam diretamente devido aos seus mecanismos, como a fixação de nitrogênio no solo, produção de ácido cianídrico, liberação de fitohormônios reguladores do crescimento, bem como a liberação de enzimas, como ACC-deaminase e peroxidase (**Figura 05**). Além disso, elas mostram habilidades de solubilizar fosfato e desempenham um papel crucial no metabolismo nitrogenado das plantas (Carneiro et al., 2023).

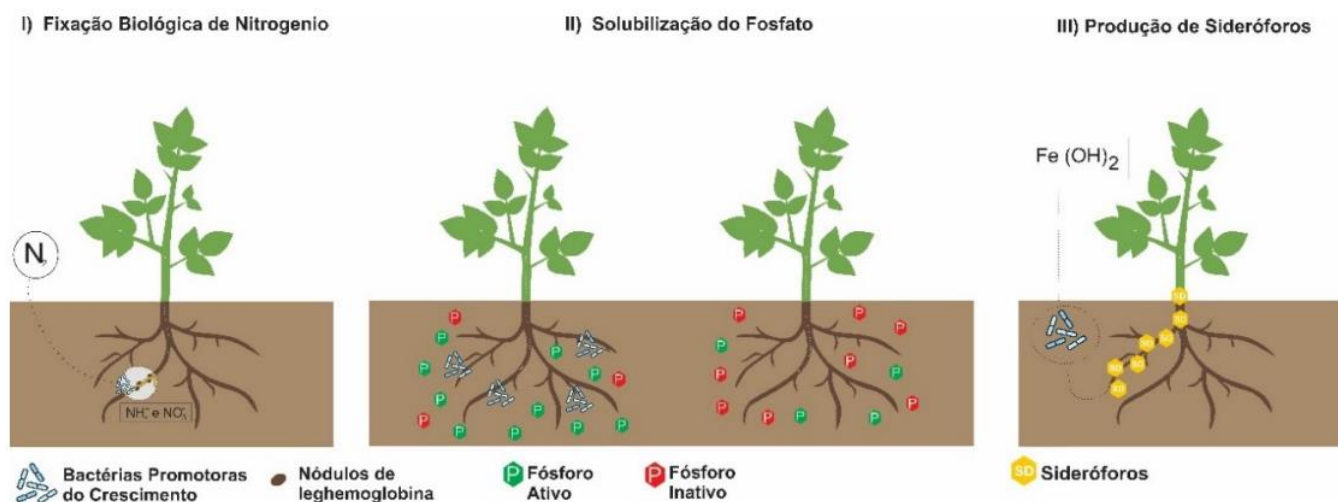


Figura 5 - Representação esquemática de bactérias promotoras de crescimento usados como Biofertilizantes I) Fixação biológica do nitrogênio, transformando o  $N_2$  atmosférico em  $NO_3^-$  (nitrato) e  $NH_4^+$  (amônia) disponíveis para a planta. II) Solubilização de fosfato

Reconhecidas como excelentes bioestimulantes, as RPCPs desempenham um papel crucial na disponibilização de nutrientes no solo, na melhoria da estrutura do solo, no estímulo ao crescimento vegetal e na proteção contra agentes patógenos. Essas bactérias podem ser categorizadas em dois tipos: as que colonizam os tecidos vegetais, denominadas endofíticas, e aquelas que não colonizam esses tecidos, conhecidas como não endofíticas (Carneiro et al., 2023).

Elas podem desempenhar um papel importante na proteção dos organismos vegetais contra estresses bióticos e abióticos, os quais, frequentemente, resultam em grandes perdas de crescimento e produtividade vegetal. Em relação aos estresses abióticos, as RPCPs, por meio de seus mecanismos, podem aumentar a resistência contra fatores-chave, como a água, luminosidade e temperatura (Chieb et al., 2023).

Muitos fatores bióticos podem levar os organismos vegetais a enfrentarem problemas semelhantes de perda de produtividade e falta de crescimento, como insetos, algumas bactérias patogênicas e vírus. Em casos extremos, a planta pode não resistir ao estresse e morrer. Os mecanismos pelos quais as rizobactérias se

associam às plantas sem serem confundidas por esses agentes prejudiciais estão relacionados aos sistemas de reconhecimento imunológico inato (Vismans et al., 2022; Zhu et al., 2022).

Assim como os animais, as plantas possuem um sistema imunológico inato capaz de identificar organismos estranhos. Através do sistema de defesa, as plantas estabelecem que tipo de relação será associada a esses organismos estranhos que foram capazes de ativar o sistema, determinando se ocorrerá uma relação benéfica de mutualismo ou mesmo uma relação contra agentes patogênicos. Elas são capazes de reconhecer padrões de moléculas associadas a organismos patogênicos ou não patogênicos (Zhu et al., 2022).

Com os receptores capazes de reconhecer os certos tipos de padrões moleculares específicos que são associados a determinados tipos de organismos, as plantas identificam que tipo de organismo ativa o seu sistema imune, e assim, pode proceder se irá ou não desencadear ações contra agentes patogênicos. As rizobactérias podem desencadear respostas de defesa nas plantas que são transitórias e leves, permitindo relações recíprocas, ao contrário das respostas dos agentes patogênicos, que são mais severas. Uma das moléculas produzidas pelas rizobactérias responsáveis é a *quorum sensing* (AHLs) que podem regular a expressão gênica e o crescimento das raízes, diferenciando-as de patógenos (Zhu et al., 2022).

### **3.7 *Bacillus subtilis***

*Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram-positiva aeróbia, desprovida de atividade patogênica, comumente encontrada no solo, especialmente na rizosfera, onde frequentemente estabelece associações benéficas com as plantas. Ao longo das últimas décadas, tem sido objeto de intensa pesquisa, tornando-se uma das bactérias Gram-positivas mais estudadas. Dessa forma, há uma abundância de conhecimento sobre suas propriedades moleculares e genéticas, facilitando estudos in vitro (Arnaouteli et al., 2021).

Esta bactéria demonstra uma notável habilidade em formar endósporos resistentes sendo capaz de produzir uma ampla cultivar de metabólitos secundários por meio de suas cepas. Essa versatilidade a torna uma aliada valiosa em diversas aplicações, como nas áreas alimentícia, industrial, animal e biológica, destacando-se também por sua capacidade de formar biofilmes que possuem diversas aplicações (Caulier et al., 2019).

Por se tratar do gênero *Bacillus* (**Figura 06**), o mais abundante presente na rizosfera, a espécie *Bacillus subtilis* torna-se o organismo modelo padrão para o estudo de organismos que possuem a capacidade de produção de biofilme, produção de metabólitos secundários, esporulação, fixação das raízes a planta, e desenvolvimento de biofilmes, tornando-se um alvo promissor para a agricultura (Blake et al., 2021).

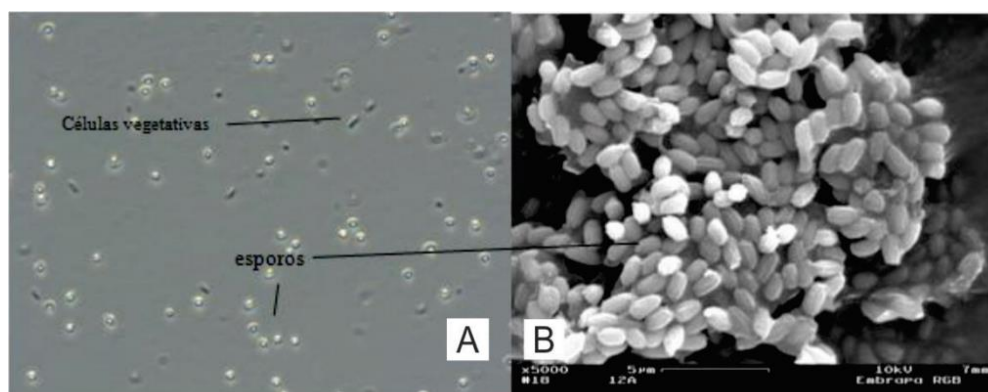


Figura 6 - Esporos e células vegetativas de *B. subtilis*. (a) microscopia de contraste de fase, (b) microscopia eletrônica de varredura. Fonte: EMBRAPA, (2020).

Esta espécie tem sido estudada em vários contextos, mostrando grande potencial para promover o crescimento das plantas e melhorar a saúde do solo. Através de suas atividades, como a produção de metabólitos secundários, ela pode aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas, como fósforo, nitrogênio e potássio **Tabela 01**. Estudos demonstraram que *Bacillus subtilis* pode melhorar a absorção de fósforo em até 40%, enquanto contribui para a mobilização de potássio e outros micronutrientes, proporcionando um crescimento mais robusto das plantas (Arnaouteli et al., 2021; Blake et al., 2021).

Tabela 1 - Melhoria na planta utilizando *Bacillus subtilis*.

Nutriente	Percentual de Aumento	Referência
Nitrogênio (N)	Até 20%	Didonet et al., 1996
Fósforo (P)	Aumento significativo	Contreras-Cornejo et al., 2016
Potássio (K)	Aumento significativo	Calvo et al., 2017

Zinco (Zn)	Aumento significativo	Kundan et al., 2015
Ferro (Fe)	Aumento significativo	Santoyo et al., 2012

A capacidade de *Bacillus subtilis* de secretar enzimas que degradam substratos variados e a produção de biofilmes também facilita a sua ação como agente de biocontrole, com eficácia comprovada contra fungos e bactérias patogênicas. Em ensaios de campo, foi observado que a presença dessa bactéria pode reduzir a incidência de doenças fúngicas em até 50%, contribuindo para a proteção das plantas e melhorando a resistência a estresses ambientais (Lucke et al., 2020; Caulier et al., 2019).

Além disso, *Bacillus subtilis* promove a síntese de fito-hormônios como auxinas e giberelinas, que atuam diretamente na promoção do crescimento vegetal. Estima-se que a produção de auxinas por *Bacillus subtilis* pode aumentar o enraizamento de plantas em até 25%, promovendo maior vigor vegetativo e maior resistência a estresses bióticos e abióticos (Blake et al., 2021). A inoculação com essa bactéria tem mostrado resultados positivos em várias características morfológicas da cana-de-açúcar, como o aumento no crescimento das raízes, maior número de colmos e maior peso de colmo. Em um estudo realizado com cana-de-açúcar sob estresse hídrico, a aplicação de *Bacillus subtilis* resultou em melhores parâmetros de fotossíntese, maior eficiência no uso da água e maior desenvolvimento das raízes, além de maior crescimento e peso nos colmos (Caulier et al., 2019).

Além dos benefícios em termos de nutrição e controle de doenças, *Bacillus subtilis* também contribui para a melhoria da saúde do solo e da planta, ajudando a aumentar a concentração de clorofila, reduzir o estresse oxidativo e melhorar a capacidade de resistência da planta a doenças e estresses ambientais (Lucke et al., 2020; Blake et al., 2021).

### 3.8 Análise Proteômica

No campo das ciências ômicas, é possível encontrar quatro principais grupos de estudos em níveis específicos, como a Genômica, que tem função de analisar o genoma de diferentes espécies; a Transcriptômica, que analisa os transcritos; a Proteômica, que analisa o proteoma de uma determinada célula, tecido ou até mesmo de uma determinada amostra biológica; e por fim, a Metabolômica, que analisa os metabólitos produzidos pelas células (Manzonnil et al., 2018).



A Proteômica é uma área de pesquisa abrangente que se dedica ao estudo em larga escala de conjuntos de proteínas. Dada a vasta gama de funções que as proteínas desempenham nas células, incluindo catálise de reações bioquímicas, sinalização, transdução de sinais, suporte estrutural e transporte de moléculas, a Proteômica desempenha um papel crucial na investigação dessas moléculas fundamentais. Este campo examina as propriedades estruturais, funcionais e dinâmicas das proteínas, proporcionando avanços significativos nas pesquisas das ciências biológicas (Kustatscher et al., 2022).

As proteínas são macromoléculas constituídas por sequências específicas de aminoácidos. Seu processo de síntese é coordenado pela tradução da informação genética contida no DNA. Nesse processo, o DNA é transcrito para um RNA mensageiro, que, por sua vez, é traduzido em sequências de aminoácidos pelos ribossomos. A sequência específica de cada aminoácido e a identidade de cada um são cruciais para garantir uma tradução precisa e, conseqüentemente, para a formação da proteína específica (Schramm et al., 2020).

As proteínas possuem um papel crucial nos organismos vivos, uma vez que são elas que estão à frente dos principais processos biológicos, como produção de energia, defesa celular, regulação e sinalização, transporte de moléculas entre outras, e à medida que estudos dos proteomas vão ganhando força, a compreensão e o entendimento dos funcionamentos biológicos se tornam mais amplos (Almeida, 2015).

Por meio do conhecimento adquirido em estudos proteômicos, torna-se possível obter informações cruciais e aprofundar nossa compreensão sobre os principais processos de modificações pós-traducionais. Esse entendimento não apenas propicia avanços na biologia, mas também abre portas para uma integração mais ampla com disciplinas como química, genética e informática. Assim, conseguimos explorar de maneira mais precisa o funcionamento dos processos biológicos, desvendando sua complexidade de forma mais efetiva (Almeida, 2015).

A Proteômica, por meio de seus progressos metodológicos, possibilita a aplicação integrada da eletroforese bidimensional, acoplada a espectrômetro de massas para categorizar e identificar peptídeos potenciais presentes em bancos de dados. Mais recentemente, com o avanço da tecnologia, tornou-se viável empregar a nanocromatografia líquida de ultraperformance em conjunto com o espectrômetro de massas para análises tanto quantitativas quanto qualitativas de proteomas (Almeida, 2015).

### 3.9 Eletroforese bidimensional 2D-PAGE

A análise do proteoma geralmente é realizada utilizando uma combinação de eletroforese em gel bidimensional (2D-PAGE) e Espectrometria de Massas (MS). A 2D-PAGE envolve duas técnicas ortogonais de separação. Esta técnica se baseia em algumas estampas, onde na primeira as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico, através da técnica de focalização isoelétrica. Através da técnica de focalização isoelétrica é possível categorizar duas variações, uma na qual há a utilização de correadores de anfóteros, e a segunda, que utiliza o gradiente de pH imobilizado. Na segunda etapa, as proteínas são separadas com base na sua mobilidade eletroforética através da técnica SDS-PAGE. Após a separação, as proteínas podem ser identificadas e quantificadas por diferentes métodos de coloração, com coomassie, prata ou fluorescência (Meleady, 2018).

Na abordagem proteômica que utiliza gel 2D-PAGE, a fase de eletroforese bidimensional (2D) é considerada a mais trabalhosa e central de todo o processo. É durante essa etapa que se realiza a análise quantitativa, fundamental para identificar proteínas com expressão diferencial (DEPs), as quais servem como base para a seleção de pontos de interesse. Essa seleção desempenha um papel crucial na preparação para a análise subsequente por espectrometria de massas, influenciando diretamente os resultados obtidos nesta etapa (Ono et al., 2024). Além disso, essa metodologia oferece uma visão abrangente do comportamento proteico em diferentes condições, auxiliando na identificação de mudanças na expressão de proteínas relevantes para estudos biomédicos e funcionais.

### 3.10 Interação planta-microrganismo

Os estudos de análise proteômica em cana-de-açúcar geralmente estão focados a algum tipo de estresse, ou a associação de algum microorganismo patogênico, seja ele vírus, bactéria ou fungo, como estresse por patogenicidade (Singh et al., 2019), estresse de salinidade (Chiconato et al., 2021), estresse de altas temperaturas (Gomathi et al., 2024) e estresse abiótico (LI, Ao-Mei et al., 2023).

Compreender os mecanismos pelos quais ocorrem as mudanças nas expressões proteicas da cana-de-açúcar infectada com o *Bacillus subtilis*, é essencial para entender os processos pelos quais a bactéria influencia nessas mudanças. As proteínas alteradas podem ocorrer em diversos órgãos da planta, como as folhas, caule e a raiz. (Planchon et al., 2021; Thumanu, Kanjana et al., 2015).

As análises protéicas são capazes de identificar as alterações nas abundâncias proteicas juntamente com a identificação dos tipos de peptídeos diferencialmente alterados, no qual podem estar relacionados a diferentes funções na planta, sendo defesa, metabolismo secundário, desenvolvimento da planta, metabolismo secundário ou regulação de hormônios vegetais (Blake et al., 2021).

A análise proteômica com esse tipo de interação planta/bactéria pode ajudar na compreensão de como as bactérias burlam o sistema de defesa da planta, já que as plantas possuem um sistema imune altamente poderoso contra patógenos, o que irá responder se essa interação será suscetível ou não dependerá das proteínas na qual a bactéria secreta e se será capaz de passar contra o mecanismo de defesa da planta (Mehta et al., 2008).

O estudo da proteômica em cultura de cana-de-açúcar com a inoculação do *Bacillus subtilis* é pouco relatada, e a identificação de peptídeos produzidos diferencialmente pela planta com a inoculação da bactéria, pode contribuir para o entendimento do funcionamento dos mecanismos das vias metabólicas nas quais elas estão envolvidas, e compreender quais proteínas contribuem para o melhor desenvolvimento da e defesa da planta (LI, Ao-Mei et al., 2023).

Embora os estudos de proteômica em cana-de-açúcar com associação de bactérias tenham avançado nos últimos anos, existem lacunas que precisam ser compreendidas nos mecanismos moleculares dessa associação. Próximas pesquisas proteômicas podem focar na integração de outras técnicas ômicas, como metabolômica e transcriptômica, para obter informações mais abrangentes, conseguir organizar e ser capaz de interpretar melhor todas as informações coletadas por essas técnicas (Li et al., 2020).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material Vegetal e Inóculo

Os cultivares de canas-de-açúcar foram escolhidas de acordo com suas características contrastantes, indicadas pelo catálogo disponível da RIDESA (RIDESA 2024), no qual a cultivar RB92579 (**Figura 07 A**) possui desenvolvimento lento, com maturação média tardia, e um teor de sacarose alto, enquanto a cultivar RB041443 (**Figura 07 B**), possui um desenvolvimento rápido, alto teor de sacarose. A cepa de *B. subtilis* QST713 foi obtida via produto comercial gentilmente cedido por produtores de cana-de-açúcar do município de Primavera, PE, com concentração de 200 g.kg<sup>-1</sup>, em suspensão líquida (10<sup>11</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>). Essa formulação facilita a dissolução em água, garantindo aplicação homogênea. A escolha do fornecedor e da concentração visou garantir a eficácia do *Bacillus subtilis* nos estudos agrônômicos, destacando sua importância no crescimento de plantas e controle de patógenos.

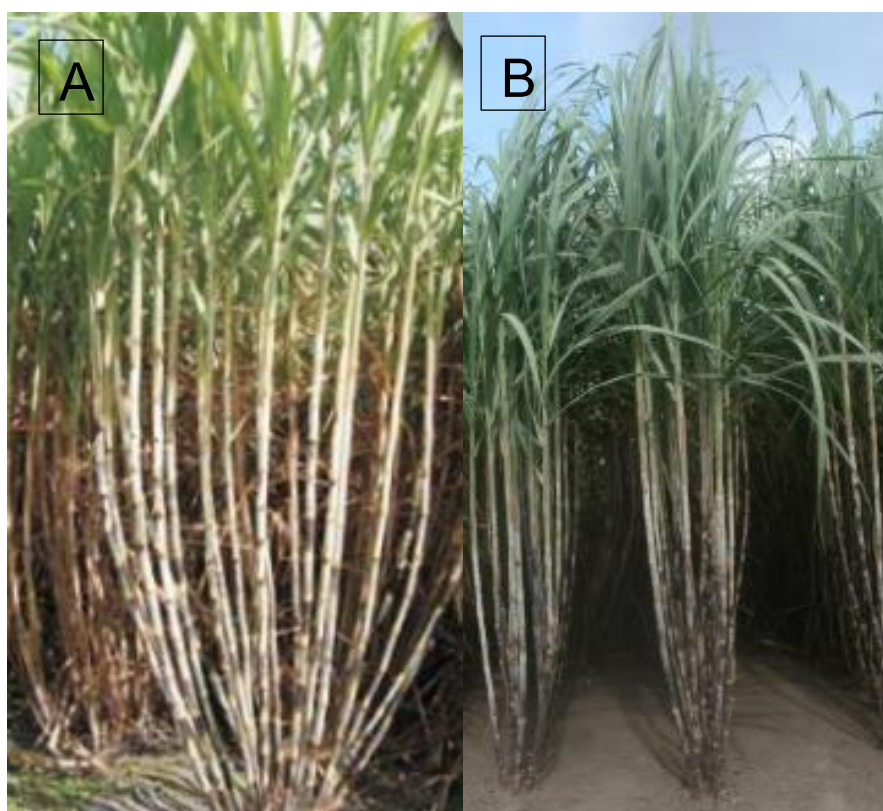


Figura 7 - Figura (A) Imagem ilustrativa da cultivar RB 92579. Figura (B), imagem ilustrativa da cultivar RB041443. Fonte: RIDESA 2010.

### 4.2 Caracterização do local do experimento

O experimento foi conduzido em uma área aberta no Centro Acadêmico de Vitória - CAV - Universidade Federal de Pernambuco, localizado na cidade de Vitória de Santo

Antão - PE. As coordenadas geográficas da universidade são aproximadamente - 8.121747 para latitude e -35.29560 para longitude.

De acordo com a classificação climática de Köppen (1936) Vitória de Santo Antão classifica-se com o clima tropical do tipo As, alternância entre uma estação seca e outra chuvosa, a temperatura média do mês mais alta é em fevereiro com aproximadamente 32°C, enquanto o mês com a temperatura média mais fria é em julho, chegando a entre 21°C. O experimento foi conduzido por um período de 6 meses, que contabiliza desde o início do plantio dos colmos 05/09/2023 até o corte das plantas e coleta das amostras 08/03/2024.

### 4.3 Condução do experimento

Durante a realização do experimento, diversas etapas foram cuidadosamente planejadas e executadas. As principais datas e tópicos dessa condução estão detalhados na **Tabela 02** abaixo:

Tabela 2 - Datas e Principais Tópicos da Condução do Experimento.

01/09/2023	Preparo dos vasos. Foi realizado um furo no fundo do vaso para a evasão do excesso de água; foram colocadas uma camada de brita, e uma cobertura de TNT em cima das britas, após isso, todo o vaso foi preenchido com substrato.
05/09/2023	Plantio de 3 colmos das cultivares que correspondiam ao tratamento, com um espaçamento de 3 cm para cada colmo; e Aplicação das cepas de <i>Bacillus subtilis</i> , na solução de 0,3 L para cada 1 L de água, foi utilizada 3 L para vaso.
06/09/2023	Aplicação do adubo em todos os vasos.
02/10/2023	Aplicação da segunda demanda das cepas de <i>Bacillus subtilis</i> , na solução de 0,3 L para cada 1 L de água.
23/10/2023	Realização do desbaste das canas, para serem deixadas apenas 2 plantas por vaso.

09/03/2024	Realização do corte da cana-de-açúcar, e desmonte do experimento, juntamente com o peso dos colmos e folhas verdes.
------------	---

#### 4.4 Análise do solo

Foi utilizado um solo arenoso, obtido da Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina - EECAC – UFRPE, na qual foi realizada uma análise do substrato, no intuito de avaliar os atributos químicos e sua propriedade, como é possível observar na **Tabela 03** as suas características.

Tabela 3 - Análise do solo utilizado nos experimentos. Onde: H+Al: acidez potencial; SB: soma de bases; CTC: capacidade de troca catiônica; V: saturação de bases; C: C orgânico; M: saturação de Al; MO: matéria orgânica.

mg.dm <sup>-3</sup>					pH	cmol <sub>c</sub> .dm <sup>-3</sup>								%			
Cu	Fe	Mn	Zn	P		K	Na	Al	Ca	Mg	H+A I	SB	CTC	V	C	M	M.O.
0,54	124,5 3	4,2 7	1,5 1	1 0	5,1 2	0,2 4	0,2 3	0,20	3,8 0	2,8 7	5,93	7,1 3	13,0 6	54,6 2	1,41	2,69	2,43

#### 4.5 Preparação dos vasos para plantio

Foram utilizados vasos plásticos do tipo polipropileno (PP) de 60 L, antes do plantio, os vasos receberam melhores condições para o crescimento da planta, os vasos passaram por algumas preparações. Primeiramente na parte inferior de cada vaso, foi feito um furo para que fosse colocado uma mangueira de 1 polegada no tamanho de 15 cm de comprimento, para que a água acumulada no fundo do vaso, escoasse pela mangueira, e caísse dentro de uma garrafa PET de 1 litro (**figura 08 A**).

Foi realizada uma camada no fundo com cerca de 5 cm de pedra esmagada (brita) do tipo 1, que são pedras menores, com função de facilitar o escoamento e evitar a estagnação da água (**figura 08 B**), sobre a brita, foi recortado no tamanho do raio do vaso um tecido não-tecido (TNT) (**figura 08 C**), com objetivo de evitar perda de solo durante o escoamento. E, por fim, foi preenchido por completo com substrato no qual foi plantado a gema da cana-de-açúcar (**figura 08 D**).

Cada vaso recebeu um código para identificação de qual tipo de tratamento e bloco se tratava a cana-de-açúcar estava plantada, como por exemplo: T1 B1, esse tipo de identificação significa que o vaso pertence ao tratamento 1, e ao bloco 1, e assim foi feito para todos os vasos. Cada vaso foi submetido a capacidade de campo, com o objetivo evitar o estresse por déficit hídrico, deixando os vasos em 100% da capacidade de campo, já que o objetivo do trabalho foi avaliar o desenvolvimento da planta.

O solo obtido para o plantio foi adquirido de talhões de cana-de-açúcar da EECAC, juntamente com a torta de filtro (fertilizante orgânico). Foi colocado em cada vaso a proporção de 3:1, aproximadamente 45 kg de solo para 15 kg de torta de filtro.



Figura 8 - Processo de Preparação dos Vasos: (A) Furo realizado no fundo do vaso com mangueira conectada a uma garrafa PET. (B) Camada de pedra esmagada (brita) colocada no fundo do vaso. (C) Cobertura da brita com tecido não-tecido (TNT). (D) Preenchimento dos

#### 4.6 Delineamento de experimento

O delineamento do experimento foi realizado em blocos ao acaso em esquema fatorial 2 x 4 x 6, sendo 2 (cultivares) x 4 (condições de crescimento) x 6 (repetições), totalizando 48 unidades experimentais, descritas na **Tabela 04**.

As condições experimentais (tratamentos) foram distribuídas conforme descrito na tabela a seguir:

Tabela 4 - Descrição dos tratamentos aplicados nos experimentos com os cultivares de cana-de-açúcar RB041443 (crescimento rápido, R) e RB92579 (crescimento lento, L), variando o ambiente, inoculação com *Bacillus subtilis*, e adição de fertilizante.

Ambiente	Tratamento	Inoculação <i>B.subtilis</i>	Fertilizante	Cultivares RB 041443 (cresc. rápido, R) 92579 (cresc. lento, L)
1	1	-	-	R
	2	-	-	L
	3	-	+	R
	4	-	+	L
2	1	+	-	R
	2	+	-	L
	3	+	+	R
	4	+	+	L

O *Bacillus subtilis* foi fornecido utilizando o produto comercial (Doutro agrônomo) (*Bacillus subtilis* linhagem QST713 mínimo de  $1 \times 10^{11}$  UFC/ml de ativo) cuja concentração é  $200,0 \text{ g kg}^{-1}$ , a formulação do produto é em líquido para ser dissolvido na água e ser utilizada.

#### 4.7 Descrição do plantio das cana-de-açúcar de controle

Foi utilizado rebolo de uma gema para o plantio. Realizou-se um sulco com cerca de 25 centímetros no vaso, e foram plantados 3 rebolos do mesmo cultivar com espaçamento de 2 centímetros entre cada rebolo, os rebolos foram colocados no sulco



transversalmente de forma que as gemas ficassem voltadas para o lado, para o melhor desenvolvimento da planta que surgisse (**figura 09**).



Figura 9 - Preparação das covas nos vasos, e plantio de 3 gemas de cada tratamento das gemas de cana-de-açúcar. Fonte: Autor.

Após 2 meses do plantio, foi realizado um desbaste de mudas, foi verificado em cada vaso a quantidade de plantas germinadas, e aqueles que possuíram mais de 2 plantas foram retiradas, para deixar em cada vaso, no máximo 2 brotas.

#### **4.8 Descrição dos tratamentos com *Bacillus subtilis***

O produto comercial das cepas de *Bacillus subtilis* foi dissolvida em uma concentração de 0,3 litros para cada 1 litro de água, as gemas das duas cultivares RB041443 e RB92579 na qual iriam ser aplicadas o tratamento com a bactéria, ficaram submersas na solução de água com *Bacillus subtilis* por cerca de 30 minutos de acordo com o protocolo de Mazzucchelli et al., (2013) em uma concentração de 100 g p.c.ha<sup>-1</sup> dentro de um balde esterilizado com capacidade de 5 L de água e com 0,15 L do produto comercial (**Figura 10**).



Figura 10 - Dissolução do produto comercial de *Bacillus subtilis* dentro de um balde esterilizado, contendo 5 litros de água e com 0,15 litros do produto, alcançando uma concentração de 100 g p.c.ha<sup>-1</sup>. Fonte: Autor.

No momento do plantio das gemas das cana-de-açúcar que iriam receber o tratamento de *Bacillus subtilis*, foi aplicado no sulco a solução de 1 litro na concentração de 100 g p.c.ha<sup>-1</sup> para cada vaso que iria receber o tratamento da bactéria. Ao total foi dissolvido 0,72 litros do produto comercial em 24 litros de água, para ser aplicado nos 24 vasos nas gemas referentes ao tratamento com a bactéria.

Após 30 dias do plantio, uma nova aplicação do produto comercial foi realizada nos mesmos vasos, nas mesmas concentrações e nas mesmas quantidades que foram aplicados no primeiro dia da plantação (**figura 11**).





Figura 11 - Imagem dos brotos de cana-de-açúcar após 30 dias do plantio. Fonte: Autor.

#### 4.9 Condução do experimento

Todos os tratamentos foram suplementados de água igualmente do início ao fim do experimento. Inicialmente foi realizada uma saturação de água em todos vasos até atingirem a capacidade de campo, e a partir de então, foi determinado que os tratamentos não iriam receber deficiência hídrica, se manteriam em 100% da capacidade de campo (**figura 12**).

Os rebolos foram mantidos nos mesmos vasos até o final do experimento, na qual eram identificados por códigos, e todos os dias era realizada a aplicação de água para que os vasos não ficassem abaixo de 100% da capacidade de campo.

Após 57 dias do plantio, quando as gemas brotaram, foi realizada a primeira medição da altura do colmo, e assim seguiu a medição todos os dias até o final do experimento. A medição da altura das plantas foi avaliada da base do colmo até a folha +1, com o auxílio de uma fita métrica.



Figura 12 - Vaso atingindo a capacidade de campo, momento em que o solo atinge sua capacidade máxima de retenção de água, resultando no escoamento através do furo no vaso.

#### 4.10 Avaliação do crescimento

As características avaliadas foram: altura do colmo (AC), diâmetro do colmo (DC), número de colmos (NC), massa fresca da parte aérea (MFPA) e teor de sólidos solúveis (%Brix). A altura do colmo foi medida utilizando uma trena métrica de que vai de 0 até 10 m, o diâmetro do colmo foi medido utilizando um paquímetro digital de 150 mm, o número de colmos foi avaliado por contagem, a massa fresca da parte aérea foi pesada utilizando uma balança digital, e o %Brix, foi avaliado utilizando um refratômetro.

#### 4.11 Análise estatística

Os dados referentes às taxas de crescimento, quantificação de acumulação e quantificação dos pigmentos fotossintéticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o software GraphPad Prisma 9.

A análise de variância conjunta foi realizada em dois contrastes em esquema fatorial: o ambiente no qual houve a aplicação de *Bacillus subtilis* e o outro ambiente no qual não houve a aplicação de *B. subtilis*.

Através do teste de Hartley ( $>QMR$  /  $<QMR$ ), foi verificada a existência de homogeneidades de variâncias residuais, estabelecendo condições de se proceder à análise de variância conjunta de experimentos.

A análise de variância conjunta de experimentos em cada ambiente, considerando inoculação da bactéria e sem inoculação da bactéria foi realizada segundo o modelo estatístico apresentado por Cruz (2006):  $Y_{ijk} = \mu + (b/a)_{jk} + c_i + c_k + ca_{ik} + \varepsilon_{ijk}$

Onde:  $Y_{ijk}$ : observação do i-ésimo cultivar, no j-ésimo bloco dentro do k-ésimo ambiente;

$\mu$ : média geral do ensaio;

$(b/a)_{jk}$ : efeito do bloco j dentro do ambiente k;

$c_i$ : efeito do cultivar i;

$a_k$ : efeito do ambiente k;

$ca_{ik}$ : efeito da interação entre o cultivar i e o ambiente k e;

$\varepsilon_{ijk}$ : erro aleatório associado a observação ijk.

Foram determinados como fixos, os efeitos de médias ( $\mu$ ) e cultivares (c), ambientes (a) e aleatórios os efeitos do bloco (b), interação cultivar x ambientes (ca) e o erro experimental ( $\varepsilon$ ).

#### 4.12 Isolamento Bacteriano

O isolamento bacteriano foi realizado seguindo a metodologia de Zakavi et al. (2022) com modificações. O meio de cultura Luria Bertani (LB) Bertani et al., (1951) foi preparado e esterilizado a 120 °C por 20 minutos a, e as placas foram armazenadas ATM a 4°C em sacos de polietileno. Para o isolamento das bactérias, 1 g de raízes foi suspenso em 2 ml de soro fisiológico estéril (9% p/v NaCl) e agitado em vortex por 1 minuto. Após esse tempo, 100 µl do sobrenadante foram utilizados para diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ . Cada nível de diluição foi preparado em triplicata. Alíquotas de 10µl das diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  foram aplicados na superfície do meio solidificado e espalhados por alças do tipo Drigalski, e incubados em posição invertida a 30°C por 1 a 3 dias na ausência de luz.

Todos os instrumentos utilizados foram esterilizados, e todos os procedimentos de diluição foram realizados dentro de câmara de fluxo laminar vertical esterilizada. As colônias foram isoladas com base nas características morfológicas (cor, formato,

vista superior e lateral e diâmetro), conforme descrito por Zakavi et al. (2022), utilizando uma alça calibrada estéril loop, após 1 dia de incubação. O número de cada isolado foi expresso em unidades formadoras de colônia por 1 g de amostra de raiz (UFC.g<sup>-1</sup>).

A suspensão de *B. subtilis* e a aplicação da bactéria foram feitas em duas diluições para cada tratamento, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-4</sup>. Também foram incluídos controles nas placas: uma placa com aplicação de cepas de *Bacillus subtilis* e outra placa de controle com água estéril. As placas foram deixadas para crescer durante 1 a 3 dias.

#### 4.13 Quantificação dos Pigmentos Fotossintetizantes

O teor de clorofila a, b, totais (a+b) e carotenóides foi determinado por (LICHTENTHALER, 1987). Todo procedimento foi realizado em ambiente fechado, na presença de luz verde, para evitar a degradação da clorofila. Inicialmente 200 mg do tecido vegetal foram macerados em N<sub>2</sub> líquido, solubilizados em 10 ml de acetona 80%. Posteriormente, a solução foi filtrada em papel filtro qualitativo e as seguintes absorbâncias (ABS) foram lidas: 470, 646.8, 663.2 e 710 nm. Esses valores foram utilizados nas equações abaixo para calcular a concentração dos pigmentos fotossintetizantes:

$$\text{Clorofila a (Ca)} = 12,25.ABS_{663.2} - 2,79.ABS_{646.8}$$

$$\text{Clorofila b (Cb)} = 21,50.ABS_{646.8} - 5,10.ABS_{663.2}$$

$$\text{Clorofilas totais C(a+b)} = 7,15.ABS_{663.2} + 18,71.ABS_{646.8}$$

$$\text{Carotenoides (xantofilas + caroteno)} = (1000.ABS_{470} - 1,82.Ca - 85,02.Cb) / 198$$

$$\text{Feofitina (feo)} = \text{Clorofila a (Ca)} = 12,25.ABS_{663.2} - 2,79.ABS_{646.8}$$

$$- 12,25.ABS_{663.2} - 2,79.ABS_{646.8} \text{ (após acidificação do meio).}$$

#### 4.14 Extração de DNA total

DNA total de amostras de raízes e folhas separadamente realizada através do método CTAB Doyle & Doyle (1987) com modificações. Após a extração, a pureza e integridade do DNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Em

seguida as amostras de DNA foram quantificadas em NanoDrop® 2000c, diluídas com água ultrapura autoclavada a 1:100 (30 a 50 ng) e armazenadas a -20°C.

#### 4.15 Amplificações do genes *pycA* via PCR e qPCR

Para caracterização pela técnica de PCR foi utilizado o primer para o gene (**Tabela 5**). Com intuito de confirmar a presença diferencial *B. subtilis* nas amostras coletadas nos tratamentos do experimento. As reações de amplificação foram realizadas conforme descrição de LEE, Gawon et al. (2022), na qual foram: 95°C por 5 min, seguidos por 30 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, e 72°C por 30s , anelamento final a 72°C por 5 min, e finalmente a extensão final de 16°C.

Os produtos finais foram analisados por eletroforese em géis de agarose 1%, em tampão Tris- 55 borato-EDTA/TBE 1X corados com brometo de etídio, e visualizados em transiluminador UV. O tamanho dos produtos de PCR foi determinado utilizando o marcador 1pb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Também foi realizada a técnica de PCR em tempo real (qPCR) para a confirmação da presença diferencial da bactéria entre os tratamentos. Os mesmos primers específicos da região 16s rRNA de *pycA* da **Tabela 05**, foram utilizados para a reação. A reação em cadeia foi realizada no termociclador QuantStudio™ 1 Real-Time PCR System. As reações foram realizadas em volume final de 20 µl usando: 10 µl do mix Speedy qPCR Verde Master Mix (2x) da NZY, 0,8 µl (10 µM) do primer forward, 0,8 µl (10 µM) do primer reverse, 1 µl do DNA para cada diluição (Estoque, 1-1 ao 10-4) e 7,4 µl de água MilliQ autoclavada. A amplificação realizada a 95 °C por 10 min., 40 ciclos a 95 °C por 15 s., 60 °C por 1 min. e 95 °C por 15 s.

Tabela 5 - Primer utilizado para amplificações de genes *pycA*

Gene	Primers	Sequência	Amplicon	Referência
<b><i>pycA</i></b>	pycA-F	FGTCTTCCGTTTCAGGAAAG GC	233 pb	LEE, Gawon et al. (2022).
	pycA-R	GATCTCCCGTTTGGATCG GCT C		

#### 4.16 Extração de Proteínas Totais

A extração das proteínas solúveis totais do material vegetal seguiu o método SDS/Denso descrito por Pirovani et al. (2008). Para o procedimento, utilizou-se 200 g de tecido vegetal previamente macerado em nitrogênio líquido, ao qual foram adicionados 20% de PVPP. O material foi transferido para um microtubo 2mL, e 1 mL

de tampão de extração SDS/Denso foram adicionados (30% de sacarose, 2% de SDS, Tris-HCl 0,1 M pH, e 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol). As amostras foram mantidas sob agitação constante (1500 rpm) a 4°C por 30 minutos em um banho de gelo. Após a incubação, adicionaram-se 1 mL de fenol saturado em Tris-HCl (pH 8,5), e os tubos foram agitados novamente. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 7.850 rpm a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante contendo o fenol foi cuidadosamente transferido para outro tubo Falcon de 50 mL, e 25 mL de acetato de amônio em metanol gelado foram adicionados. As amostras foram então armazenadas a -20°C overnight. Depois, o conteúdo foi centrifugado mais uma vez a 7.850 rpm a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O pellet proteico foi lavado diversas vezes: três vezes com 2 mL de metanol, três vezes com 80% de acetona e uma vez com etanol. Finalmente, o pellet foi solubilizado e ressuspensionado em 150  $\mu$ L de tampão contendo ureia (7M) e tiouréia (2M).

Fragments do gel de SDS-PAGE foram selecionados através da análise do software Gel Analyzer, levando em consideração as bandas que apresentavam diferenças entre os tratamentos com e sem *B. subtilis*. Para garantir a precisão dessa seleção, foi realizada uma análise da intensidade e do volume bruto das bandas utilizando o software Gel Analyzer v. 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/>). Essa análise permitiu identificar os tratamentos controle e tratamento com a inoculação. As bandas proteicas que apresentaram essas diferenças foram cuidadosamente excisadas do gel e submetidas à análise por espectrometria de massas para identificação e caracterização.

### **3.17 Quantificação e Análise da Integridade das Proteínas**

A quantificação das proteínas foi realizada utilizando o método colorimétrico descrito por Bradford (1976), com base em uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) para determinar as concentrações proteicas. Para a medição, 5  $\mu$ L do extrato protéico foram adicionados a 2 mL do reagente de Bradford em tubos de ensaio, que foram agitados em vortex e mantidos em incubação no escuro por 15 minutos. Após esse período, as proteínas foram quantificadas por espectrofotometria, com leituras feitas em 595 nm. As leituras de absorbância (ABS) foram comparadas aos valores obtidos pela equação da curva padrão, permitindo calcular a concentração dos extratos protéicos.



A integridade das proteínas extraídas foi verificada por eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) em um sistema vertical com gel de poliacrilamida a 12% e dimensões de 20 x 20 cm. As proteínas, na concentração de 40 µg, foram misturadas com tampão de amostra 2x (composto de 0,04% de azul de bromofenol, 1,25 mM de TRIS-HCl pH 6,8, 4% de SDS, 23% de glicerol, 10% de β-mercaptoetanol e água milli-Q) na proporção de 1:1. Foi utilizado um marcador de peso molecular baixo (LMW Calibration, GE Life Sciences) para comparação. A eletroforese foi realizada em duas etapas: 1) empilhamento, com parâmetros de 300 W, 17 mA, 120 V por 50 minutos; e 2) separação, com as mesmas condições de 300 W, 34 mA e 120 V por 2 horas e 30 minutos. Ao final, o gel foi fixado em uma solução de 40% de etanol e 10% de ácido acético por 30 minutos, seguido por coloração em uma solução contendo 20% de metanol, 5% de ácido acético, água destilada e 50% de azul de Coomassie (Phastgel Blue G, GE Life Sciences). Após a coloração, o gel foi descorado em uma solução de 20% de etanol e 5% de ácido acético até que o fundo se tornasse translúcido, permitindo a visualização clara das bandas protéicas. Finalmente, os géis foram armazenados em uma solução de 5% de ácido acético para preservação.

#### **4.18 Análise Proteômica Através da Eletroforese em duas Dimensões (2d-Page)**

##### **4.18.1 Focalização isoeletrica (1º dimensão)**

A focalização isoeletrica (IEF) foi realizada no sistema IPGphor III (GE Life Sciences) utilizando fitas de 13 cm com um gradiente linear de pH 3-10 (GE Life Sciences) contendo 250 µg do extrato protéico. As fitas foram hidratadas por 18 horas na IPG-Box (GE Life Sciences) à temperatura ambiente, em uma solução de reidratação composta por uréia (6M), tiouréia (2M), Chaps (2%), azul de bromofenol (1%), DTT (ditiotretitol) e tampão IPG de pH 3-10, totalizando um volume de 250 µL.

Após o período de reidratação, a IEF foi realizada em quatro etapas, seguindo as condições de voltagem: 500 V a 50 V/h, 1.000 V a 800 V/h, 8.000 V a 11.300 V/h e, por fim, 800 V a 2.900 V/h. Durante a IEF, óleo mineral foi utilizado para proteger as fitas contra danos. Ao longo de todo o processo, as condições de corrente foram mantidas constantes em 200 mA. Após a finalização da focalização isoeletrica, as fitas foram armazenadas a -80°C até a execução da segunda dimensão.

##### **4.18.2 2D-PAGE (2º dimensão)**

Para a realização da segunda dimensão (eletroforese), as fitas que haviam passado pela focalização isoeletrica foram equilibradas em dois processos sequenciais. Primeiro, foi realizada a redução das fitas, seguida pela alquilação. As fitas foram imersas em um tampão de equilíbrio contendo 2% de DTT (ditiotretol) e traços de corante azul de bromofenol durante 30 minutos. Em seguida, foram transferidas para uma nova solução de equilíbrio contendo 4% de IAA (iodoacetamida) e novamente traços do corante azul de bromofenol, mantendo-se por mais 30 minutos.

A segunda dimensão, conhecida como eletroforese bidimensional, foi realizada no sistema Omniphor MV 20 (Biosystems) utilizando gel de SDS-PAGE a 12,5%. Cada gel utilizou uma fita de IEF e as etapas de eletroforese foram: 40 mA durante 15 minutos, 80 mA durante 30 minutos e 100 mA por 2,5 horas, mantendo uma voltagem fixa de 300 W e potência de 120 V. Foram produzidos géis em triplicata para cada tratamento analisado. Após a eletroforese, os géis foram mantidos em uma solução fixadora por 30 minutos e, em seguida, imersos em uma solução de coloração por 48 horas. Após esse período, os géis foram descoloridos em uma solução apropriada por 30 minutos. Por fim, os géis foram armazenados em uma solução de preservação.

#### **4.19 Digitalização dos Géis**

Os géis foram digitalizados utilizando o ImageScanner III em conjunto com o software LabScan (GE LifeSciences). Para garantir a qualidade da imagem e a precisão dos dados, foram estabelecidos os seguintes parâmetros de calibração: modo de transparência, resolução de 300 dpi e um filtro vermelho, que se mostrou ideal para a captura de géis corados com azul de Coomassie.

Antes da digitalização, foi realizada uma calibração cuidadosa do scanner utilizando uma fita de calibração Kodak 3, que apresenta valores de densidade óptica ou difusa bem definidos. Esse procedimento é crucial, pois assegura que a digitalização mantenha a integridade e a reprodutibilidade das análises, permitindo uma quantificação precisa das bandas de proteínas.

Adicionalmente, foi adotado um protocolo de manutenção regular do scanner para garantir seu desempenho ideal, e o ambiente de digitalização foi cuidadosamente controlado para minimizar interferências externas, como variações de luz. Essa abordagem rigorosa assegurou que as imagens dos géis fossem de alta qualidade e adequadas para análises quantitativas e qualitativas subsequentes.

#### 4.20 Análise das Imagens

As imagens dos géis foram analisadas utilizando o software ImageMaster 2D Platinum v.7.05 (GE Life Sciences), que fornece uma gama de informações relevantes sobre os spots, incluindo sua localização no gel, ponto isoelétrico (pI), massa molecular (MM) e porcentagem (%) de volume. O software também facilita comparações e inferências estatísticas, como a razão de volume percentual (ratio), que representa a razão entre dois spots correspondentes em um match, o valor da ANOVA e o índice de correlação entre os géis de diferentes tratamentos (scatter plot  $\geq 0,7$ ).

Todos os géis de cada tratamento foram submetidos aos mesmos critérios de análise comparativa para a detecção e seleção de spots, com uma verificação visual minuciosa para eliminar interferências, como bolhas de ar e artefatos resultantes da coloração. Foi realizada uma comparação binária entre os diferentes tratamentos para identificar variações significativas.

Na comparação das triplicatas entre os tratamentos, os spots considerados diferenciais foram aqueles que apresentaram uma razão de variação no parâmetro normalizado de porcentagem de volume (% vol)  $\geq 1,5$  e valor de ANOVA  $\leq 0,05$ .

Esses spots selecionados foram designados como DAPs (proteínas diferencialmente acumuladas), podendo ser comuns entre os tratamentos ou exclusivos a cada um deles. Essa abordagem rigorosa permitiu a identificação precisa de variações proteômicas significativas e contribuiu para uma melhor compreensão das diferenças entre os tratamentos analisados.

#### 4.21 Digestão das bandas SDS-PAGE com Tripsina

Os fragmentos de gel SDS-PAGE contendo as bandas de proteínas, foram cortados manualmente e submetidos a um processo de descoloração em uma solução composta por 50% de metanol e 2,5% de ácido acético, com incubação por 18 horas à temperatura ambiente. Após essa etapa, os fragmentos foram desidratados usando acetonitrila 100%. Para reduzir as proteínas, foi aplicada uma solução de 10 mM de DTT (ditiotretol) em 50 mM de bicarbonato de amônio, seguida de incubação por 30 minutos a 60°C. O líquido foi então removido, e 30  $\mu$ L de uma solução de 10 mM de IAA (iodoacetamida) em 50 mM de bicarbonato de amônio foram adicionados para alquilar as proteínas, sendo incubadas por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente.

Em seguida, o líquido excedente foi descartado, e os fragmentos foram lavados três vezes com uma solução de 100 mM de bicarbonato de amônio e desidratados novamente com acetonitrila 100%. Depois, foi adicionada uma solução de tripsina a 20 ng/μL (em um volume entre 30 e 50 μL), e os fragmentos foram incubados overnight (16 horas) a 37°C em banho seco, para promover a digestão completa das proteínas. Após centrifugação, o excesso de tripsina foi removido e transferido para outro recipiente.

Nos fragmentos restantes, foi adicionada uma solução de extração contendo 5% de ácido trifluoroacético (TFA) em 50% de acetonitrila. Após 40 minutos de incubação em banho de gelo, essa solução foi combinada com o líquido remanescente de tripsina coletado anteriormente. O procedimento de extração foi repetido duas vezes. Finalmente, as amostras foram completamente evaporadas utilizando um evaporador centrífugo Speed-Vac (Eppendorf) e armazenadas a -20°C até que fossem submetidas à análise por espectrometria de massas.

#### **4.22 Digestão dos spots 2D-PAGE com Tripsina**

Os spots selecionados foram excisados manualmente dos géis e incubados em uma solução de descoloração contendo 25 mM de bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) + acetonitrila 50 % durante 12 horas. Após esse período os spots foram imersos em 100 μL de acetonitrila 100 % para desidratação do gel, incubados por 5 min à temperatura ambiente e depois levados ao speed vac para secagem dos spots. Finalizadas estas etapas, adicionou-se cerca de 15 μL de solução de tripsina na concentração de 20 ng.μL<sup>-1</sup> + solução contendo 25 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  nos spots, os quais foram incubado a 37 °C em banho seco, overnight (16h), garantindo a máxima tripsinização da proteína. Em seguida, após um spin, o excesso de tripsina foi removido e transferido para um novo tubo. Ao spot foi adicionada a solução de extração de peptídeos (5 % de ácido trifluoroacético (TFA) em solução com 50 % de acetonitrila), o qual foi mantido durante 30 minutos sob agitação leve, em seguida a solução foi retirada e adicionada à solução remanescente de tripsina. Este procedimento foi realizado duas vezes, totalizando duas extrações. Por fim, as amostras foram totalmente evaporadas, utilizando evaporadores centrífugos tipo Speed-Vac (Eppendorf) e armazenadas a - 20 °C até a realização das análises por espectrometria de massas.

#### **4.23 Análise dos peptídeos trípticos em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)**

Os peptídeos trípticos foram separados usando o sistema M-Class ACQUITY UPLC® (Waters Corporation, Milford, MA). O sistema possui uma coluna de primeira dimensão contendo uma coluna de 5 µm peptide BEH C18 300 µm × 50 mm (nanoEase™), operando a 2 µL/min. A fase móvel A era composta por água contendo 0,1% de ácido fórmico, enquanto a fase móvel B era acetonitrila. Os peptídeos foram eluídos e separados em cinco frações, variando de 11,4% a 50% de fase móvel B, durante 70 min cada fração, com um tempo de carregamento de 9,5 min. A segunda dimensão tinha uma coluna de armadilha de 5 µm C18 180 µm × 20, acoplada a uma coluna analítica de 1,8 µm HS C18 75 µm × 100 mm, operando a 0,4 µL/min a uma temperatura de 35°C. A eluição dos peptídeos foi realizada com o seguinte gradiente: (I) de 3% a 45% de fase móvel B por 46 min e (II) aumento para 90% de fase móvel B, durante 4 min, seguido por uma etapa de equilibrção a 3% de fase móvel B (condições iniciais) por 20 min. O sistema estava acoplado a um espectrômetro de massa quadrupolo Q-ToF Synapt XS (Waters Corporation, Wilmslow, UK) operando a uma resolução de massa de 30 000, Full Width at Half Maximum (FWHM). A voltagem do capilar de Eletrospray (ESI) de baixo fluxo foi de 3 kV, cone de amostragem 40 V; offset de fonte 30 V, temperatura de fonte 100°C, e gás de cone 50 L/min. O analisador de massa tempo de voo (TOF) foi calibrado externamente com uma mistura de NaCsl de m/z 50 a 2000. Para o sinal do lockmass, foi utilizado o GluFibrinopeptídeo B (m/z 785,8426), amostrado a cada 30 s. Os dados foram adquiridos no modo de ionização positiva, usando o modo de aquisição de Espectrometria de Massa de Ultradefinição (UDMSE). Todos os dados foram adquiridos em triplicata.

#### **4.24 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA**

##### **4.24.1 Identificação das proteínas**

Para a análise de PMF (peptide mass fingerprint), os espectros obtidos tiveram seus arquivos peaklist.xml analisados no software Mascot (Matrix Science) usando o método PMF contra os bancos de dados que estão disponíveis na versão online do software (<http://www.matrixscience.com>). Os parâmetros utilizados para as comparações foram: 1) base de dados: NCBIprot, SwissProt; 2) taxonomia: Viridiplantae, Arabidopsis thaliana, Oryza sativa e Other Green Plants; 3) modificação fixa: carbamidometil (C); 4) modificação variável: oxidação (M); e 5) tolerância (peptide

tol) de: 0,1 - 1,2 Da ou 50, 100, 150, 200 ppm. Também foram realizadas buscas no banco de dados da UWPR - University Washington Proteomics Resource (<https://proteomicsresource.washington.edu/mascot/cgi/login.pl>), utilizando os seguintes parâmetros: 1) base de dados: Lemnoideae e Database\_Araceae; 2) taxonomia: All entries; e 3) modificação fixa: carbamidometil (C); 4) modificação variável: oxidação (M); e 5) tolerância (peptide tol) de: 0,1 - 1,2 Da ou 50, 100, 150, 200 ppm.

#### 4.24.2 Ontologia gênica (GO)

As sequências em formato FASTA das proteínas anotadas foram recuperadas do UniProt através da ferramenta Retrieve ID e submetidas à análise de distribuição de ontologia gênica (GO) por processo biológico, função molecular e localização subcelular no programa OmicsBox (<https://www.biobam.com/omicsbox/>), utilizando as ferramentas InterProScan e GO-Slim (MITCHELL et al., 2019). A distribuição de termos GO, ou categorias funcionais, do conjunto das DAPs de cada tratamento foram utilizadas em todas as comparações.

#### 4.25 Expressão de Genes Biomarcadores de Interação Planta-*Bacillus subtilis* POR RT-qPCR

Para determinar quantitativamente possíveis diferenças na expressão de genes de cana-de-açúcar descritos na literatura como responsivos à colonização por *B.subtilis*, será extraído RNA total de amostras de raízes e/ou folhas (100 mg) através do método Trizol Doyle & Doyle, (1987). As amostras de RNA serão analisadas em eletroforese em gel de agarose TAE 1% a 8 V.cm<sup>-1</sup>, quantificadas em espectrofotômetro e utilizadas para síntese de cDNA conforme protocolo descrito por Verma et al., 1972 com modificações. O cDNA de cada amostra será utilizado para análise relativa transcripcional via RT-qPCR, conforme protocolo de Calsa Jr. e Figueira (2007)., utilizando como genes de referência Sucrose-phosphate synthase, nitrato redutase, Phosphoenolpyruvate carboxylase, housekeeping isozyme, phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) e Defensin, para os genes biomarcadores selecionados na literatura específica da área descritos na **Tabela 06**.

Tabela 6 - Descrição dos genes e seus acessos referente a sua referência.

Gane	Acesso	Referência
------	--------	------------

Sucrose-phosphate synthase	A0A059Q356	Fonseca et al. (2022)
nitrate reductase	A0A1Z5RNB1	Fonseca et al. (2022)
Phosphoenolpyruvate carboxylase, housekeeping isozyme	P29193	Fonseca et al. (2022)
phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	A0A1B6QPA5	Fonseca et al. (2022)
Defensin	A0A060AFB6	Yadav et al. (2022)

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação do crescimento

#### 5.1.1 Análise de Crescimento das Plantas nos Tratamentos

Conforme observado no gráfico, o crescimento da cultivar RB041443 foi consistente ao longo do período de 165 dias. O tratamento F-Bs+ apresentou o maior crescimento, atingindo aproximadamente 222 cm ao final do período, representando um aumento de 23,33% em relação ao tratamento F+Bs-, que obteve o menor crescimento. No caso do tratamento F+Bs+, a remoção do fertilizante resultou em uma redução de 10% no tamanho das plantas. Além disso, os tratamentos que incluíram a aplicação de fertilizante, como F+Bs- e F+Bs+, apresentaram resultados inferiores em comparação aos demais tratamentos, sugerindo um efeito positivo da bactéria no crescimento, mesmo na ausência de fertilizante (**Figura 13**).

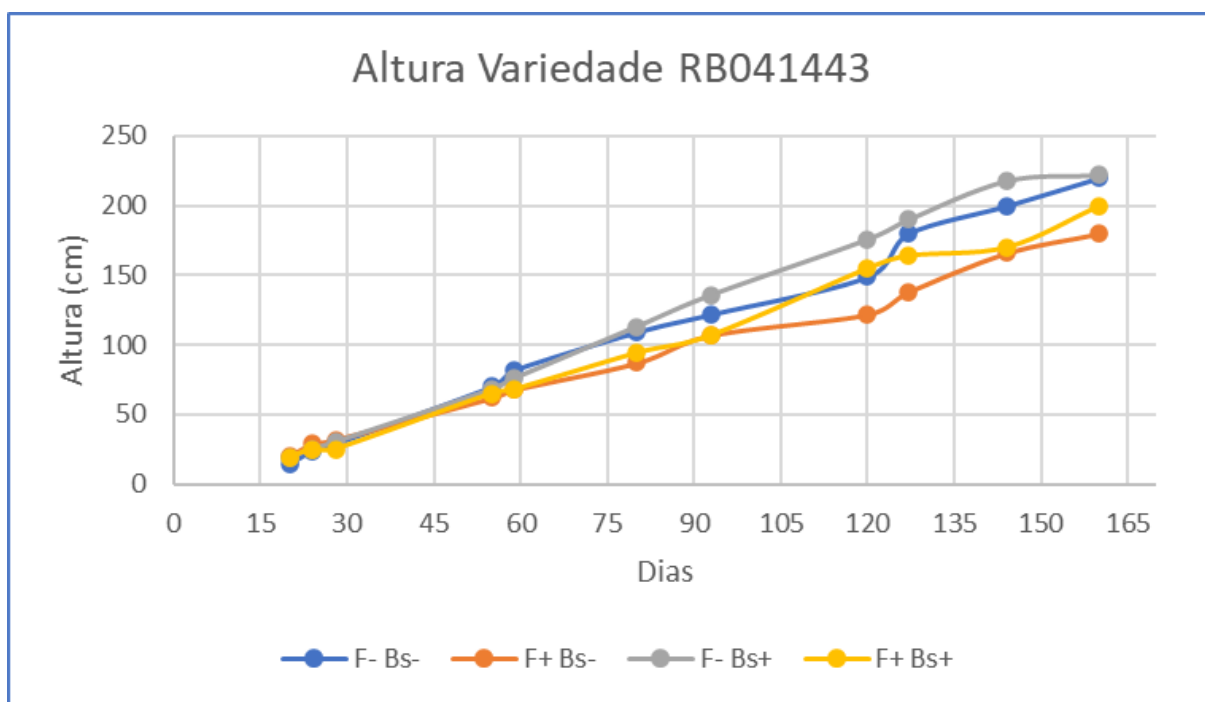


Figura 13 - Crescimento em altura da cultivar RB041443 ao longo de 165 dias, sob quatro tratamentos: F- *B.subtilis*- (sem fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F+ *B.subtilis*- (com fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F- *B.subtilis*+ (sem fertilizante e com *Bacillus subtilis*), F+Bs (com fertilizante e com *Bacillus subtilis*).

No gráfico referente à altura da cultivar RB92579 (**Figura 14**), o padrão de crescimento apresentou algumas diferenças em relação à cultivar RB041443. O tratamento F-Bs+ teve início com uma altura menor comparada aos demais, mas, por volta dos 90 dias, seu crescimento se equiparou aos outros tratamentos. A partir do dia 100, começou a se destacar, encerrando o período como o tratamento de maior desempenho, atingindo aproximadamente 200 cm, um aumento de 21% em relação



ao tratamento F+Bs+, que apresentou o menor crescimento. Os demais tratamentos mantiveram resultados semelhantes ao longo do período, com crescimento constante. No final, os tratamentos F-Bs- e F+Bs- alcançaram 160 cm, enquanto o tratamento F+Bs+ atingiu 158 cm.

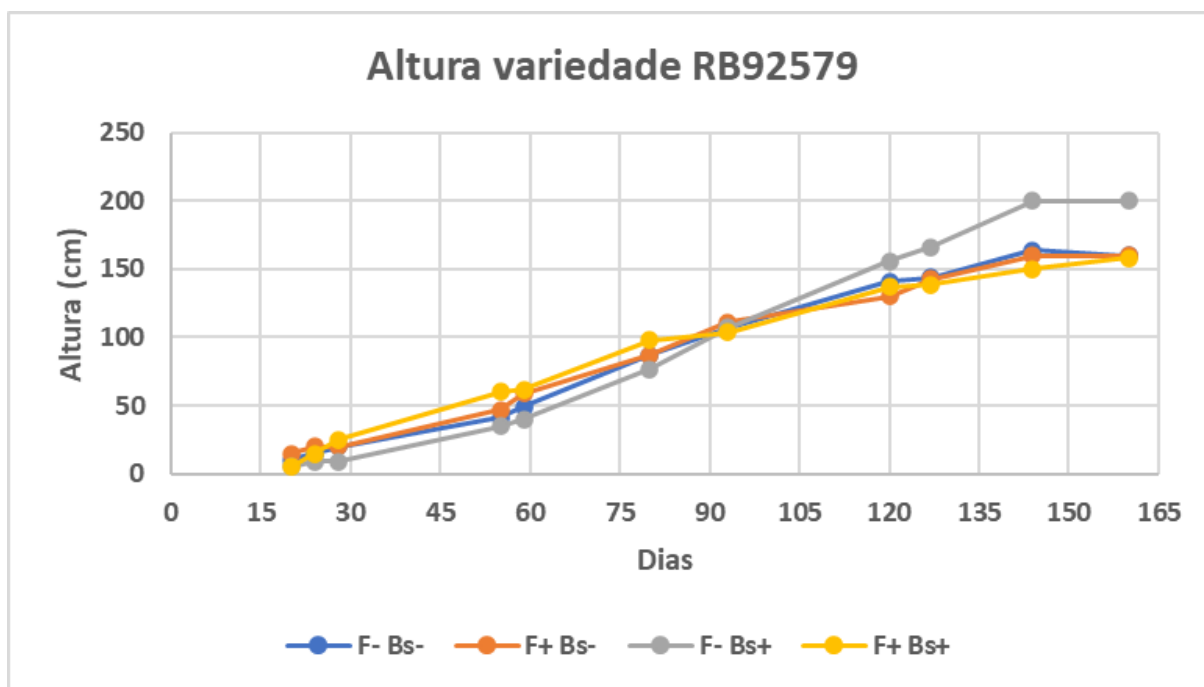


Figura 14 - Crescimento em altura da cultivar RB92579 ao longo de 165 dias, sob quatro tratamentos: F- *B.subtilis*- (sem fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F+ *B.subtilis*- (com fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F- *B.subtilis*+ (sem fertilizante e com *Bacillus subtilis*), F+Bs (com fertilizante e com *Bacillus subtilis*).

### 5.1.2 Análise de Contagem do Número de Colmos da Planta dos Tratamentos

No gráfico referente ao número de colmos entre os tratamentos (**Figura 15**), para as cultivares RB041443 (R) e RB92579 (L), observam-se padrões distintos. Na cultivar "R", quando não há aplicação de fertilizante nem de bactéria, o número médio de colmos é de 3. No entanto, nos tratamentos com F+Bs-, F-Bs+ e F+Bs+, esse número diminui para uma média de 2 colmos. Já na cultivar "L", a ausência de fertilizante e bactéria resulta em um número médio de colmos de 2, desempenho semelhante ao observado no tratamento F-Bs+. Entretanto, nos tratamentos F+Bs- e F+Bs+, o número médio de colmos aumenta para 3. Esses resultados sugerem que, para a cultivar "L", a aplicação de fertilizante tem um impacto positivo no número médio de colmos.

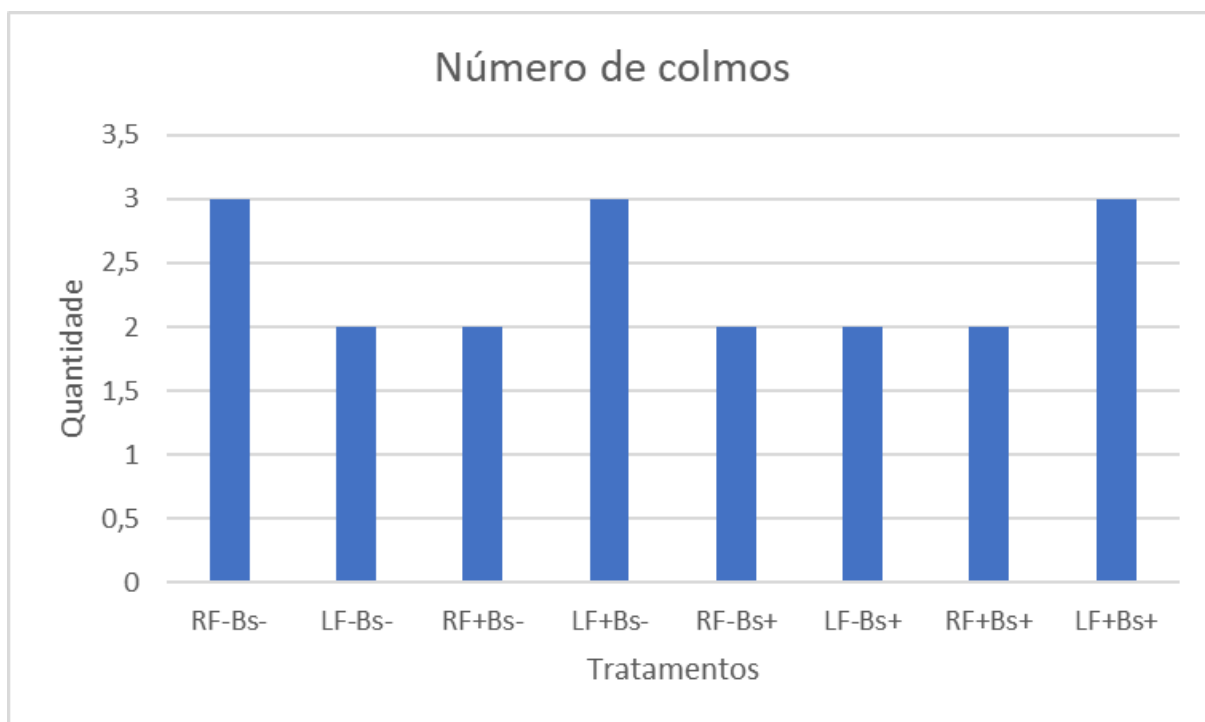


Figura 15 - Número de colmos nas cultivares de cana-de-açúcar RB041443 (R) e RB92579 (L) sob diferentes tratamentos: F- *B.subtilis*- (sem fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F+ *B.subtilis*- (com fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F- *B.subtilis*+ (sem fertiliza com *Bacillus subtilis*), e F+ *B.subtilis*+ (com fertilizante e com *Bacillus subtilis*).

### 5.1.3 Análise do Valor De %Brix Das Plantas nos Tratamentos

A (Figura 16) apresenta os valores de °Brix nas cultivares de cana-de-açúcar RB041443 (R) e RB92579 (L) para os quatro tratamentos avaliados. Na cultivar "R", a ausência de fertilizante e de inoculação bacteriana resultou no menor valor, com uma média de 13 %Brix. No tratamento F+B<sub>s</sub>-, a média aumentou ligeiramente para 13,1 %Brix. Já no tratamento F-B<sub>s</sub>+, observou-se o maior valor para essa cultivar, com uma média de 14,05 %Brix, enquanto o tratamento F+B<sub>s</sub>+ alcançou 13,5 %Brix.

Para a cultivar "L", os resultados seguiram um padrão diferente. A ausência de fertilizante e de inoculação bacteriana apresentou o melhor desempenho, com uma média de 14,5 %Brix. O menor valor foi observado no tratamento F+B<sub>s</sub>+, com uma média de apenas 9,0 %Brix.

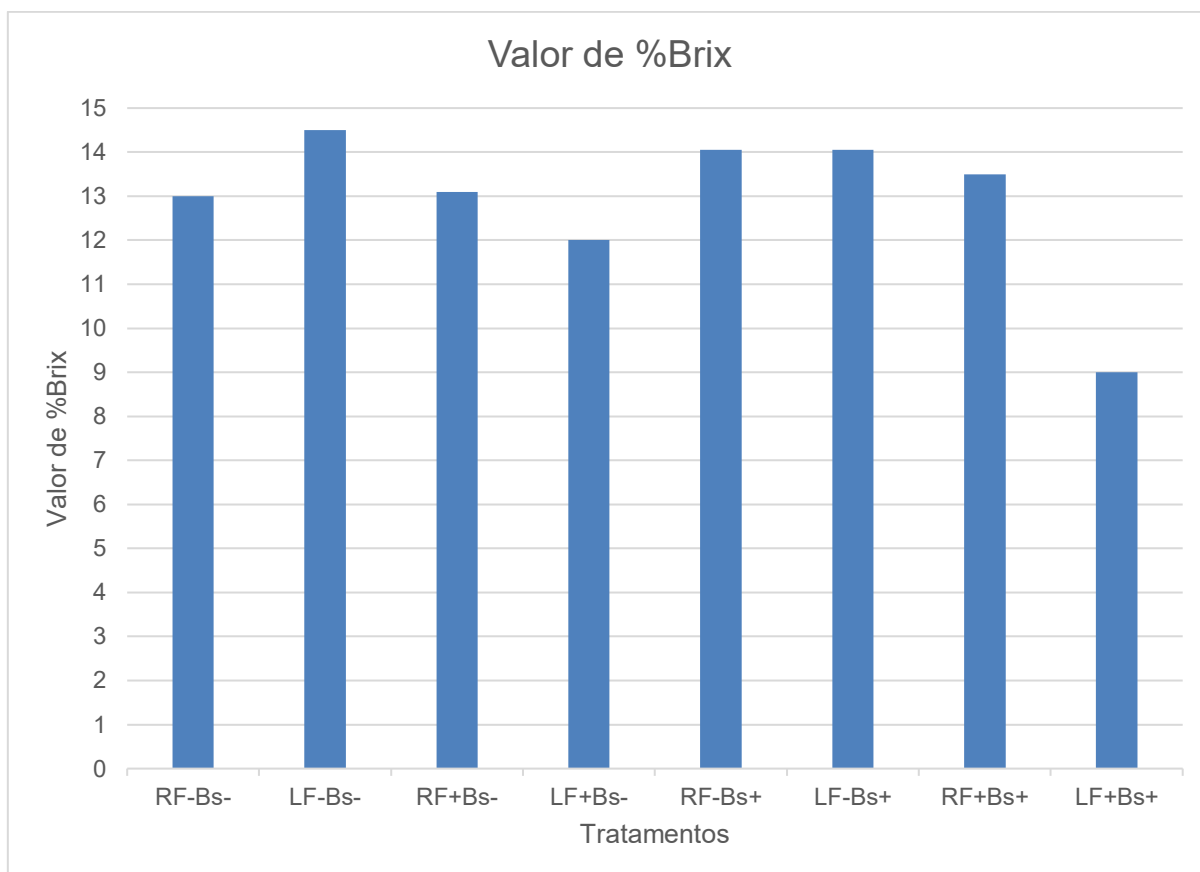


Figura 16 - Valores de °Brix nas cultivares de cana-de-açúcar RB041443 (R) e RB92579 (L) sob diferentes tratamentos: F- *B.subtilis*- (sem fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F+ *B.subtilis*- (com fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F- *B.subtilis*+ (sem fertilizante com *Bacillus subtilis*), e F+ *B.subtilis*+ (com fertilizante e com *Bacillus subtilis*).

#### 5.1.4 Análise do Diâmetro do Colmo das Plantas nos Tratamentos

Foi elaborado um gráfico com as médias do diâmetro dos colmos das cultivares RB92579 (L) e RB041443 (R). Na (**Figura 17**), observa-se o crescimento do diâmetro da cultivar RB041443 (R), com os melhores resultados nos tratamentos F-Bs- e F+Bs+, que apresentaram médias de 27,5 cm e 27,4 cm, respectivamente, representando um aumento de 1,85% em relação ao menor resultado, observado no tratamento F-Bs+. Os tratamentos F+Bs- e F-Bs+ apresentaram médias de 27,1 cm e 27,0 cm, respectivamente, evidenciando pouca diferença significativa entre eles.

Já na (**Figura 18**), os resultados do diâmetro dos colmos da cultivar RB92579 (L) mostram que o tratamento F-Bs+ obteve o melhor desempenho, com uma média de 31,5 cm, um aumento de 10,53% em relação ao menor resultado, registrado no tratamento F+Bs+. O tratamento F+Bs- apresentou uma média de 30,7 cm. Durante o início da avaliação, até por volta dos 135 dias, o tratamento F-Bs+ apresentava resultados muito inferiores aos demais, mas após esse período, seu desempenho se equiparou ao do tratamento F+Bs-.

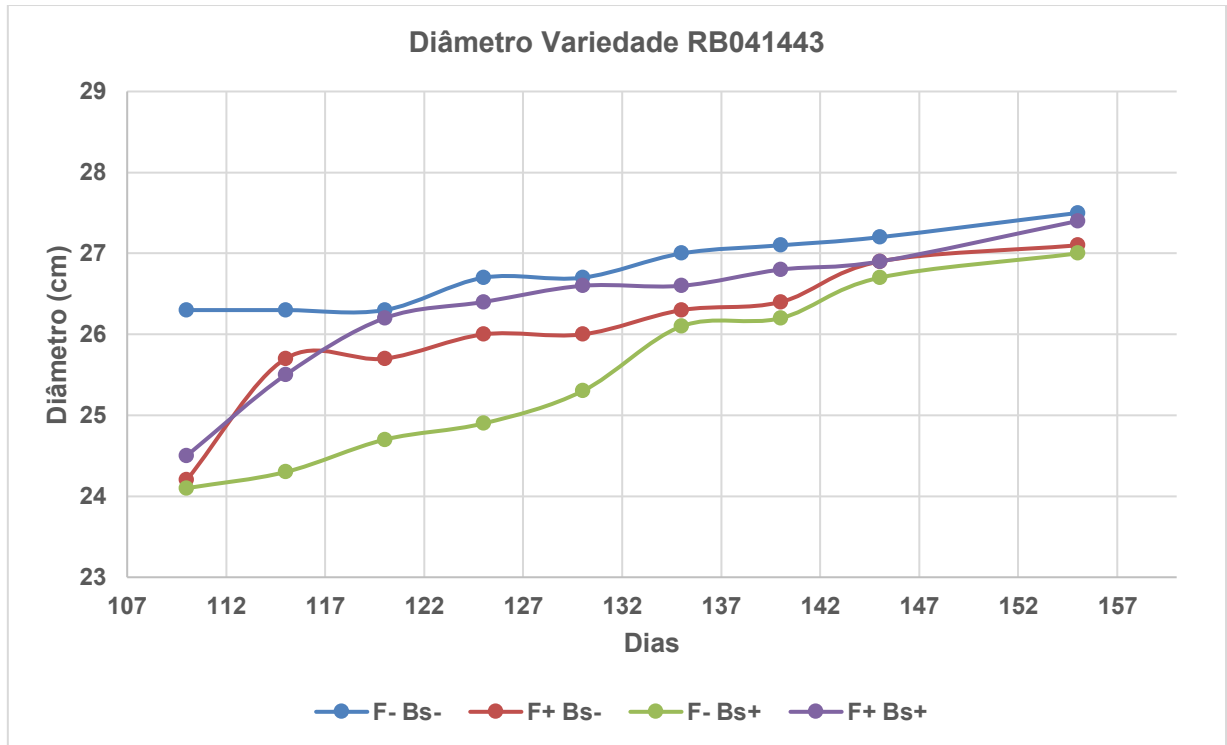


Figura 17 - Diâmetro dos colmos em centímetros da cultivar RB041443 ao longo dos dias, sob quatro tratamentos: F- *B.subtilis*- (sem fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F+ *B.subtilis*- (com fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F- *B.subtilis*+ (sem fertilizante e com *Bacillus subtilis*), e F+ *B.subtilis*+ (com fertilizante e com *Bacillus subtilis*).

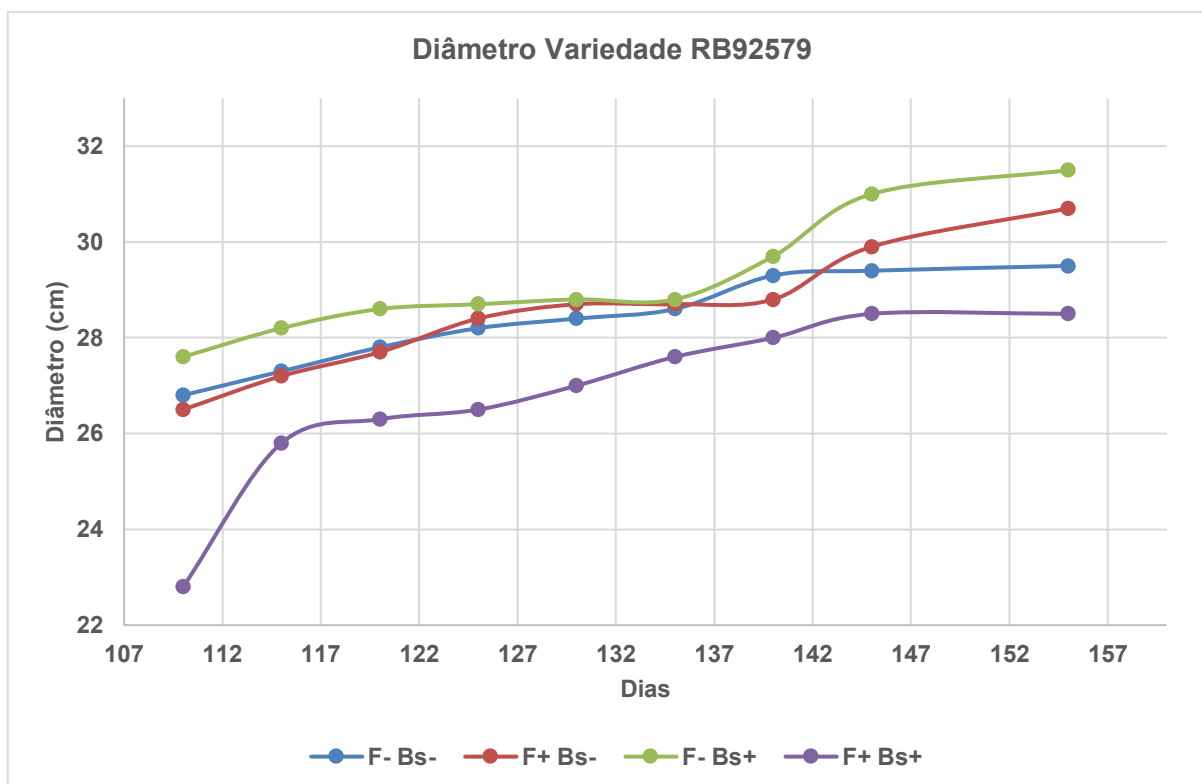


Figura 18 - Diâmetro dos colmos em centímetros da cultivar RB041443 ao longo dos dias, sob quatro tratamentos: F- *B.subtilis*- (sem fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F+ *B.subtilis*- (com fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F- *B.subtilis*+ (sem fertilizante e *subtilis*), F- *B.subtilis*+ (sem fertilizante e com *Bacillus subtilis*), e F+ *B.subtilis*+ (com fertilizante e com *Bacillus subtilis*).

## 5.2 Peso Fresco

A **Figura 19** apresenta os valores de peso fresco, considerando folhas e caule, das cultivares de cana-de-açúcar RB041443 (R) e RB92579 (L) para os quatro tratamentos avaliados. Em ambas as cultivares, os tratamentos F-Bs- apresentaram os menores pesos em comparação com os demais tratamentos. O destaque foi para os tratamentos F+Bs-, que registraram os melhores resultados: uma média de 2,62 kg para a cultivar "L" e o maior peso, 2,93 kg, para a cultivar "R".

Os tratamentos F+Bs+ também se destacaram, apresentando resultados semelhantes aos observados nos tratamentos F-Bs+, que igualmente mostraram desempenhos próximos.

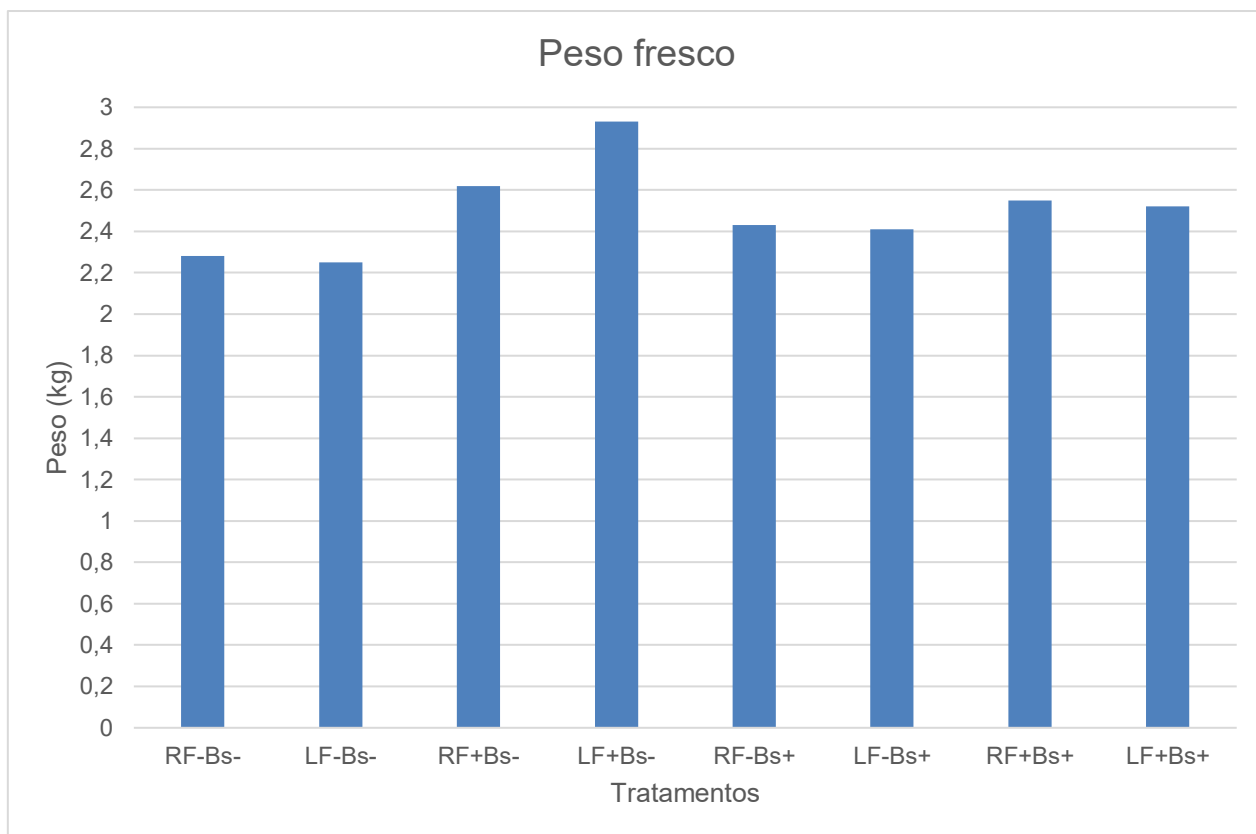


Figura 19 - Valores de peso fresco nas cultivares de cana-de-açúcar RB041443 (R) e RB92579 (L) sob diferentes tratamentos ao final do período: F- *B.subtilis*- (sem fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F+ *B.subtilis*- (com fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F- *B.subtilis*+ (sem fertilizante e com *Bacillus subtilis*), e F+ *B.subtilis*+ (com fertilizante e com *Bacillus subtilis*).

### 5.3 Peso Folha seca

A **Figura 20** apresenta o gráfico do peso das folhas secas das cultivares de cana-de-açúcar RB041443 (R) e RB92579 (L) para os quatro tratamentos avaliados. Os resultados seguem o mesmo padrão observado no peso fresco: o tratamento F-Bs- apresentou os menores valores para ambas as cultivares, indicando que a aplicação de fertilizante ou a inoculação da bactéria aumenta o peso seco das folhas. O maior peso foi registrado na cultivar "L" com o tratamento F-Bs+, atingindo 76,32 g, seguido pelo tratamento F+Bs-, com 69,0 g.

Na cultivar "R", o tratamento controle F-Bs- apresentou um aumento no peso seco quando comparado aos tratamentos com intervenções. O aumento foi de 23,93% com F+Bs-, 13,32% com F-Bs+ e 13,54% com F+Bs+, mostrando uma resposta positiva às aplicações.

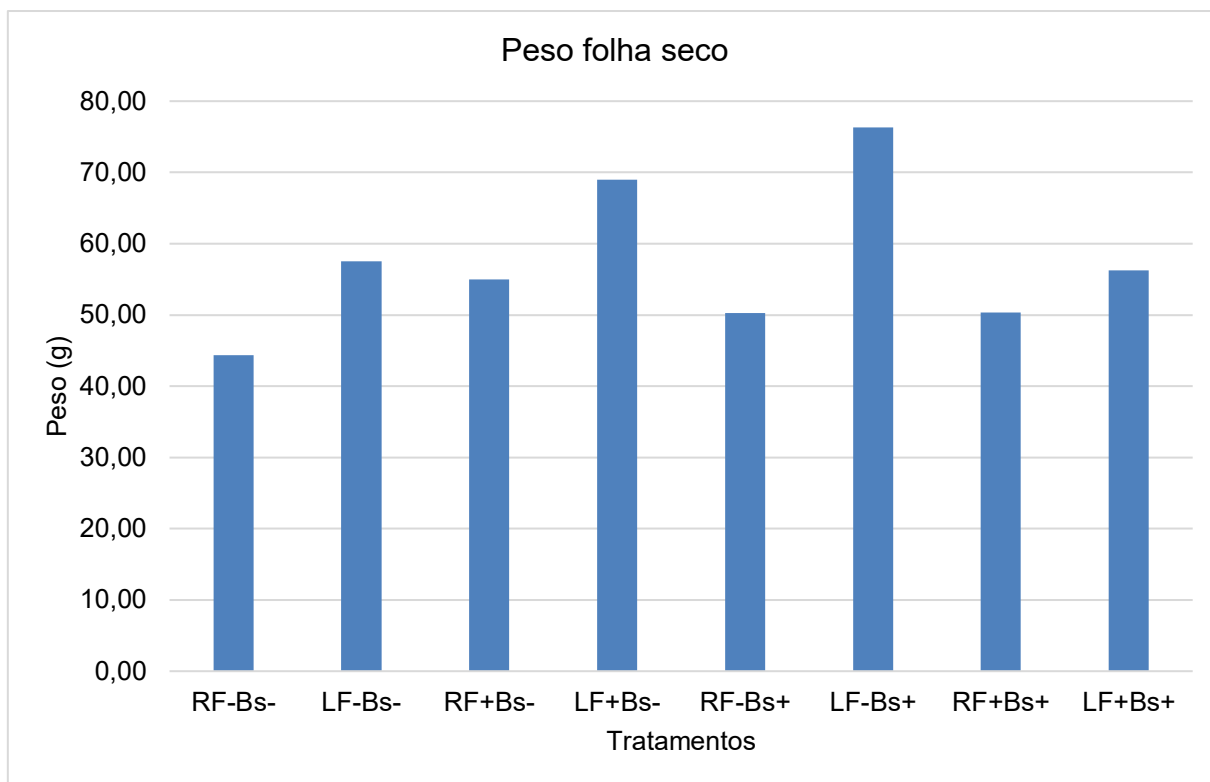


Figura 20 - Valores de peso da folha seca nas cultivares de cana-de-açúcar RB041443 (R) e RB92579 (L) sob diferentes tratamentos ao final do período: F- *B.subtilis*- (sem fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F+ *B.subtilis*- (com fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F- *B.subtilis*+ (sem fertilizante e com *Bacillus subtilis*), e F+ *B.subtilis*+ (com fertilizante e com *Bacillus subtilis*).

#### 5.4 Peso Colmo seco

A **Figura 21** apresenta o gráfico do peso dos colmos secos das cultivares de cana-de-açúcar RB041443 (R) e RB92579 (L) para os quatro tratamentos avaliados. Diferentemente do padrão observado no peso fresco e no peso das folhas secas, os resultados para o peso dos colmos secos foram mais uniformes entre os tratamentos. O único destaque foi o tratamento F+Bs+ na cultivar "R", que apresentou o maior peso, com 178,7 g, representando um aumento de 6,24% em relação ao tratamento controle F-Bs-. Por outro lado, na cultivar "L", o tratamento F+Bs+ registrou o menor peso, com 141 g, uma redução de 16,17% em comparação ao controle F-Bs-.

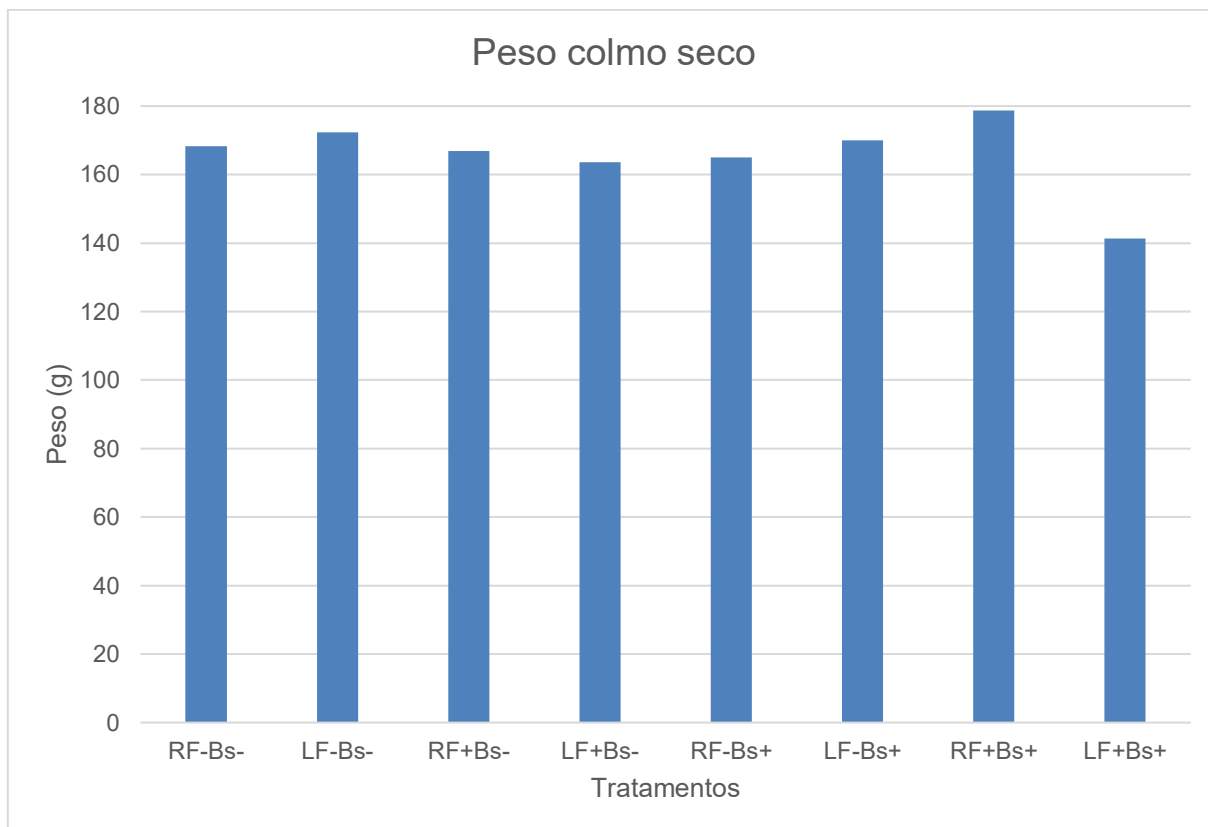


Figura 21 - Valores de peso do colmo seco nas cultivares de cana-de-açúcar RB041443 (R) e RB92579 (L) sob diferentes tratamentos ao final do período: F- *B.subtilis*- (sem fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F+ *B.subtilis*- (com fertilizante e sem *Bacillus subtilis*), F- *B.subtilis*+ (sem fertilizante e com *Bacillus subtilis*), e F+ *B.subtilis*+ (com fertilizante e com *Bacillus subtilis*).

### 5.5 Análise de variância conjunta

A análise de variância não revelou diferenças significativas entre os tratamentos (cultivares), entre os ambientes (sem inoculação e com inoculação) e entre a interação tratamentos x ambientes. Entretanto, excepcionalmente, com relação à característica diâmetro de colmos, foi revelado diferenças significativas para a fonte de variação T x A (**Tabela 07**).

Isso indica que o tratamento relacionado ao diâmetro do colmo, para as cultivares de cana-de-açúcar RB92579 e RB041443, apresentou um desempenho distinto na presença e na ausência de *Bacillus subtilis*.

Tabela 7 - Resumo da análise de variância conjunta avaliada em dois ambientes distintos (Sem inoculação e com inoculação de *Bacillus subtilis*) no experimento conduzido no Centro Acadêmico de Vitória de em 08/03/2024

\*\* e \* Significativo a 1 e 5% de probabilidade respectivamente, pelo teste F

<sup>ns</sup>, não significativo, pelo teste F

T x A Interação tratamento x ambientes

C.V Coeficiente de variação



Fonte: Autor.

F.V.	Quadrados médios					
	G.L	AC	DC	NC	MVPA	BRIX
Tratamentos	3	0,14 <sup>ns</sup>	1,39 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,43 <sup>ns</sup>	4,28 <sup>ns</sup>
Ambientes	1	0,004 <sup>ns</sup>	0,46 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	7,16 <sup>ns</sup>
T x A	3	0,08 <sup>ns</sup>	<b>15,43*</b>	0,01 <sup>ns</sup>	0,22 <sup>ns</sup>	6,87 <sup>ns</sup>
Resíduo	30	0,06	4,82	0,09	0,27	3,29
Médias		2,16	25,96	2,10	2,49	12,53
C.V (%)		11	8,45	14,32	20,0	14,47
>QMR / <QMR		2,03	1,07	2,16	1,24	1,46

5.6 Comparação de médias

Foi constatado que houve diferença significativa entre os ambientes com relação à característica diâmetro de colmos no cultivar RB92579 (desenvolvimento lento), onde a média do diâmetro do colmo foi maior no ambiente que recebeu a aplicação de *B.subtilis* **Tabela 08**.

Tabela 8 - Comparação de médias dos caracteres avaliados em dois ambientes distintos (Sem inoculação e com inoculação de nome da *Bacillus subtilis*) em experimento conduzido no Centro Acadêmico de Vitória em 08/03/2024.

Caracteres						
Tratamentos	AC		DC		NC	
Ambientes	I	II	I	II	I	II
1	2,19aA	2,27abA	26,78aA	25,80aA	2,07aA	2,06aA
2	2,06aA	2,18abA	<b>24,28aB</b>	<b>27,71aA</b>	2,11aA	2,01aA
3	2,20aA	2,30aA	25,48aA	25,50aA	2,12aA	2,11aA
4	2,13aA	1,90bA	26,93aA	25,85aA	2,14aA	2,14aA

Médias seguidas da mesma letra na horizontal e vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

- I. Sem inoculação de *Bacillus subtilis*
- II. Com inoculação de *Bacillus subtilis*

Tabela 9 - . Continuação  
Médias seguidas da mesma letra na horizontal e vertical não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Caracteres				
Tratamentos	MVPA		BRIX	
Ambientes	I	II	I	II

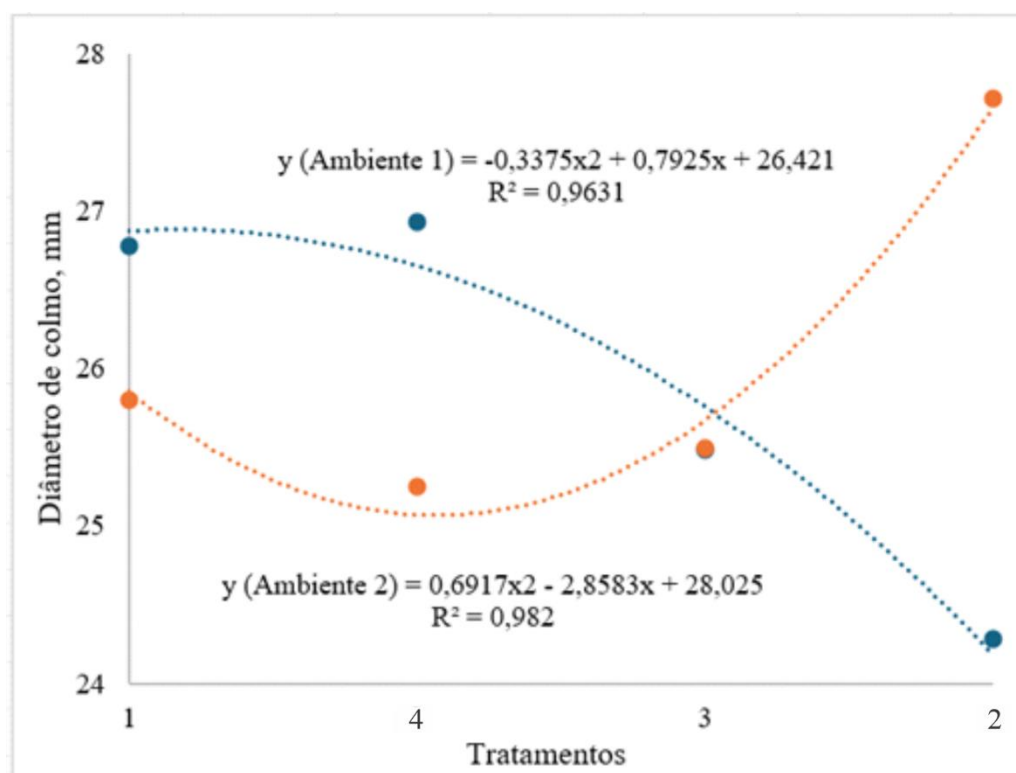
1	2,27aA	2,42aA	11,77aA	12,92aA
2	2,25aA	2,40aA	13,43aA	12,65aA
3	2,61aA	2,55aA	13,05aA	10,49aB
4	2,93aA	2,51aA	13,38aA	12,50aA

I. Sem inoculação de *Bacillus subtilis*

II. Com inoculação de *Bacillus subtilis*

### 5.7 Análise de regressão

O coeficiente de determinação acima de 96% no ambiente 1 e acima de 98% no ambiente 2 revela um excelente ajuste dos dados aos modelos de regressão linear utilizados (**Figura 22**). A análise de regressão demonstra o desempenho dos cultivares em relação à característica diâmetro de colmos em seus respectivos ambientes, indicando que o cultivar RB92579 apresentou maior diâmetros quando inoculado com a bactéria *B.subtilis*.



Diâmetro de colmo

Tratamentos

Ambiente sem *B.subtilis*

Ambiente com *B. subtilis*

1	26.78	25.8
4	26.93	25.25
3	25.48	25.5
2	<b>24.28</b>	<b>27.71</b>

Figura 22 - Resumo da análise de regressão do caractere diâmetro de colmos avaliado em dois ambientes distintos (Sem inoculação e com inoculação da *Bacillus subtilis*) em experimento conduzido no Centro Acadêmico de Vitória em 08/03/2024. Fonte: Autor.

### 5.8 Isolamento Bacteriano

Após 2 dias, observou-se a presença de algumas colônias bacterianas, nos tratamentos 2 com inoculação de *B. subtilis* na diluição  $10^{-2}$ , tratamento 3 sem inoculação de *B. subtilis* para diluição  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$ , no tratamento 4 com inoculação de *B. subtilis* para diluição  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  e no Controle *B. subtilis*. Comparativamente, as características morfológicas sugerem tratar-se de *B. subtilis* para os tratamentos T3 e T4, em que houve inoculação com tal bactéria. As características morfológicas, tais como tamanho, forma circular e colocação esbranquiçada das colônias, foram selecionadas para identificá-las como *B. subtilis* (**Figura 23**).

**T. C. sem Bs**



**T. C. Com Bs**



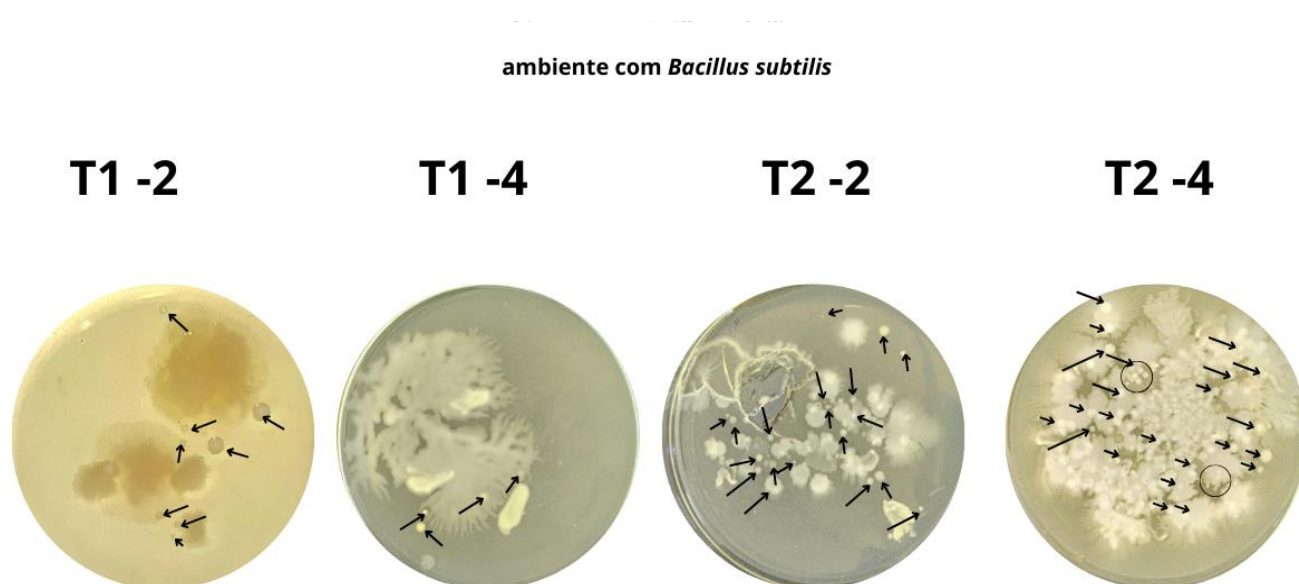


Figura 23 - Placas em meio LB para o crescimento bacteriano com setas que sugerem ser colônias de *B. subtilis*, o “T” seguido do número refere-se ao tipo do tratamento, e a respectiva diluição. T1 -2 (Tratamento 1 para a diluição de 10<sup>-2</sup>). TA: Tratamento controle com água destilada; TB: Tratamento controle com *Bacillus subtilis*.

### 5.9 Quantificação da colonização por *Bacillus subtilis* por qPCR

A (Figura 24) apresenta o gel de agarose a 1,2% de eletroforese dos produtos de PCR convencional obtidos a partir de amostras de DNA extraídas de folhas e raízes de cana-de-açúcar, com e sem inoculação de *Bacillus subtilis*. As amostras foram analisadas para verificar a presença do DNA bacteriano nas diferentes partes da planta e em diferentes cultivars de cana.

A primeira linha do gel (M) corresponde ao marcador molecular de 100 pares de bases (pb), utilizado como referência para o tamanho dos fragmentos amplificados. As amostras 1 e 2 representam o DNA extraído de folhas das cultivars RB041443 e RB92579, respectivamente, sem inoculação com *B. subtilis*. As amostras 3 e 4 correspondem ao DNA extraído de folhas das mesmas cultivars, porém inoculadas com a bactéria. A amostra 5 é um controle negativo (sem DNA de *B. subtilis*), enquanto a amostra 6 é um controle positivo (com DNA de *B. subtilis*).

Para as raízes, as amostras 7 e 8 representam o DNA das cultivars RB041443 e RB92579, respectivamente, sem inoculação com a bactéria, enquanto as amostras

9 e 10 são das raízes das mesmas cultivars com *B. subtilis*. As amostras 11 e 12 correspondem a um controle negativo e a um controle positivo, respectivamente.

Os resultados mostram bandas nas amostras positivas (3, 4, 6, 9, 10 e 12), indicando a presença de *Bacillus subtilis* nas amostras inoculadas e no controle positivo, enquanto as amostras negativas (1, 2, 5, 7, 8 e 11) não apresentam bandas, confirmando a ausência da bactéria.



Figura 24 - Gel de agarose a 1,2% de eletroforese dos produtos de PCR para detecção de *Bacillus subtilis* em amostras de DNA de folhas e raízes de cana-de-açúcar das cultivars RB041443 e RB92579, com e sem inoculação bacteriana. M: marcador molecular de 100 pb; 1-2: folhas sem bactéria (1: RB041443, 2: RB92579); 3-4: folhas com bactéria (3: RB041443, 4: RB92579); 5: controle negativo; 6: controle positivo; 7-8: raízes sem bactéria (7: RB041443, 8: RB92579); 9-10: raízes com bactéria (9: RB041443, 10: RB92579); 11: controle negativo; 12: controle positivo. Bandas visíveis nas amostras inoculadas e no controle positivo confirmam a presença de *B. subtilis*.

### 5.10 qPCR

A amplificação por qPCR mostrou que o gene *pycA* na cana-de-açúcar, teve uma amplificação para o tratamento “LC” tratamento cultivar RB92579 Lento inoculado com *Bacillus subtilis*. teve uma amplificação por volta do ciclo 14 (**Figura 26**), oque indica uma maior quantidade de DNA de *Bacillus subtilis* comparado ao tratamento “LS” que se refere ao tratamento cultivar RB92579 Lento “LS” sem *Bacillus subtilis*. Que teve amplificação do gene *pycA* por volta do ciclo 18 (**Figura 25**).

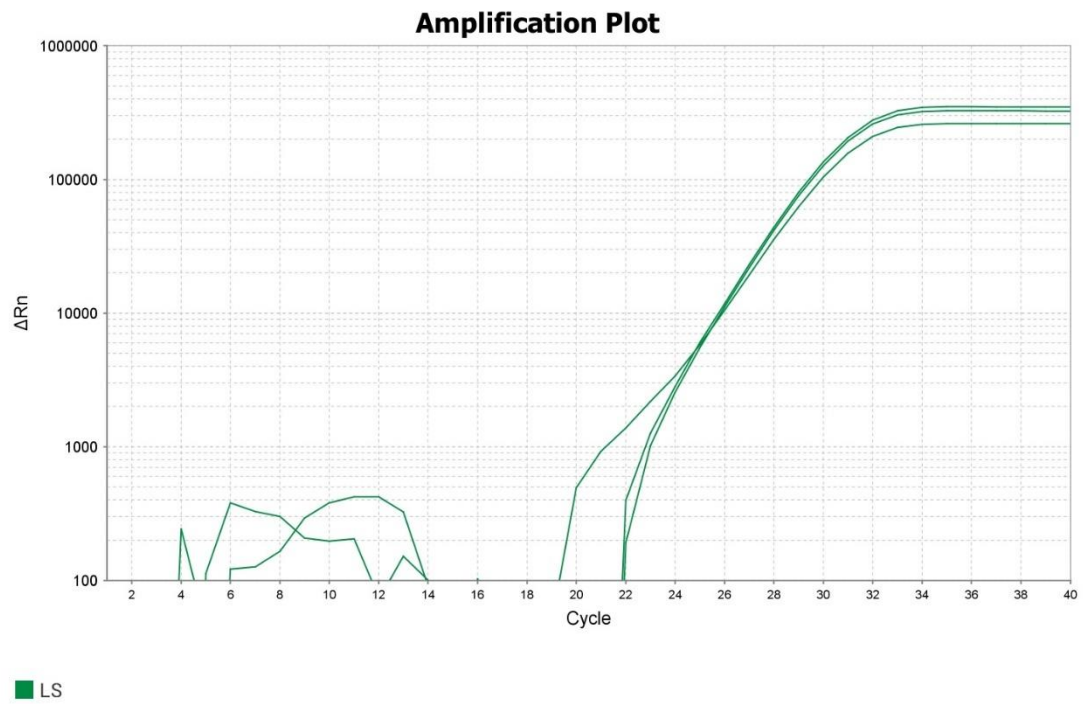


Figura 25 - Amplificação do do gene *pycA* em cana-de-açúcar por qPCR para o tratamento cultivar RB92579 Lento “LS” sem *Bacillus subtilis*.

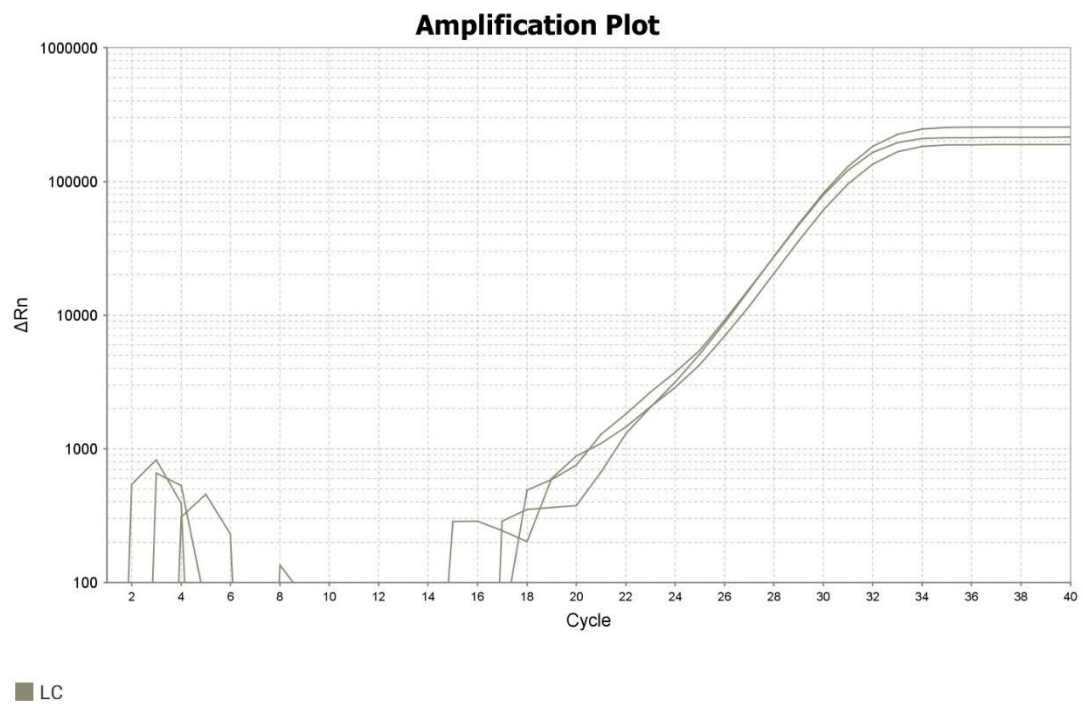


Figura 26 - Amplificação do do gene *pycA* em cana-de-açúcar por qPCR para o tratamento cultivar RB92579 Lento “LC” inoculado com *Bacillus subtilis*.

### 5.11 Quantificação de Pigmentos Fotossintéticos

A quantificação das clorofilas A, B e total (A+B) indicou variações significativas entre os tratamentos aplicados nas cultivars de cana-de-açúcar RB041443 e RB92579, após 180 dias de tratamento. Na cultivar RB041443 sem *Bacillus subtilis*, foram encontrados valores de 8,5 g.kg de MS para clorofila A, 3,6 g.kg de MS para clorofila B e 12 g.kg de MS para clorofila total. Já com o tratamento com *B. subtilis*, esses valores aumentaram para 18,7 g.kg de MS para clorofila A, 9,9 g.kg de MS para clorofila B e 28,7 g.kg de MS para clorofila total, um aumento percentual em 120% para a clorofila A, 175% para a clorofila B, e 139,17% para clorofilas totais. De forma semelhante, a cultivar RB92579 sem a aplicação de *B. subtilis* apresentou valores de 8,9 g.kg de MS para clorofila A, 4,01 g.kg de MS para clorofila B e 12,9 g.kg de MS para clorofila total, já para o tratamento que houve a aplicação de *B. subtilis*, os resultados foram de 18,7 g/kg de MS para clorofila A, 9,9 g/kg de MS para clorofila B e 28,6 g/kg de MS para clorofila total com o tratamento. Estes resultados sugerem que a presença de *Bacillus subtilis* promoveu um aumento significativo nos níveis de clorofilas e carotenóides em ambas as cultivars, indicando uma influência positiva do tratamento sobre a capacidade fotossintética e a saúde das plantas.

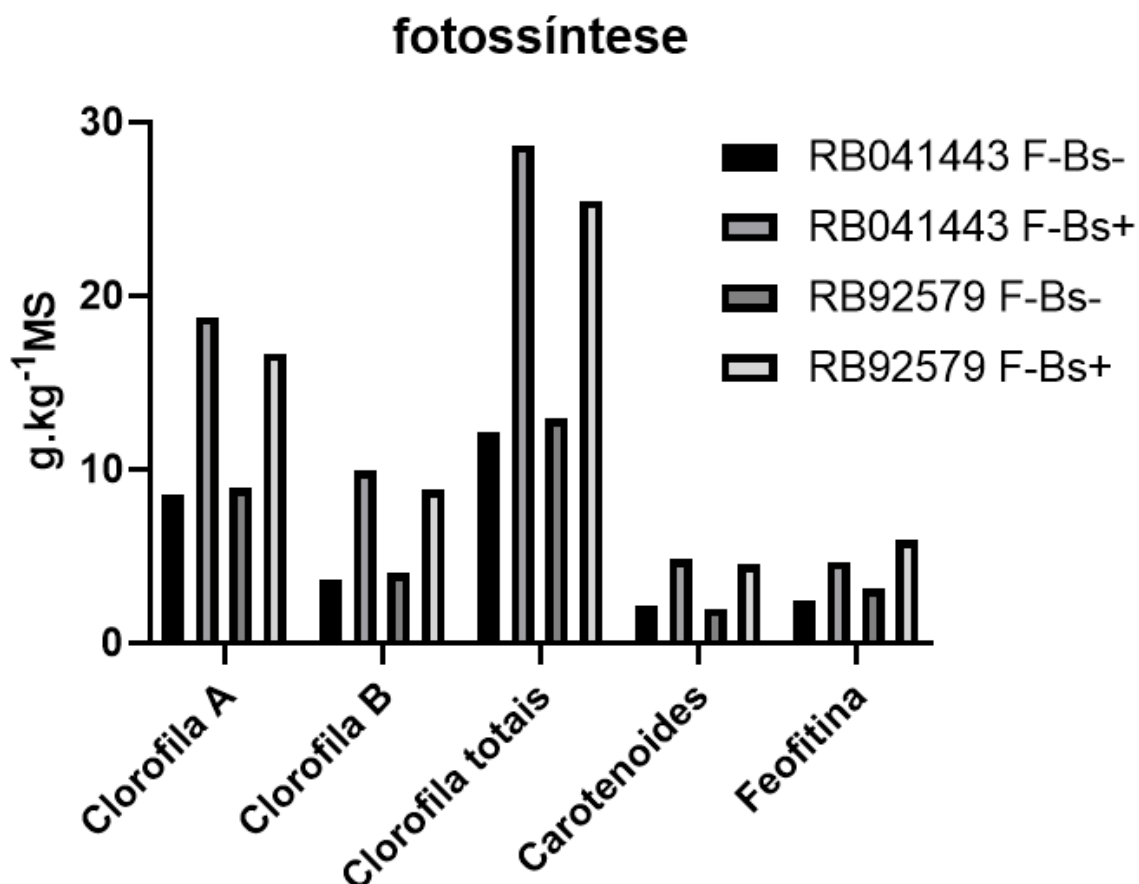


Figura 27 - Quantificação de clorofilas A, B, totais (A+B) e carotenóides em duas cultivares de cana-de-açúcar (RB041443 e RB92579) com e sem tratamento com *Bacillus subtilis*, após 180 dias de cultivo. Diferenças significativas entre tratamentos são indicadas por asteriscos ( $p < 0,001$ ).

### 5.13 Análise Proteômica SDS-PAGE

O método de extração proteica usando SDS-Denso, conforme descrito por Pirovani (2011), possibilitou a obtenção de proteínas totais solúveis em uma ampla faixa de massas moleculares. A eficiência desse método e a integridade das proteínas extraídas podem ser verificadas pelo perfil de migração em gel eletroforético SDS-PAGE. Além disso, observa-se a ausência de substâncias interferentes (**Figura 28**).

Também foi realizada uma identificação e seleção de spots do gel 2-D PAGE enumerados de 1 a 20 (**Figura 29**).



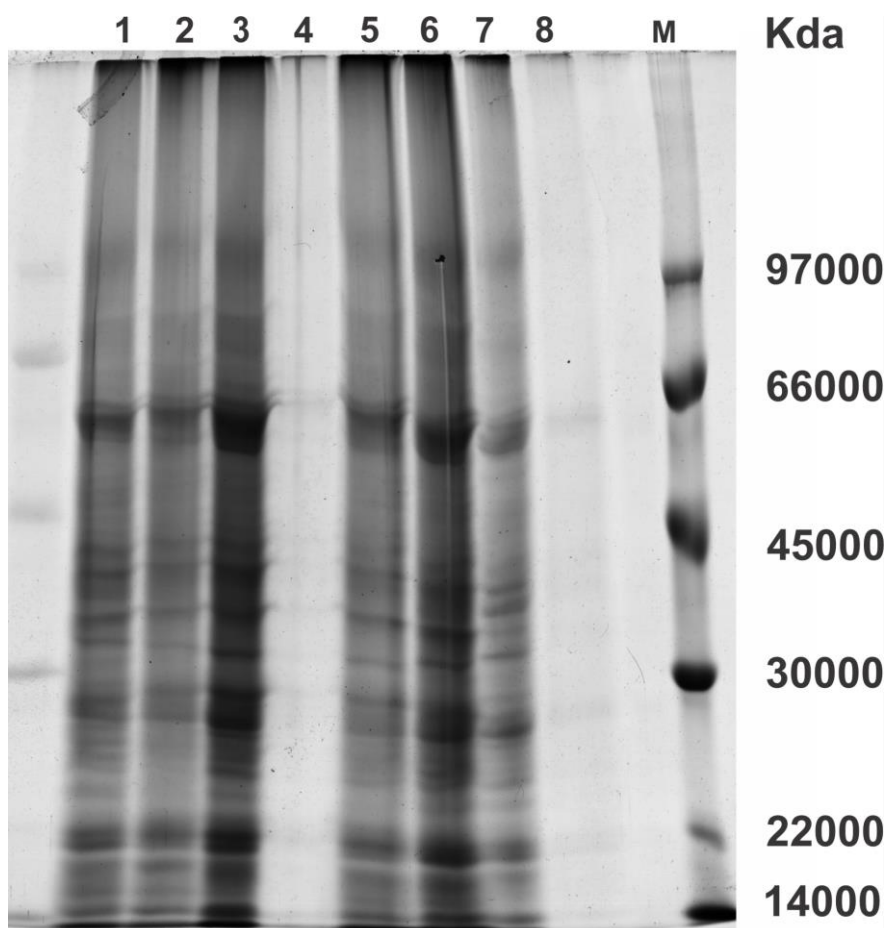


Figura 28 - SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12,5% das proteínas solúveis totais de cana-de-açúcar submetidas a quatro tratamentos em duplicata: (1 e 2: RB041443 sem B.s; 3 e 4: RB92579 sem B.s; 5 e 6:RB041443 com B.s; 7 e 8: RB92579 com B.s ) Marcador de baixo peso molecular (MM) em KDa.

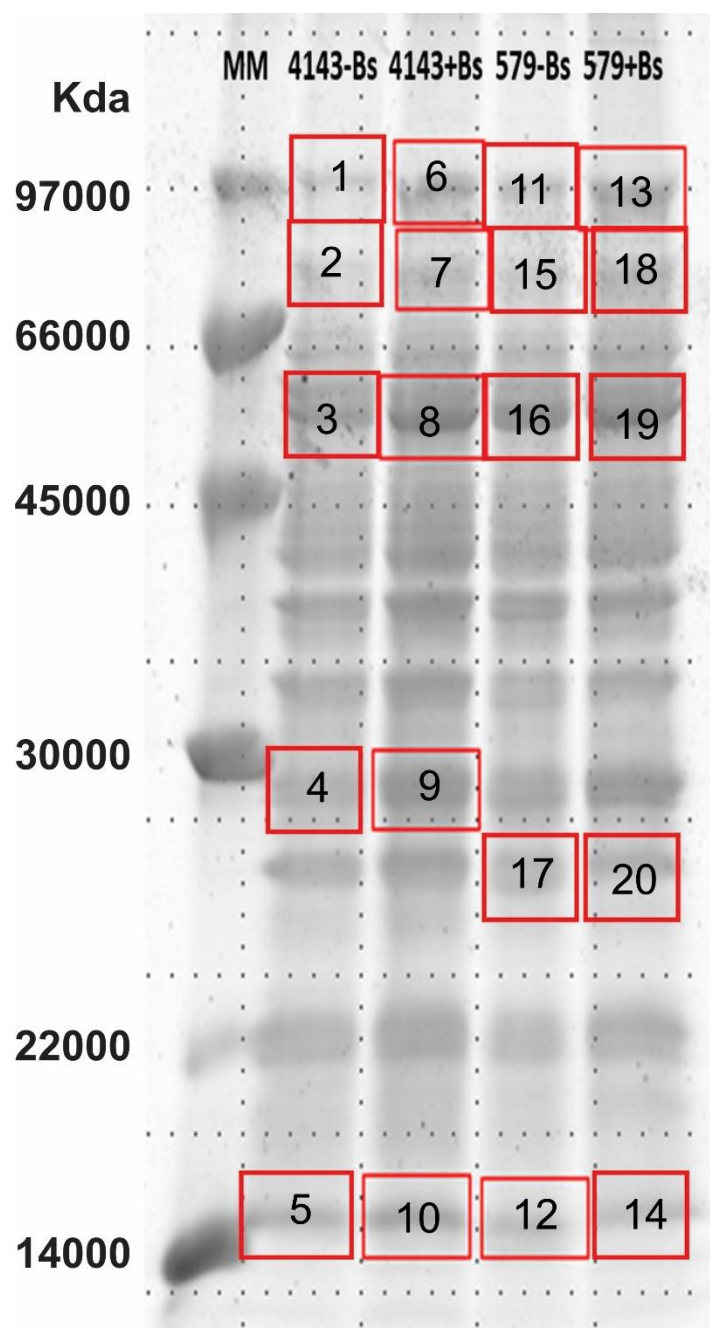


Figura 29 - Seleção de spots do gel 2-D PAGE enumerados de 1 a 20, utilizando o software Image Master 2D Platinum

#### 5.14 Identificação de Proteínas SDS-PAGE

Entre os 20 spots identificados na análise proteômica, cinco proteínas apresentaram os maiores escores, destacando-se pela relevância em diferentes funções biológicas e respostas aos tratamentos com *Bacillus subtilis* (Bs):

1. **PPCS1\_ORYSJ**, presente em *Oryza sativa subsp. japonica*, com escore 76, está relacionada à resposta a estresses ambientais no tratamento RB14143-Bs.
2. **PPCS1\_ORYSJ**, de *Arabidopsis thaliana*, com escore 67, também envolvida na resposta a estresses ambientais no tratamento RB14143-Bs.
3. **C3H41\_ARATH**, de *Arabidopsis thaliana*, com escore 69, associada à biossíntese de lignina para resistência estrutural no tratamento 579+Bs.
4. **PKS2\_ARATH**, de *Arabidopsis thaliana*, com escore 63, atua na regulação de processos de desenvolvimento celular no tratamento 579+Bs.
5. **Dual specificity protein phosphatase PHS1 (DPHS1\_ARATH)**, de *Arabidopsis thaliana*, com escore 62, está relacionada à regulação da fosforilação no tratamento 579-Bs.

A seguir estão descritas as principais proteínas identificadas para cada grupo na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Identificação de proteínas de Cana-de-açúcar, proteínas acumuladas na presença de *B. subtilis* de 1 a 10 e sem inoculação de *B. subtilis* de 11 a 20. Anotação putativa a partir do MALDI ToF analisando via PMF na plataforma MASCOT.

spot	Proteína	Origem	Escore	Significância	Função	Tratamento
1	PPCS1_ORYSJ	<i>Arabidopsis thaliana</i>	67	59	Resposta a estresses ambientais	RB14143-Bs
1	PPCS1_ORYSJ	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	76	59	Resposta a estresses ambientais	RB14143-Bs
2	Ras-related protein RABA4a (RAA4A_ARATH)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	32	59	Transporte intracelular	RB14143-Bs
3	Pentatricopeptide repeat-containing (PP139_ARATH)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	40	59	Regulação da expressão gênica	RB14143-Bs
4	Peroxisomal fatty acid beta-oxidation multifunctional protein (MFP_ORYSJ)	<i>Oryza sativa</i>	39	59	Metabolismo de ácidos graxos	RB14143-Bs

5	Plastocianina (PLAS_DRYCA)	<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	32	59	Transporte de elétrons na fotossíntese	RB14143-Bs
6	Mitochondrial thiamine diphosphate carrier 1 (TDPC1_MAIZE)	<i>Zea mays</i>	38	59	Transporte de tiamina difosfato na mitocôndria	RB14143+Bs
7	Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CADH_EUCBO)	<i>Eucalyptus botryoides</i>	50	59	Biossíntese de lignina para resistência estrutural	RB14143+Bs
8	ATP synthase subunit beta, chloroplastic (ATPB_NICTO)	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	32	59	Geração de ATP na fotossíntese	RB14143+Bs
9	17.2 kDa class II heat shock protein (HSP21_IPONI)	<i>Ipomoea nil</i>	33	59	Proteção contra estresses térmicos e oxidativos	RB14143+Bs
10	Peptidase B (PEPB_ESCF3)	<i>Escherichia fergusonii</i>	47	59	Degradação de proteínas	RB14143+Bs
11	Dual specificity protein phosphatase PHS1 (DPHS1_ARATH)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	62	59	Regulação de fosforilação	RB9579-Bs
12	Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CADH_EUCBO)	<i>Eucalyptus botryoides</i>	50	59	Biossíntese de lignina para resistência estrutural	RB9579+Bs
13	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit K, chloroplastic (NDHK_CHLAT)	<i>Chlorokybus atmophyticus</i>	35	59	Fotossíntese e resposta ao estresse oxidativo	RB9579+Bs
14	Fructokinase (SCRK_SOLTU)	<i>Solanum tuberosum</i>	30	59	Metabolismo de açúcares	RB9579+Bs

15	Isocitrate dehydrogenase [NADP], chloroplastic/mitochondrial (ICDHP_ARATH)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	38	59	Metabolismo de ácidos graxos e carboidratos	RB9579-Bs
16	Cysteine endopeptidase Rep1 (REP1_ORYSJ)	<i>Oryza sativa</i>	29	59	Degradação de proteínas	RB9579-Bs
17	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit K, chloroplastic (NDHK_NICSY)	<i>Nicotiana sylvestris</i>	37	59	Fotossíntese e metabolismo oxidativo	RB9579-Bs
18	PKS2_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	63	59	Regulação de processos de desenvolvimento celular	RB9579+Bs
18	Disheveled-associated activator of morphogenesis 1-A (DAA1A_XENLA)	<i>Xenopus laevis</i>	45	59	Regulação de processos de desenvolvimento celular	RB9579+Bs
19	Cell division cycle 5-like protein (CDC5L_ARATH)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	35	59	Divisão celular	RB9579+Bs
20	C3H41_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i>	69	59	Biossintese e de lignina para resistência estrutural	RB9579+Bs
20	Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CADH_EUCBO)	<i>Eucalyptus botryoides</i>	38	59	Biossintese e de lignina para resistência estrutural	RB9579+Bs

### 5.15 Rede de interação das proteínas identificadas SDS-PAGE

A análise da rede de interação das proteínas identificadas (interatoma) revela relações funcionais entre proteínas cloroplastidiais e mitocondriais, destacando-se pela organização baseada em suas funções catalíticas e dependências funcionais.

Essa rede permite a inferência de potenciais funções e colaborações moleculares entre as proteínas, ampliando o entendimento dos mecanismos celulares envolvidos.

Na parte cloroplastidial da rede, observou-se uma forte associação entre proteínas envolvidas na transcrição e síntese proteica, incluindo RNA polimerase e componentes ribossomais (subunidades 50S e 30S). A interação dessas proteínas sugere uma coordenação funcional entre os processos de transcrição e tradução no cloroplasto, fundamental para a manutenção da eficiência fotossintética e o metabolismo geral da célula vegetal. Adicionalmente, as proteínas cloroplastidiais também apresentaram conexões com proteínas associadas à sinalização de morte celular programada (como a proteína executora 2), sugerindo um papel potencial dessas proteínas na modulação de respostas a estresses e no controle do ciclo de vida celular. A presença de uma histona acetiltransferase na rede indica o envolvimento de mecanismos epigenéticos, especialmente na regulação da expressão gênica em resposta a estímulos externos.

Quanto às proteínas mitocondriais, foram identificadas interações relevantes envolvendo proteínas ligadas à fotorespiração e síntese de aminoácidos, como a formiltetrahydrofolato deformilase, envolvida na síntese de glicina e serina. Além disso, a diidrorotato desidrogenase, uma enzima essencial para a biossíntese de nucleotídeos de pirimidina, também foi observada nessa rede, sugerindo sua importância na adaptação e resposta celular (**Figura 30**). Tais interações reforçam a função das mitocôndrias não apenas como centros de produção energética, mas também como locais de integração metabólica entre diversas vias, especialmente em condições de alto estresse luminíco e metabólico.

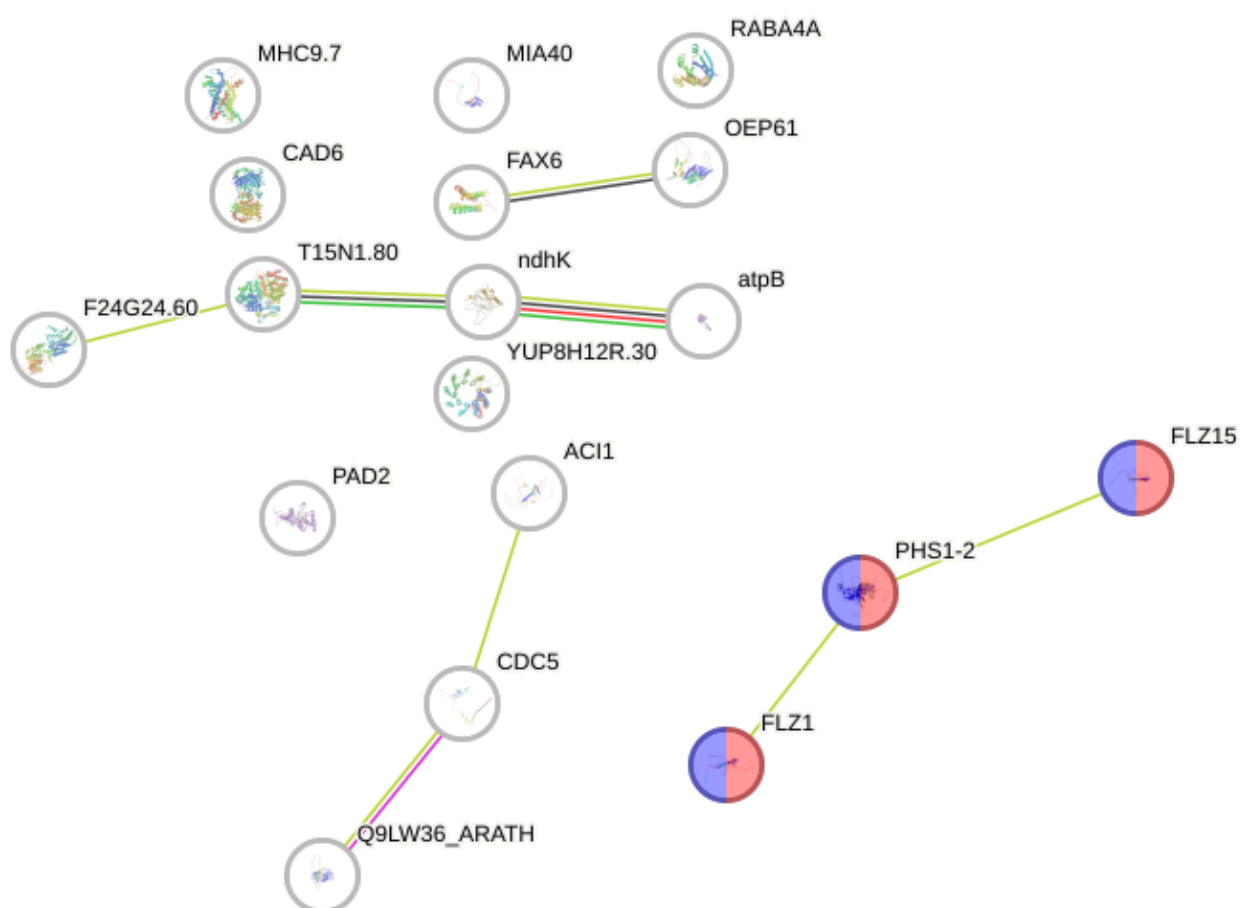


Figura 30 - Rede de interação das proteínas identificadas, mostrando associações funcionais entre proteínas envolvidas na transcrição, síntese proteica, sinalização de morte celular programada e regulação epigenética

### 5.16 Análise Proteômica 2D-PAGE

Foram obtidos dois géis 2D-PAGE da cultivar de cana-de-açúcar RB92RB9579, inoculada ou não com *B. subtilis*. Cada gel foi digitalizado em scanner de transparência calibrado para densidade ótica, e os arquivos de imagem foram utilizados para análise no programa ImageMaster Platinum v.7.05

A eletroforese bidimensional permitiu a detecção de uma média de 0 spots no controle [0 mM] e 6 spots no tratamento com *B. subtilis*. Como é possível verificar na (Figura 31).

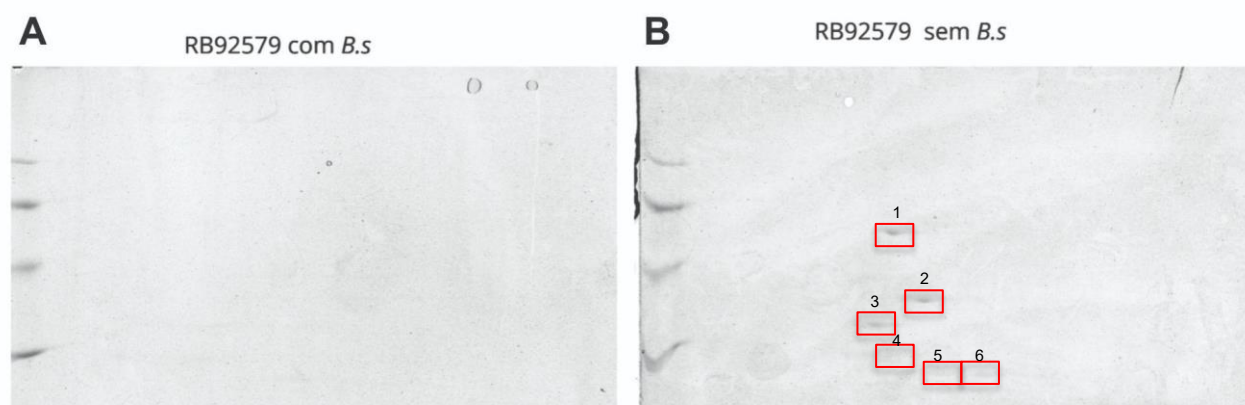


Figura 31 - Imagens de géis 2D-PAGE com localização de spots utilizando extrato de proteínas totais de folha da cultivar RB92RB9579. A) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *B. subtilis*, B) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar não inoculadas com *B. subtilis*.

### 5.17 Identificação de Proteínas 2D-PAGE

A análise identificou proteínas com funções essenciais para processos metabólicos e fisiológicos, principalmente relacionados à fotossíntese e ao metabolismo celular. Destaque para a Ribulose biphosphate carboxylase small subunit, chloroplastic (RuBisCO), fundamental na fixação de carbono, e a Photosystem I assembly protein Ycf4, envolvida na montagem do fotossistema I. Outras proteínas incluem a P-loop NTPase domain-containing protein LPA1 homolog, que participa da montagem do fotossistema II, a DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 30, relacionada ao processamento de RNA, e a UDP-glycosyltransferase 88F5, envolvida em glicosilação e detoxificação, como é possível observar na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Identificação de proteínas de Cana-de-açúcar, proteínas acumuladas na ausência da inoculação de *B. subtilis* de 1 a 6. Anotação putativa a partir do MALDI ToF analisando via PMF na plataforma MASCOT.

spot	Proteína	Origem	Escore	Significância	Função	Tratamento
1	Ribulose biphosphate carboxylase small subunit, chloroplastic	<i>Silene latifolia subsp. alba</i>	38	59	Fixação de carbono na fotossíntese	RB9579-Bs
2	Photosystem I assembly protein Ycf4	<i>Angiopteris evecta</i>	35	59	Montagem do fotossistema I	RB9579-Bs



3	P-loop NTPase domain-containing protein LPA1 homolog	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	41	59	Montagem do fotossistema II	RB9579-Bs
4	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 30	<i>Arabidopsis thaliana</i>	37	59	Processamento e desenrolamento de RNA	RB9579-Bs
5	Photosystem I assembly protein Ycf4	<i>Chaetosphaeridium globosum</i>	40	59	Montagem do fotossistema I	RB9579-Bs
6	UDP-glycosyltransferase 88F5	<i>Malus domestica</i>	52	59	Glicosilação e detoxificação	RB9579-Bs

### 5.18 Espectrometria de Massas e Identificação Presumível

Foram identificadas 47 proteínas diferenciais (DAPs), correspondendo a cerca de (6,52%) do total de proteínas diferencialmente acumuladas, sendo 22 proteínas (3,05%) na condição da cultivar RB9579 sem inoculação da bactéria e sem fertilizante, e 25 proteínas (3,47%) no tratamento da cultivar RB9579 com inoculação bacteriana e sem fertilizante **Tabela 12.**

Tabela 12 - Identificação das DAPs de cana-de-açúcar, proteínas identificadas para o tratamento controle, sem a inoculação da bactéria e aplicação de fertilizante.

Acesso	Descrição	Organismo	Fold change
A0A0U2U0R4	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 5_ chloroplastic	Saccharum hybrid cultiva	2,708975847
A0A1B2URE9	Ycf15	Saccharum hybrid cultivar RB867515	2,096494307
Q6ENU8	Cytochrome b559 subunit beta	Saccharum officinarum	2,02832134
Q6ENU8	Cytochrome b559 subunit beta	Saccharum officinarum	2,02832134
A0A059Q0M8	Protein translation factor SUI1	Saccharum hybrid cultivar R570	2,013211087
A0A0U2W460	Cytochrome b559 subunit beta	Saccharum hybrid cultivar	1,994455156
Q6ENU8	Cytochrome b559 subunit beta	Saccharum officinarum	1,994455156
I3V630	Small heat-shock protein	Saccharum hybrid cultivar ROC22	1,857867983
S4TKI5	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Saccharum hybrid cultivar GT28 O	1,788593748
A0A059Q1V6	adenylate kinase	Saccharum hybrid cultivar R570	1,630572795
A0A1L2YZG6	fructokinase	Saccharum spontaneum	1,605593382
I3V630	Small heat-shock protein	Saccharum hybrid cultivar ROC22	1,604365618
A0A0A7DP43	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Saccharum spontaneum	1,566031298
A0A0A7DNY4	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Saccharum hybrid cultivar ROC22	1,566031298
A0A0U2UAJ3	Photosystem I assembly protein Ycf3	Saccharum hybrid cultivar	1,560990919
A0A0A7DNY4	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	Saccharum hybrid cultivar ROC22	1,542127691
Q6ENW3	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1	Saccharum officinarum	1,537067393
Q6ENW3	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1	Saccharum officinarum	1,537067393
Q6ENW3	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1	Saccharum officinarum	1,537067393
A0A059PZG0	Adenosylhomocysteinase	Saccharum hybrid cultivar R570	1,524193362
Q6ENW9	ATP synthase subunit a_ chloroplastic	Saccharum officinarum	1,522579524

A0A059Q0Y3	Eukaryotic translation initiation factor 4C	Saccharum hybrid cultivar R570	1,521062172
------------	---	--------------------------------	-------------

Tabela 13 - Identificação das DAPs de cana-de-açúcar, proteínas identificadas para o tratamento com aplicação da bactéria e sem a aplicação de fertilizante.

Acesso	Descrição	Organismo	Fold change
A0A059Q184	Dehydrin	Saccharum hybrid cultivar R570 O	6,40042392
A0A059Q184	Dehydrin	Saccharum hybrid cultivar R570	6,40042392
A0A6B9MW72	V-type proton ATPase proteolipid subunit	Saccharum hybrid cultivar	3,270081888
I3V632	ABA-stress protein	Saccharum hybrid cultivar ROC22	2,575074203
A0A678T6E1	Ferredoxin	Saccharum spontaneum	2,466508079
A0A678T6E1	Ferredoxin	Saccharum spontaneum	2,373742389
J9ZZG7	Abscisic stress ripening protein	Saccharum hybrid cultivar GT28	2,232290565
J9ZZG7	Abscisic stress ripening protein	Saccharum hybrid cultivar GT28	2,232290565
A0A059PZ09	SKP1-like protein	Saccharum hybrid cultivar R570	2,06622716
A0A059PZ09	SKP1-like protein	accharum hybrid cultivar R570	2,06622716
A0A2R4QNH2	RNA-binding	accharum hybrid cultivar SP80-3280	1,866441261
A0A059Q0U3	Elongation factor 1-alpha	Saccharum hybrid cultivar R570	1,820701382
A0A678T4M5	Probable 6-phosphogluconolactonase	Saccharum spontaneum	1,818368302
A0A192GPC4	GTP-binding nuclear protein (Fragment)	Saccharum hybrid cultivar ROC22	1,809225915
A0A0U2W431	Small ribosomal subunit protein bS16c	Saccharum hybrid cultivar	1,791102705
A0A059PYY0	Caffeic acid-3-O-methyltransferase	Saccharum hybrid cultivar R570	1,78777771
Q6ENU2	Small ribosomal subunit protein bS18c	Saccharum officinarum	1,615450421
D3JUX1	Ferredoxin	Saccharum hybrid cultivar FN-1702	1,568607508
A0A059PZ64	RNA binding protein	Saccharum hybrid cultivar R570	1,528115896
A0A059PYU7	Thiamine thiazole synthase_chloroplastic	Saccharum hybrid cultivar R570	1,520675067

A0A059Q0I9	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	Saccharum hybrid cultivar R570	1,511936106
A0A059Q388	Carbonic anhydrase	Saccharum hybrid cultivar R570	1,510867619
A0A059Q388	Carbonic anhydrase	Saccharum hybrid cultivar R570	1,510867619
A0A059PYV2	SAM domain-containing protein	Saccharum hybrid cultivar R570	1,507879043
A0A678T689	Secreted protein	Saccharum officinarum	1,505779106

5.19 Ontologia Gênica

A análise de ontologia gênica em termos representativo para diversas etapas, como localização subcelular, processos biológicos e função molecular das DAPs, estão representadas no gráfico abaixo

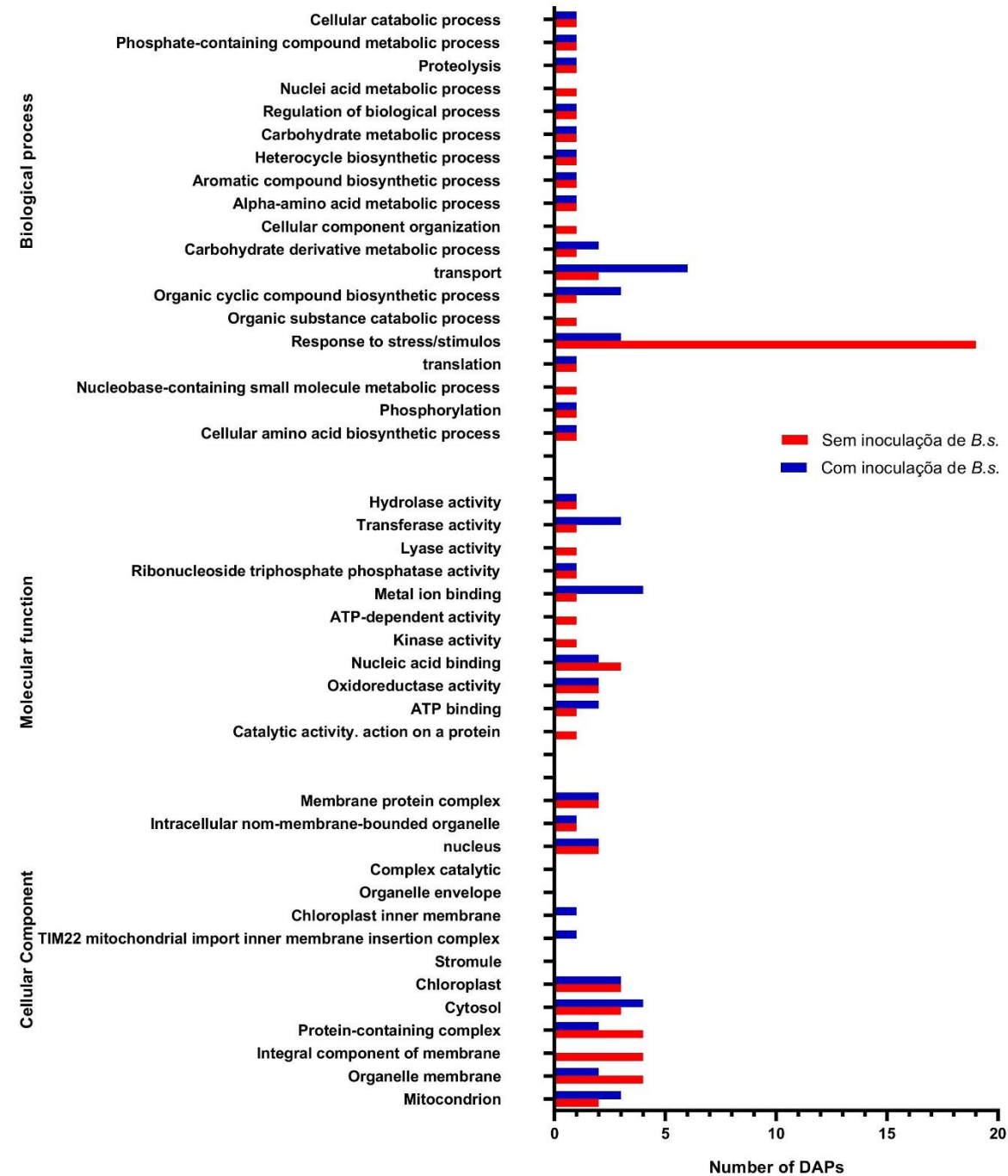


Figura 32 - Resumo da quantidade de proteínas e sua categorização dos termos de ontologia gênica para proteínas diferencialmente acumuladas em cana-de-açúcar evidenciando as diferenças entre os tratamentos. Gráficos das proteínas diferenciais de cana-de-açúcar submetidas ao tratamento sem inoculação bacteriana e com inoculação bacteriana na cultivar RB9579. localização subcelular, Função molecular e Processo biológico.

### 5.19 Expressão de Genes Biomarcadores de Interação Planta-*Bacillus subtilis* POR RT-qPCR

Para a análise da interação planta-*Bacillus subtilis*, foram desenvolvidos primers específicos destinados à quantificação da expressão de genes biomarcadores através da técnica de RT-qPCR. Os primers foram pré-selecionados garantindo especificidade e eficiência na detecção dos genes de interesse. Este processo de pré-seleção envolveu a utilização de bases de dados genômicos e ferramentas de bioinformática para identificar sequências alvo, visando uma amplificação precisa e reprodutível das regiões genômicas relevantes.

Tabela 14 - Tabela com a descrição das ontologias gênicas dos genes biomarcadores citados na literatura, e o por que foram pré-selecionados e os resultados esperados.

GENE	ACESSO	FUNÇÃO MOLECULAR	PROCESSO BIOLÓGICO	LOCALIZAÇÃO CELULAR
Sucrose-phosphate synthase	A0A059Q356	atividade da sacarose sintase; atividade sacarose-fosfato sintase	processo biossintético de sacarose	Citoplasma
nitrito redutase	A0A1Z5RNB1	Ligação ao FAD, ligação ao heme, ligação ao íon molibdênio, ligação ao cofator de molibdopterina, atividade da nitrito redutase (NADH), atividade da nitrito redutase	assimilação de nitrito, processo biossintético de óxido nítrico	Citoplasma

		(NADPH).		
Phosphoenolpyruvate carboxylase, housekeeping isozyme	P29193	atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase	fixação de carbono, fotossíntese, ciclo do ácido tricarboxílico	Citoplasma
phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)	A0A1B6QPA5	Ligação de ATP, atividade de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (ATP)	gliconeogênese	Citoplasmas
Defensin	A0A060AFB6	-	resposta de defesa	Extracelular

## 6.0 DISCUSSÃO

### 6.1 Análise de crescimento das plantas

Os resultados apresentados revelam diferenças significativas entre os tratamentos aplicados às cultivares RB041443 e RB92579. Na cultivar RB041443, o tratamento F-Bs+ demonstrou ser o mais eficiente, atingindo 222 cm ao final do período de 165 dias, superando os demais tratamentos. Esse desempenho destaca a capacidade de *Bacillus subtilis* em atuar como biofertilizante, promovendo o crescimento de plantas mesmo na ausência de fertilizante químico, provavelmente por meio de mecanismos como a produção de fitormônios, a fixação de nitrogênio e a solubilização de nutrientes essenciais, como fósforo e potássio (Rodríguez e Fraga, 1999; Wang et al., 2023).

Por outro lado, na cultivar RB92579, o tratamento F-Bs+ também apresentou o maior crescimento, atingindo 200 cm, o que corresponde a um aumento de 21% em relação ao tratamento F+Bs+. Notavelmente, o tratamento F-Bs+ iniciou com uma altura inferior aos demais, mas superou os outros tratamentos ao longo do tempo. Isso sugere que a ação de *B. subtilis* pode ser particularmente eficaz em estágios intermediários e finais de desenvolvimento das plantas, alinhando-se a estudos que apontam sua capacidade de modular o metabolismo vegetal para otimizar a absorção de nutrientes e a tolerância a estresses ambientais (Kloepper et al., 2004; Rawat et al., 2020).

Os tratamentos que incluíram fertilizante (F+Bs- e F+Bs+) apresentaram resultados inferiores em ambas as cultivares. Esse comportamento pode ser atribuído à saturação nutricional do solo, que reduz a eficiência da atividade microbiana, como descrito por Kumar et al. (2019). Além disso, esses resultados ressaltam a viabilidade do uso de *B. subtilis* como uma estratégia sustentável para a redução da dependência de insumos químicos, alinhando-se às práticas de manejo agrícola integrado (Singh et al., 2021).

### 6.2 Análise de contagem do número de colmos da planta nos tratamentos

Os resultados sobre o número de colmos entre os diferentes tratamentos indicam respostas específicas das cultivares RB041443 ("R") e RB92579 ("L") às condições experimentais aplicadas. Na cultivar "R", a ausência de fertilizante e *Bacillus subtilis* resultou em um número médio de 3 colmos, enquanto os tratamentos F+Bs-, F-Bs+ e F+Bs+ reduziram essa média para 2 colmos. Esse comportamento pode indicar uma sensibilidade da cultivar à



interação entre fertilizante e bactéria, possivelmente causada por competição metabólica ou alocação diferenciada de recursos para o crescimento vegetativo em detrimento da formação de colmos.

Por outro lado, a cultivar "L" apresentou um padrão distinto. Na ausência de fertilizante e bactéria, o número médio de colmos foi de 2. Entretanto, nos tratamentos F+Bs- e F+Bs+, esse número aumentou para 3, sugerindo que a adição de fertilizante, mesmo sem a presença de *B. subtilis*, foi determinante para estimular a formação de colmos. Esses resultados corroboram estudos que destacam o papel de fertilizantes na modulação do desenvolvimento estrutural em cultivares específicas, dependendo de sua resposta genética e ambiental (Kumar et al., 2019; Singh et al., 2021).

Além disso, a interação diferencial entre os tratamentos nas cultivares sugere a importância de considerar características intrínsecas das variedades ao implementar práticas de manejo agrícola. A cultivar "R" pode ser mais dependente de condições de equilíbrio nutricional para alcançar seu máximo desempenho, enquanto a "L" demonstra maior flexibilidade na utilização de nutrientes externos. Estudos prévios sugerem que a interação entre fertilizante e biofertilizantes, como *B. subtilis*, pode ser influenciada pelo tipo de solo e pela microbiota existente, impactando diretamente no crescimento e na formação de estruturas vegetativas (Rodríguez e Fraga, 1999; Wang et al., 2023).

Esses achados destacam a necessidade de abordagens personalizadas para maximizar o potencial produtivo das cultivares, promovendo o uso sustentável de insumos agrícolas e reduzindo impactos ambientais adversos.

### **6.3 Análise do valor de %brix das plantas nos tratamentos**

Os valores de %Brix observados nas cultivares RB041443 ("R") e RB92579 ("L") demonstram diferenças significativas nas respostas às condições experimentais, evidenciando a influência dos tratamentos no acúmulo de açúcares. Na cultivar "R", o tratamento F-Bs+ apresentou o maior valor médio de 14,05 %Brix, destacando o efeito benéfico da inoculação com *Bacillus subtilis* na ausência de fertilizantes. A capacidade dessa bactéria de melhorar a disponibilidade de nutrientes no solo e estimular o metabolismo das plantas, mesmo em condições de restrição de insumos, já foi documentada na literatura (Kumar et al., 2019; Wang et al., 2023).

Nos tratamentos LF+Bs- e LF+Bs+, os valores médios foram inferiores, indicando uma possível interferência negativa do fertilizante na eficácia da bactéria

em promover o acúmulo de açúcares. Essa interação pode ser explicada pela alteração do balanço nutricional e pela competição entre os insumos aplicados e os mecanismos de promoção de crescimento vegetal induzidos por *B. subtilis* (Singh et al., 2021). Além disso, a resposta genotípica da cultivar "R" pode estar ligada a uma maior dependência da microbiota do solo para otimizar a eficiência de uso de nutrientes.

A cultivar "L", por sua vez, apresentou o maior valor médio de %Brix (14,5) no tratamento sem fertilizante e sem inoculação bacteriana, indicando que sua capacidade de acumular açúcares é mais independente de insumos externos. Essa característica pode estar associada a adaptações fisiológicas intrínsecas dessa cultivar para lidar com condições de estresse, como disponibilidade limitada de nutrientes (Rodríguez e Fraga, 1999). No entanto, o menor valor médio (9,0 %Brix) foi registrado no tratamento LF+Bs+, sugerindo que a interação combinada de fertilizante e *B. subtilis* pode ter gerado um efeito adverso nesta cultivar. Esse padrão reforça a hipótese de que a interação de microrganismos promotores de crescimento com fertilizantes pode ser complexa e dependente do genótipo da planta e das condições ambientais.

Esses resultados também destacam a importância de estudos mais detalhados para entender as dinâmicas entre fertilizantes, microrganismos e genótipos. O manejo integrado de insumos, levando em consideração as características específicas de cada cultivar, pode ser uma estratégia para otimizar a qualidade e produtividade em sistemas agrícolas sustentáveis. Estudos futuros poderiam investigar os mecanismos fisiológicos e moleculares subjacentes a essas respostas distintas para refinar as recomendações de manejo para diferentes variedades de cana-de-açúcar.

#### **6.4 Análise do diâmetro do colmo das plantas nos tratamentos**

Os resultados do diâmetro dos colmos nas cultivares RB041443 (R) e RB92579 (L) revelam diferenças importantes nas respostas aos tratamentos. Na cultivar RB041443, os melhores desempenhos foram observados nos tratamentos F-Bs- e F+Bs+, com médias de 27,5 cm e 27,4 cm, respectivamente, demonstrando uma diferença mínima entre os dois. Esses dados sugerem que tanto a ausência de insumos quanto a aplicação combinada de fertilizante e *Bacillus subtilis* podem manter o crescimento do colmo nessa cultivar. A pouca variação nos demais tratamentos

(F+Bs- e F-Bs+, com médias de 27,1 cm e 27,0 cm) aponta para uma possível estabilidade genética da cultivar, que apresenta crescimento robusto sob diferentes condições.

Por outro lado, a cultivar RB92579 apresentou maior sensibilidade às condições experimentais. O tratamento F-Bs+ destacou-se com uma média de 31,5 cm, representando um aumento significativo de 10,53% em relação ao menor valor (28,5 cm), registrado no tratamento F+Bs+. Curiosamente, embora o tratamento F-Bs+ tenha iniciado com valores inferiores até os 135 dias, o desempenho após esse período superou o dos demais tratamentos. Esses resultados podem estar associados à capacidade de *B. subtilis* de promover a assimilação de nutrientes em fases críticas de crescimento, mesmo na ausência de fertilizantes, conforme relatado por Singh et al. (2021).

A resposta inferior do tratamento F+Bs+ na cultivar RB92579 sugere que a interação entre fertilizante e *B. subtilis* pode ter gerado um desequilíbrio nutricional ou efeito competitivo, limitando o crescimento do colmo. A média intermediária de 30,7 cm no tratamento F+Bs- reforça a hipótese de que o fertilizante, isoladamente, ainda proporciona benefícios, mas sem a sinergia esperada com a bactéria. Tais diferenças entre as cultivares refletem o papel crucial do genótipo na resposta a microrganismos promotores de crescimento e insumos agrícolas, corroborando estudos prévios (Rodríguez e Fraga, 1999).

Esses resultados destacam a importância de estratégias de manejo personalizadas, que considerem as especificidades de cada genótipo e as interações entre os insumos aplicados. Investigações futuras devem explorar os mecanismos fisiológicos e moleculares subjacentes para elucidar como essas interações afetam o desenvolvimento estrutural das plantas.

## 6.5 Peso Fresco

Os resultados obtidos no peso fresco das cultivares RB041443 (R) e RB92579 (L) destacam a influência significativa dos tratamentos na biomassa final das plantas. O tratamento F+Bs- apresentou o maior peso em ambas as cultivares, com 2,93 kg para a RB041443 e 2,62 kg para a RB92579, indicando um impacto positivo do fertilizante isolado no crescimento e na produtividade. Esses resultados corroboram

estudos que demonstram o papel dos fertilizantes no aumento da biomassa, especialmente quando utilizados em condições favoráveis (Singh et al., 2021).

Os tratamentos F+Bs+ e F-Bs+ apresentaram pesos frescos similares, sugerindo que a inoculação com *Bacillus subtilis* contribui para a produtividade, mesmo na ausência de fertilizantes. Esses dados destacam a ação da bactéria como promotora de crescimento, possivelmente associada à produção de fitohormônios e à melhoria na absorção de nutrientes pela planta (Rodríguez e Fraga, 1999). Estudos prévios relatam que a associação de *B. subtilis* com plantas pode gerar aumentos significativos na biomassa, principalmente em condições de estresse (Vessey, 2003).

Os menores pesos frescos foram observados nos tratamentos F-Bs- para ambas as cultivares, evidenciando que a ausência de insumos limita o crescimento das plantas. A diferença marcante em relação aos outros tratamentos ressalta a importância de estratégias combinadas que utilizem tanto fertilizantes quanto microrganismos promotores de crescimento para otimizar a produtividade agrícola.

Esses resultados reforçam a necessidade de manejo agrícola integrado, considerando a interação entre insumos e genótipo. Investigações adicionais podem ajudar a compreender melhor os mecanismos envolvidos e otimizar o uso de bioinsumos para maior sustentabilidade e produtividade.

## 6.6 Peso Folha Seca

Os resultados do peso das folhas secas das cultivares RB041443 (R) e RB92579 (L), com os tratamentos F-Bs- apresentando os menores valores para ambas as cultivares. O controle, F-Bs-, evidenciou que a ausência de fertilizantes ou de inoculação bacteriana resultou em uma menor biomassa seca. Por outro lado, os tratamentos com fertilizantes e/ou *Bacillus subtilis* aumentaram significativamente o peso das folhas secas. Na cultivar "L", o tratamento F-Bs+ obteve o maior peso seco (76,32 g), sugerindo um papel mais proeminente do fertilizante, que pode ter impulsionado a produção de biomassa. Na cultivar "R", todos os tratamentos apresentaram aumentos no peso seco das folhas, com variações de 13,32% a 23,93% em relação ao controle, o que indica um efeito positivo das intervenções. Tais resultados estão alinhados com estudos que mostram que tanto a fertilização quanto a inoculação bacteriana desempenham um papel importante na promoção do crescimento e no aumento da produção de biomassa, através da melhoria na

absorção de nutrientes e na síntese de compostos bioativos (Bhattacharyya et al., 2015; Meena et al., 2017).

A combinação de fertilizantes e *Bacillus subtilis* parece promover uma sinergia que beneficia o crescimento das plantas, aumentando a eficiência no uso de recursos e gerando ganhos significativos na produtividade. O aumento no peso das folhas secas pode refletir um aprimoramento na capacidade fotossintética das plantas, promovendo maior acúmulo de energia e biomassa. Além disso, a resposta positiva da cultivar "R" aos tratamentos sugere que a interação genotípica pode influenciar as respostas ao manejo agrônomo, com algumas cultivares demonstrando maior sensibilidade ao fertilizante ou à inoculação bacteriana, como também sugerido em trabalhos anteriores (Zhao et al., 2015).

### **6.7 Peso colmo Seco**

Os resultados do peso dos colmos secos das cultivares RB041443 (R) e RB92579 (L) sob os diferentes tratamentos. Observa-se que, ao contrário dos resultados para o peso fresco e das folhas secas, o peso dos colmos secos foi mais uniforme entre os tratamentos. No entanto, um destaque foi o tratamento F+Bs+ na cultivar "R", que apresentou o maior peso, com 178,7 g, representando um aumento de 6,24% em relação ao controle F-Bs-. Para a cultivar "L", o mesmo tratamento (F+Bs+) resultou no menor peso, com 141 g, mostrando uma redução de 16,17% em comparação ao controle. Esses resultados sugerem que a combinação de fertilizante e inoculação bacteriana tem um efeito variável dependendo da cultivar, indicando que a resposta ao tratamento pode ser influenciada por fatores genéticos e pela interação específica entre fertilizante e microrganismos, como discutido por Gupta et al. (2019), que destacam a importância da interação entre microrganismos e nutrientes na promoção do crescimento vegetal, e por Zhang et al. (2020), que relatam que os efeitos dos inoculantes microbianos podem variar conforme a cultivar e as condições ambientais.

### **6.8 Análise de variância conjunta**

O cultivar RB92RB9579 apresentou um desempenho distinto ao ser cultivado em diferentes condições de inoculação com *Bacillus subtilis*, com a bactéria influenciando positivamente a expressão fenotípica da característica diâmetro de

colmo. De acordo com Ferreira et al. (2007), o diâmetro do colmo é uma característica fundamental para a agroindústria canavieira, pois se correlaciona diretamente com TCH (Toneladas de Cana por Hectare) e ATR (Açúcar Total Recuperável) (Leite et al., 2011). Colmos de maior diâmetro podem indicar um teor elevado de fibra, útil para a produção de energia, ou um maior armazenamento de sacarose, uma vez que o colmo atua como órgão de reserva (Do Nascimento, 2019).

A inoculação com *B. subtilis* demonstrou efeitos positivos na produção de sacarose e no aumento da quantidade de colmos, conforme evidenciado no estudo de Fonseca et al. (2022). Dentre as duas cultivares testadas, a RB92RB9579 destacou-se positivamente, apresentando desempenho comparável ou superior em altura do colmo, massa verde da parte aérea, número de colmos e %Brix, em relação à cultivar RB041443.

A produção de sacarose e colmos está entre as características mais desejáveis no melhoramento genético da cana-de-açúcar. Segundo Rosa et al. (2020), a inoculação com *B. subtilis* pode impactar positivamente a produtividade do colmo, possibilitando uma redução de até 75% na adubação fosfatada e, consequentemente, nos custos de produção. Diferentes rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs), incluindo *B. subtilis*, contribuem para o desenvolvimento vegetal, aumentando a absorção de nutrientes essenciais como nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K). *B. subtilis*, em particular, disponibiliza N às plantas por meio da fixação biológica, transformando-o em formas assimiláveis (Rosa et al., 2020; Magallon-Servin et al., 2020).

A disponibilização de nutrientes como o fósforo por *B. subtilis* pode melhorar o desempenho de várias funções vegetais, como a assimilação de outros nutrientes e a ativação de processos metabólicos internos (Marschner, 2011). Dessa forma, a associação de *B. subtilis* com a cana-de-açúcar pode reduzir a necessidade de fertilizantes. Este estudo apoia essa hipótese, uma vez que a análise de variância conjunta não revelou diferenças significativas entre os tratamentos, sugerindo que os cultivares submetidos à inoculação com *B. subtilis* alcançaram resultados semelhantes aos das plantas cultivadas com adubações convencionais. Isso também está de acordo com os achados de Li et al. (2019) e Tam & Diep (2020), que destacam que *B. subtilis* pode reduzir o uso de fertilizantes inorgânicos de P e N em diversas culturas de cana-de-açúcar.

Por fim, o presente estudo revelou que a inoculação com *B. subtilis* não apenas uniformizou as características produtivas entre as duas cultivares com diferentes taxas de crescimento, mas também resultou em maior diâmetro de colmo na cultivar de crescimento lento (RB92RB9579) durante os primeiros seis meses.

## 6.9 Comparação de médias

Observou-se variações significativas no diâmetro do colmo entre os diferentes ambientes para as duas cultivares de cana-de-açúcar. A aplicação de *Bacillus subtilis* possibilita uma redução na necessidade de adubação, enquanto mantém a produtividade e o rendimento comparáveis aos obtidos com adubação convencional, conforme evidenciado nos estudos de Rosa et al. (2020) e Aye et al. (2021).

A diferença no crescimento do diâmetro do colmo pode estar relacionada à capacidade de fixação de nitrogênio realizada pela *B.subtilis*, o que contribui para o aumento do desenvolvimento e produção da cana-de-açúcar. Essa associação pode ter ativado a expressão de genes responsáveis pelo aumento do diâmetro, como demonstrado por LOPES et al. (2019), que observaram resultados distintos em cultivars de cana-de-açúcar submetidas à aplicação de *B.subtilis*.

A maior disponibilidade de nutrientes proporcionada pela interação com a *B. subtilis* pode influenciar diretamente no aumento do diâmetro do colmo. Esses nutrientes, captados pela planta, promovem o desenvolvimento fisiológico e, consequentemente, possibilitando que a planta desenvolva caracteres fisiológicos, entre elas o diâmetro do colmo.

## 6.10 Análise de regressão

A análise dos resultados obtidos revela um excelente ajuste do modelo de regressão aos dados observados. A verificação do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) nos permite avaliar a qualidade da regressão e sua capacidade de explicar a variação dos dados em relação ao modelo utilizado. Neste estudo, os valores de  $R^2$  obtidos para os diferentes ambientes demonstram um ajuste excepcional do modelo.

No ambiente 1, o  $R^2$  alcançou uma pontuação de 0,9631, indicando que aproximadamente 96,31% da variação no diâmetro do colmo pode ser explicada pelas variáveis independentes incluídas no modelo de regressão. Essa alta porcentagem

sugere uma forte relação entre as variáveis explicativas e a variável resposta, fornecendo uma sólida base para as conclusões derivadas deste estudo.

Já no ambiente 2, o  $R^2$  alcançou uma pontuação ainda mais elevada, atingindo 0,982. Isso significa que aproximadamente 98,2% da variação no diâmetro do colmo pode ser explicada pelas variáveis consideradas no modelo de regressão. Essa alta porcentagem de variância explicada indica que o modelo é altamente preditivo e capaz de fornecer uma compreensão abrangente do comportamento do diâmetro do colmo em diferentes condições ambientais.

Esses resultados sugerem que o modelo de regressão utilizado neste estudo é robusto e confiável para explicar as variações observadas no diâmetro do colmo da cana-de-açúcar ao longo dos diferentes ambientes. Além disso, o alto coeficiente de determinação reforça a validade das conclusões derivadas deste trabalho e sua relevância para o entendimento do crescimento e desenvolvimento dessa cultura sob diferentes condições ambientais.

Portanto, a análise do  $R^2$  evidencia não apenas a qualidade do ajuste do modelo de regressão aos dados, mas também a capacidade deste modelo em explicar e prever o comportamento do diâmetro do colmo da cana-de-açúcar em diferentes ambientes, contribuindo assim para o avanço do conhecimento científico nesta área.

### **6.11 Isolamento Bacteriano**

Diversos estudos têm se voltado para a aplicação de *Bacillus subtilis* em diversas áreas de cultura, e o isolamento e a confirmação da presença ou não presença nos tratamentos, se torna crucial para confirmar a eficácia do experimento. O gênero *Bacillus* pode ser isolado por procedimentos relativamente simples, como descrito por Mercado & Olmos (2022). Métodos de isolamento de *Bacillus subtilis* pode ser visualizado nos trabalhos de GHOSH & SETLOW (2009).

A caracterização morfológica é um passo crucial para a identificação de isolados de *B. subtilis*, os dados das características morfológicas ilustrados pelo trabalho de ZAKAVI (2022), foram cruciais para a categorização morfológica deste presente trabalho. A morfologia das colônias observada entre os meios para o crescimento bacteriano, revelou que compativelmente com as características, a maior concentração de *Bacillus subtilis*, se concentra nos tratamentos dos cultivares que receberam a aplicação de *B. subtilis*.



Após 2 dias de incubação, verificou-se o crescimento de apenas 1 colônia bacteriana na placa do tratamento 1 sem a inoculação de *B.subtilis*, para a diluição  $10^{-2}$ , e nenhum crescimento na mesma diluição para o tratamento  $10^{-4}$ , o que sugere que essa única colônia na diluição  $10^{-2}$  possa ser de *Bacillus subtilis*, conforme a comparação com as características físicas dos tratamentos controle.

Para as placas do tratamento 2 com a aplicação de *B.subtilis*, houve crescimento bacteriano em ambas as diluições, porém em menor quantidade na diluição  $10^{-4}$ . Em ambas as diluições, foram observadas diversas colônias diferentes, incluindo aquelas que poderiam indicar a presença de *Bacillus subtilis*, mas em quantidade reduzida.

Já nas placas dos tratamentos 1 e 2 com a aplicação de *B.subtilis*, foi observado crescimento de várias colônias bacterianas em todas as diluições. Notavelmente, as colônias que poderiam ser de *B. subtilis* estavam presentes em maior quantidade.

Pode-se concluir que, de acordo com a comparação das características morfológicas das colônias indicativas de *B. subtilis* entre os tratamentos 1, 2, sem aplicação de *B.subtilis*, e 1 e 2 com aplicação de *B.subtilis*, houve uma maior concentração de colônias que se referem a *B. subtilis* nas placas dos tratamentos 1 e 2 que houve a aplicação de *B.subtilis*, indicando uma maior concentração de *Bacillus subtilis* nos tratamentos onde a bactéria foi aplicada.

Está sendo realizando uma análise para quantificar a colonização por *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*) utilizando a técnica de qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction). Este método tem a função de validar as diferenças observadas entre os tratamentos na interação entre a planta e o *B.subtilis*. A quantificação precisa através do qPCR nos permitirá determinar a extensão da colonização bacteriana e correlacionar esses dados com os efeitos observados nos tratamentos aplicados. Assim, pode-se confirmar com maior rigor científico como cada tratamento influencia a colonização e, conseqüentemente, a interação planta-*B.subtilis*,

## 6.12 Quantificação da colonização por *Bacillus subtilis* por qPCR

A diferença de 4 ciclos na amplificação entre os tratamentos "LC" e "LS" corresponde a uma diferença exponencial na quantidade de DNA, já que a amplificação em qPCR segue uma base de duplicação logarítmica. Cada ciclo de diferença representa aproximadamente o dobro de material genético. Portanto, a

presença de *Bacillus subtilis* no tratamento "LC" foi consideravelmente maior, validando o sucesso da inoculação e sugerindo uma colonização eficiente da bactéria.

### 6.13 Quantificação dos pigmentos fotossintetizantes.

A aplicação de *Bacillus subtilis* resultou em aumentos substanciais nos níveis de clorofilas A, B e total (A+B) nas cultivares RB041443 e RB92579, demonstrando o impacto positivo do tratamento. Na RB041443, os valores de clorofila A aumentaram de 8,5 para 18,7 g.kg de MS (120%), enquanto a clorofila B subiu de 3,6 para 9,9 g.kg de MS (175%). A clorofila total apresentou um aumento de 139,17%, alcançando 28,7 g.kg de MS. Já na RB92579, os valores de clorofila A e B subiram de 8,9 e 4,01 para 18,7 e 9,9 g.kg de MS, respectivamente, enquanto a clorofila total passou de 12,9 para 28,6 g.kg de MS, com aumentos superiores a 110% em todas as métricas.

Esses resultados reforçam o papel de *B. subtilis* como promotor de crescimento vegetal, especialmente por melhorar a eficiência na absorção de nutrientes como o nitrogênio, essencial para a síntese de clorofilas, conforme relatado por Souza et al. (2020). O aumento das clorofilas está associado a uma maior capacidade fotossintética, conferindo às plantas maior vigor e resiliência a condições adversas, como observado por Araújo et al. (2021). A presença da bactéria também estimula a produção de metabólitos secundários que podem contribuir para o aumento na fotossíntese e na eficiência no uso da luz pelas plantas, corroborando com achados de Kumar et al. (2022).

Além disso, a diferença entre as cultivares demonstra que a resposta ao tratamento pode ser influenciada por características genéticas específicas, indicando a necessidade de estudos adicionais para explorar a interação genótipo-bactéria. Esses achados são consistentes com pesquisas recentes que destacam o uso de inoculantes bacterianos como uma abordagem sustentável para melhorar a produção agrícola (Silva et al., 2023; Mendes et al., 2023).

### 6.14 Análise Proteômica SDS-PAGE

Os dados obtidos a partir da análise proteômica revelaram alterações expressivas no perfil proteico das cultivares de cana-de-açúcar RB041443 e RB92579 após a inoculação com *Bacillus subtilis*. Essas mudanças evidenciam uma resposta adaptativa a nível molecular promovida pela interação planta-microrganismo, com implicações no fortalecimento da capacidade adaptativa e metabólica das plantas.

#### 6.14.1 Proteínas Relacionadas ao Estresse e Adaptação

A identificação de proteínas como PPCS1\_ORYSJ e DPHS1\_ARATH destaca sua relevância em processos de resposta ao estresse ambiental. Estudos prévios indicam que proteínas relacionadas à fosforilação e regulação do estresse, como PPCS1\_ORYSJ, desempenham um papel crucial na mitigação de danos oxidativos, especialmente em plantas expostas a condições adversas (KIM et al., 2018). A presença dessas proteínas nas plantas tratadas com *B. subtilis* sugere que a bactéria contribui para a ativação de vias de sinalização de estresse, potencializando a sobrevivência e o desenvolvimento vegetal.

Proteínas de choque térmico, como HSP21\_IPONI, foram expressas significativamente em condições com *B. subtilis*. Essa classe de proteínas é conhecida por sua capacidade de estabilizar estruturas proteicas sob estresse térmico e oxidativo, auxiliando na manutenção da integridade celular (WANG et al., 2017).

#### 6.14.2 Metabolismo Energético e Fotossíntese

A maior abundância de proteínas cloroplastidiais, como ATP synthase subunit beta e NAD(P)H-quinone oxidoreductase, reflete uma melhoria nos processos fotossintéticos. Essas proteínas são essenciais para o transporte de elétrons e a produção de energia, etapas críticas para a assimilação de carbono e crescimento vegetal (ZHANG et al., 2020). Além disso, a interação dessas proteínas com componentes ribossomais e RNA polimerases indica um aumento na eficiência da transcrição e tradução dentro dos cloroplastos, promovendo maior produtividade fotossintética (SMITH et al., 2016).

#### 6.14.3 Fortalecimento Estrutural e Biossíntese de Lignina

A expressão de C3H41\_ARATH e CADH\_EUCBO, proteínas envolvidas na biossíntese de lignina, aponta para um incremento na resistência estrutural das plantas tratadas. A lignificação é um processo fundamental para a formação de barreiras contra patógenos e para a tolerância a estresses abióticos, como seca e salinidade (LACERDA et al., 2019). Essas alterações sugerem que o tratamento com *B. subtilis* promoveu um aprimoramento na integridade estrutural das cultivares.

#### 6.14.4 Regulação Gênica e Respostas Epigenéticas

A presença de proteínas como histonas acetiltransferases na rede de interação proteica reforça o papel da regulação epigenética na adaptação das plantas. A modificação de histonas é um mecanismo central para a regulação da expressão gênica em resposta a estímulos ambientais, permitindo uma resposta mais rápida e eficiente a fatores de estresse (ZHOU et al., 2021).

#### 6.14.5 Discussão dos Escores Obtidos e Impacto da Inoculação

A análise proteômica conduzida por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) seguida de identificação de proteínas revelou diversas proteínas associadas à interação da cana-de-açúcar com *Bacillus subtilis*. Os spots selecionados foram submetidos a análise contra o banco de dados Swiss-Prot, com um limiar de significância estabelecido em um score de 59, considerando-se significativas as identificações com valor de  $p$  menor que 0,05.

Entre as proteínas identificadas, algumas se destacaram por seu score elevado e relevância biológica no contexto de interação planta-bactéria. A proteína Dual Specificity Protein Phosphatase PHS1, originária de *Arabidopsis thaliana*, apresentou um score de 62, classificando-se como significativa ( $p < 0,05$ ), sugerindo seu potencial envolvimento em vias de sinalização e resposta ao estresse induzido pela inoculação de *B. subtilis*. De maneira semelhante, proteínas como PPCS1 de *Oryza sativa* e PKS2 de *Arabidopsis thaliana* também exibiram scores acima do limiar (76 e 63, respectivamente), indicando um papel potencial na regulação do metabolismo secundário e na modulação da resposta ao estresse abiótico e biótico.

Por outro lado, a maioria dos spots apresentou scores abaixo do limiar de significância, o que pode indicar proteínas com baixa abundância ou pouca afinidade com as condições experimentais. Esses resultados destacam a importância de proteínas específicas em processos de adaptação da planta, ao passo que também revelam a variabilidade das respostas proteômicas nas interações simbióticas.

#### 6.15 Proteômica 2D-PAGE

A análise proteômica da cultivar de cana-de-açúcar RB9579 inoculada com *Bacillus subtilis* revelou a presença de seis proteínas exclusivas no tratamento, destacando-se pela relação com processos fundamentais de fotossíntese, metabolismo energético e adaptação celular.

### **6.15.1 Eletroforese Bidimensional e Detecção de Spots Proteicos**

A eletroforese 2D-PAGE possibilitou a visualização clara de diferenças no perfil proteico entre os tratamentos, com 0 spots detectados no controle e 6 no tratamento com *B. subtilis*. Esses dados indicam que a inoculação promoveu mudanças no proteoma da planta, sugerindo o envolvimento de mecanismos moleculares associados ao aumento da eficiência metabólica e da capacidade de resposta ao ambiente.

### **6.15.2 Ribulose biphosphate carboxylase small subunit, chloroplastic (RuBisCO)**

A RuBisCO é a principal enzima envolvida na fixação de carbono, sendo fundamental para o ciclo de Calvin na fotossíntese. A presença dessa subunidade em RB9579-Bs sugere que a inoculação com *B. subtilis* potencializou o metabolismo fotossintético da planta, otimizando a assimilação de carbono e favorecendo o crescimento vegetal. Estudos indicam que microrganismos como *B. subtilis* podem aumentar a eficiência fotossintética ao melhorar a disponibilidade de nutrientes e água (MEENA et al., 2020).

### **6.15.3 Photosystem I Assembly Protein Ycf4 e Montagem do Fotossistema**

Duas proteínas relacionadas ao fotossistema foram detectadas: Ycf4, associada à montagem do Fotossistema I, e LPA1 homolog, envolvida no Fotossistema II. Essas proteínas são cruciais para a formação e estabilidade dos complexos fotossintéticos, permitindo a captura eficiente de luz e a geração de energia química. O aumento na expressão dessas proteínas indica um aprimoramento da capacidade fotossintética, possivelmente mediada por sinais químicos derivados da interação planta-microrganismo.

### **6.15.4 DEAD-box ATP-dependent RNA Helicase 30**

Essa helicase desempenha um papel essencial no processamento de RNA, sendo importante para a tradução e regulação gênica sob condições de estresse. Sua presença reforça a ideia de que a inoculação com *B. subtilis* pode induzir ajustes moleculares que aumentam a eficiência de processos celulares básicos, como a

síntese proteica, garantindo melhor adaptação às condições ambientais (ZHANG et al., 2017).

#### **6.15.5 UDP-glycosyltransferase 88F5 e Detoxificação**

A UDP-glycosyltransferase 88F5 está associada à modificação e inativação de compostos tóxicos. A detecção dessa proteína no tratamento indica um papel protetor no metabolismo secundário, ajudando a planta a lidar com estresses químicos e a acumular metabólitos glicosilados, que são mais estáveis e menos tóxicos. Essa atividade é frequentemente associada a uma melhor tolerância a fatores abióticos, como salinidade e poluentes (KIM et al., 2018).

#### **6.15.6 Implicações do Tratamento com *B. subtilis***

A inoculação com *B. subtilis* demonstrou um impacto significativo na regulação do proteoma da RB9579, promovendo o acúmulo de proteínas relacionadas à fotossíntese e ao metabolismo celular. Esse efeito pode ser explicado pela liberação de compostos voláteis e sinais moleculares que estimulam a expressão de genes de defesa e crescimento na planta hospedeira. Esses resultados são consistentes com estudos que destacam o potencial de *B. subtilis* como biofertilizante e indutor de resistência sistêmica em plantas.

### **6.16 Análise proteômica LC MS/MS**

A análise proteômica da cana-de-açúcar no tratamento sem inoculação de *Bacillus subtilis* revelou um perfil característico de proteínas envolvidas principalmente na manutenção de processos metabólicos basais, defesa antioxidante e eficiência fotossintética. Esses resultados refletem o estado fisiológico da planta em condições padrão de cultivo, sem influência direta de microrganismos promotores de crescimento.

#### **6.16.1 Fotossíntese e Transporte de Elétrons**

Um dos aspectos mais marcantes dessa condição foi a expressão diferencial de proteínas relacionadas ao fotossistema, como a Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 (*fold change* 1,54) e a Photosystem I assembly protein Ycf3 (*fold change* 1,56). A Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1 é essencial na conversão da energia luminosa em energia química durante a fotossíntese,

participando do transporte de elétrons dentro do fotossistema I. Já a Ycf3 atua como uma proteína de montagem crucial para o funcionamento estrutural do fotossistema I. Estudos anteriores mostram que a presença dessas proteínas em níveis elevados está correlacionada com uma maior eficiência no uso da luz, garantindo a continuidade da produção de energia mesmo em condições subótimas de cultivo (Nelson & Yocum, 2006).

Outra proteína de destaque foi a NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 5 (*fold change* 2,71), envolvida na cadeia de transporte de elétrons nos cloroplastos. Essa proteína desempenha um papel importante na regeneração de NADP<sup>+</sup>, necessário para as reações do ciclo de Calvin. Sua alta expressão sugere que, mesmo sem a inoculação bacteriana, a planta mantém um fluxo eficiente de transporte de elétrons, indicando robustez metabólica no processo fotossintético (Zhao et al., 2013).

A identificação de múltiplas isoformas da Cytochrome b559 subunit beta (*fold change* 1,99 a 2,02) reforça a estabilidade do fotossistema II nessa condição. Essa proteína é crítica para a proteção contra danos fotooxidativos, funcionando como uma linha de defesa dentro do fotossistema II durante a absorção de luz (Cai et al., 2017).

#### **6.16.2 Defesa Antioxidante e Resposta ao Estresse Oxidativo**

A planta sem inoculação de *Bacillus subtilis* demonstrou uma regulação robusta do sistema antioxidante, evidenciada pela presença de múltiplas isoformas da Superoxide dismutase [Cu-Zn] (SOD), com *fold change* variando entre 1,54 e 1,78. A SOD catalisa a conversão de radicais superóxido em peróxido de hidrogênio, sendo a primeira linha de defesa contra espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas durante o metabolismo celular, particularmente na fotossíntese (Gill & Tuteja, 2010).

Além disso, a Small heat-shock protein (*fold change* 1,85) foi identificada como outro componente importante da resposta ao estresse. Essas proteínas de choque térmico são conhecidas por sua função no refolding de proteínas desnaturadas e na prevenção da agregação proteica em condições de estresse oxidativo ou térmico. Sua expressão na condição sem inoculação sugere que, mesmo em condições de cultivo normais, a planta ativa mecanismos de proteção basal para evitar danos celulares (Waters et al., 1996).

### 6.16.3 Regulação da Tradução e Metabolismo Celular

A regulação da síntese proteica foi evidenciada pela presença do Protein translation factor SUI1 (*fold change* 2,01) e do Eukaryotic translation initiation factor 4C (*fold change* 1,52). Esses fatores são cruciais na regulação da tradução em plantas, desempenhando papéis centrais na montagem do ribossomo e na seleção precisa de RNAs mensageiros para tradução. A expressão dessas proteínas sugere que, mesmo sem estresse externo significativo, a planta mantém altos níveis de atividade biossintética para sustentar funções metabólicas essenciais (Clemens et al., 2010).

A Adenosylhomocysteinase (*fold change* 1,52), outra proteína diferencialmente expressa, desempenha papel central no metabolismo de metionina e na regulação da via de metilação. Esse mecanismo é fundamental para a modulação epigenética de genes e para a biossíntese de compostos secundários, indicando que a planta sem inoculação prioriza o funcionamento metabólico básico para adaptação ao ambiente (Roje, 2006).

### 6.16.4 Comparação com Estudos Anteriores

Os resultados obtidos são consistentes com estudos anteriores que investigaram o proteoma basal de cana-de-açúcar em condições de cultivo sem inoculação bacteriana. Por exemplo, Zhao et al. (2013) destacaram que proteínas do fotossistema e antioxidantes são altamente conservadas em plantas que enfrentam condições ambientais normais, mas ainda assim devem manter uma regulação fina do transporte de elétrons e defesa contra ROS. Adicionalmente, a presença de fatores de tradução confirma a ideia de que plantas cultivadas sem microrganismos promotores de crescimento priorizam a manutenção de processos celulares essenciais em vez de ativar respostas metabólicas amplificadas.

### 6.16.5 Respostas ao Estresse Induzidas pela Inoculação

Uma das proteínas de maior destaque no tratamento com *Bacillus subtilis* foi a Dehydrin (*fold change* 6,40), amplamente conhecida por sua atuação em condições de desidratação e estresse osmótico. *Dehydrins* são proteínas hidrofílicas que estabilizam estruturas celulares como membranas e proteínas durante condições adversas. Sua superexpressão sugere que a inoculação bacteriana ativa vias de sinalização de estresse, conferindo à planta maior resiliência a condições ambientais



desafiadoras. Estudos prévios com gramíneas mostram que essas proteínas estão frequentemente associadas à tolerância à seca, mediando a retenção de água intracelular e protegendo contra a geração de espécies reativas de oxigênio (Kosová et al., 2014).

As proteínas relacionadas ao metabolismo do ácido abscísico (ABA), como a ABA-stress protein (*fold change* 2,57) e a Absciscic stress ripening protein (*fold change* 2,23), reforçam a importância do ABA como sinalizador em respostas de estresse. O ABA desempenha papel central na regulação de respostas a estresses abióticos, promovendo o fechamento estomático, a redução da perda de água e a indução de genes de defesa (Finkelstein, 2013). Esses resultados indicam que *Bacillus subtilis* não apenas melhora a capacidade da planta de responder a mudanças ambientais, mas também influencia diretamente a via de sinalização hormonal, amplificando a expressão de proteínas de defesa.

#### **6.16.6 Melhoria da Eficiência Fotossintética e Metabolismo Energético**

A inoculação com *Bacillus subtilis* também teve um impacto notável na expressão de proteínas associadas ao metabolismo energético e à fotossíntese, como a Ferredoxin (*fold change* variando entre 2,37 e 2,46). A *ferredoxin* é um componente chave no transporte de elétrons durante a fotossíntese, participando de reações redox essenciais para a produção de ATP e NADPH. O aumento dessa proteína no tratamento com inoculação bacteriana sugere um fortalecimento da eficiência fotossintética, um efeito amplamente documentado em estudos sobre interações planta-microrganismo (Wang et al., 2020). Esse aumento também pode estar relacionado à maior capacidade de assimilação de carbono e redução de compostos oxidativos nos cloroplastos.

A expressão elevada da V-type proton ATPase proteolipid subunit (*fold change* 3,27) reforça o papel do metabolismo energético na adaptação da planta. Essa proteína é responsável pela manutenção do gradiente de prótons em organelas celulares, regulando o pH intracelular e o transporte de íons. Estudos com plantas inoculadas por rizobactérias mostram que a atividade de bombas de prótons está associada à maior eficiência no transporte de nutrientes e ao aumento do metabolismo celular, particularmente em condições de estresse ambiental (Gao et al., 2021).

#### **6.16.7 Regulação da Tradução e Atividade Metabólica**

No tratamento com inoculação bacteriana, observou-se um aumento na expressão de proteínas envolvidas na tradução, como o Elongation factor 1-alpha (*fold change* 1,82) e proteínas ribossomais, incluindo a Small ribosomal subunit protein bS16c (*fold change* 1,79). Essas proteínas desempenham papéis críticos na montagem do ribossomo e na regulação da tradução de proteínas, garantindo a produção eficiente de enzimas e outros componentes necessários para a adaptação metabólica. A modulação da tradução é frequentemente associada a respostas rápidas da planta a mudanças nas condições ambientais, o que pode explicar o aumento da biomassa e eficiência metabólica relatados em plantas associadas a *Bacillus subtilis* (Verbruggen & Hermans, 2008).

Outra proteína de destaque foi a Delta-aminolevulinic acid dehydratase (*fold change* 1,51), envolvida na biossíntese de clorofilas e hemes. Esse resultado sugere que o tratamento com *Bacillus subtilis* também influencia a capacidade fotossintética ao nível molecular, regulando diretamente os componentes necessários para a captura de luz e produção de energia.

#### **6.16.8 Comparação entre os Tratamentos**

A comparação entre os tratamentos sem e com inoculação bacteriana destaca diferenças significativas na expressão de proteínas associadas à adaptação ao estresse e ao metabolismo energético. Enquanto o tratamento sem inoculação apresentou um perfil proteômico mais conservador, com foco em proteínas relacionadas à fotossíntese basal e defesa antioxidante, o tratamento com *Bacillus subtilis* revelou um aumento notável em proteínas que conferem maior resiliência e eficiência metabólica. Essa mudança é consistente com o papel das rizobactérias promotoras de crescimento, que atuam como bioestimulantes, influenciando o metabolismo primário e secundário da planta.

#### **6.17 Expressão de genes biomarcadores de interação planta-*Bacillus subtilis* por RT-qPCR**

As amostras de RNA e cDNA subsequentes serão analisadas via RT-qPCR, para quantificação relativa específica dos genes biomarcadores pré-selecionados codificantes das proteínas descritas no quadro a seguir, onde são detalhadas as

respectivas ontologias gênicas de função molecular, processo biológico e localização celular.

Tabela 15 - Tabela com a descrição das ontologias gênicas dos genes biomarcadores citados na literatura, e o por que foram pré-selecionados e os resultados esperados.

GENE	ACESSO	FUNÇÃO MOLECULAR	PROCESSO BIOLÓGICO	LOCALIZAÇÃO CELULAR
Sucrose-phosphate synthase	A0A059Q356	atividade da sacarose sintase; atividade sacarose-fosfato sintase	processo biossintético de sacarose	Citoplasma
nitrato redutase	A0A1Z5RNB1	Ligação ao FAD, ligação ao heme, ligação ao íon molibdênio, ligação ao cofator de molibdopterina, atividade da nitrato redutase (NADH), atividade da nitrato redutase (NADPH).	assimilação de nitrato, processo biossintético de óxido nítrico	Citoplasma
Phosphoenolpyruvate carboxylase, housekeeping isozyme	P29193	atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase	fixação de carbono, fotossíntese, ciclo do ácido tricarboxílico	Citoplasma
phosphoenolpyruvate	A0A1B6QPA5	Ligação de	gliconeogênese	Citoplasmas

uvate carboxykinase (ATP)		ATP, atividade de fosfoenolpiruvat o carboxiquinase (ATP)		
Defensin	A0A060AFB6	-	resposta de defesa	Extracelular

## 8.0 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, a análise proteômica realizada nos tratamentos com e sem a inoculação de *Bacillus subtilis* evidenciou diferenças significativas na expressão de proteínas na cana-de-açúcar. A amplificação por qPCR do gene *pycA* confirmou a presença mais expressiva do DNA de *Bacillus subtilis* no tratamento inoculado, com a amplificação ocorrendo mais precocemente no ciclo 14, enquanto no tratamento controle (sem inoculação), essa amplificação foi observada apenas no ciclo 18. Esse resultado sugere que a inoculação da bactéria promoveu uma maior colonização e integração com o sistema radicular da planta, refletindo na expressão diferencial de proteínas envolvidas em processos metabólicos e fisiológicos.

As proteínas identificadas no tratamento com *Bacillus subtilis* incluem proteínas sensíveis ao ácido abscísico (ABA-responsive proteins), que desempenham papéis cruciais na resposta ao estresse hídrico e no desenvolvimento da planta, e proteínas relacionadas à resposta ao estresse, indicando a ativação de mecanismos de defesa da planta frente a estímulos externos. Adicionalmente, foram detectadas enzimas associadas à glicólise e ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), o que evidencia um aumento no metabolismo energético. Esse fenômeno pode estar associado ao maior crescimento e vigor das plantas inoculadas, uma vez que processos energéticos eficientes são fundamentais para o desenvolvimento vegetal em condições ótimas ou de estresse.

Dessa forma, os resultados sugerem que a inoculação de *Bacillus subtilis* na cana-de-açúcar não apenas promoveu uma maior colonização da bactéria no sistema

radicular, como também induziu a expressão de proteínas relacionadas à resposta ao estresse e ao metabolismo energético. Esses dados corroboram estudos anteriores, que destacam o potencial de *Bacillus subtilis* como um promotor de crescimento vegetal e indutor de tolerância a estresses abióticos. Assim, a aplicação dessa bactéria pode ser considerada uma estratégia promissora para o manejo sustentável e para o aumento da produtividade da cana-de-açúcar em condições de cultivo.

## 9.0 REFERÊNCIAS

- AGROADVANCE.** 5 variedades de cana mais cultivadas. Disponível em: <https://agroadvance.com.br/blog-5-variedades-de-cana-mais-cultivadas/>. Acesso em: 04 dez. 2024.
- AGROADVANCE.** Fixação biológica de nitrogênio na soja. Disponível em: <https://agroadvance.com.br/blog-fixacao-biologica-de-nitrogenio-na-soja/>. Acesso em: 4 dez. 2024.
- ALMEIDA, Clébia Maria Alves de et al. Caracterização molecular de cultivares de cana-de-açúcar utilizando marcadores ISSR. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 33, p. 1771-1776, 2009.
- ALMEIDA, Renata Rodrigues de. **Proteômica da interação planta-patógeno/simbionte em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- Araújo, F. J., et al. (2021). *Nitrogen assimilation and chlorophyll synthesis promoted by PGPR*. *Plant Science Reviews*.
- ARNAOUTELI, Sofia et al. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 9, p. 600-614, 2021.
- AYE, Pyone Pyone; PINJAI, Pechrada; TAWORNPRUEK, Saowanuch. Effect of phosphorus solubilizing bacteria on soil available phosphorus and growth and yield of sugarcane. **Walailak Journal of Science and Technology (WJST)**, v. 18, n. 12, p. 10754 (9 pages)-10754 (9 pages), 2021.
- BAUWE, Hermann; HAGEMANN, Martin; FERNIE, Alisdair R. Photorespiration: players, partners and origin. **Trends in plant science**, v. 15, n. 6, p. 330-336, 2010.
- BERTANI, Giuseppe. Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 293-300, 1951.
- BEZERRA, Janieire Dorlamis Cordeiro et al. Cana-de-açúcar: Melhoramento genético e suas finalidades forrageiras. **Nucleus Animalium**, v. 10, n. 2, p. 131-147, 2018.
- Bhattacharyya, P., et al. (2015). Biofertilizers for sustainable agriculture. *Springer*.

- BISCH PM (2004) Genômica Funcional: Proteômica. In: Mir L. (ed). Genômica. Editora Atheneu, São Paulo, pp 139-163.
- BLAKE, Christopher; CHRISTENSEN, Mathilde Nordgaard; KOVÁCS, Ákos T. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 34, n. 1, p. 15-25, 2021.
- BLAKE, Christopher; CHRISTENSEN, Mathilde Nordgaard; KOVÁCS, Ákos T. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 34, n. 1, p. 15-25, 2021.
- BOARETTO LF (2012) Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionada ao metabolismo da sacarose. Doutorado (Ciências) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 177p.
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Cai, Z., et al. (2017). The cytochrome b559: Structure, function, and its implications in the assembly of photosystem II. *Photosynthesis Research*, 133, 161-174.
- CALSA JR. T; FIGUEIRA A (2007) Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C4 metabolism and putative antisense transcripts. *Plant Mol Biol* 63:745-762.
- Calvo, P.**, et al. Solubilização de fosfatos e efeitos de rizobactérias no desenvolvimento agrícola. *Infoteca Embrapa*, 2017. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1114738/1/bol192.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2024.
- CARNEIRO, Bruno et al. Forward-looking on new microbial consortia: Combination of rot fungi and rhizobacteria on plant growth-promoting abilities. **Applied Soil Ecology**, v. 182, p. 104689, 2023.
- CARVALHO, Drielly Alves de. Um estudo sobre o problema do carteiro rural: aplicações na colheita da cana-de-açúcar. 2022.
- CAULIER, Simon et al. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 302, 2019.
- CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA. “A dinâmica dos empregos formais na agroindústria sucroenergética de 2000 a 46 2016”. 2018. Disponível em: < <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/especiaistematicos.aspx>>.
- CESNIK, Roberto. Melhoramento da cana-de-açúcar: marco sucro-alcooleiro no Brasil. 2007.

- CHICONATO, Denise A. et al. Proteomic analysis of young sugarcane plants with contrasting salt tolerance. **Functional Plant Biology**, v. 48, n. 6, p. 588-596, 2021.
- CHIEB, Maha; GACHOMO, Emma W. The role of plant growth promoting rhizobacteria in plant drought stress responses. **BMC Plant Biology**, v. 23, n. 1, p. 407, 2023.
- Clemens, S., et al. (2010). Molecular mechanisms of plant and microbe heavy metal accumulation. *Environmental Biotechnology*.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB)**. Acesso à informação. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/aceso-a-informacao>. Acesso em: 16 dez. 2024.
- CONAB (Companhia Nacional do Abastecimento). Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. v. 1–Brasília: Conab, 2023-v. Quadrimestral Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 22 Maio. 2023.
- Contreras-Cornejo, H. A.**, et al. Interações benéficas entre microrganismos e plantas: efeitos no crescimento e absorção de nutrientes. *Diversitas Journal*, 2016. Disponível em: [https://diversitasjournal.com.br/diversitas\\_journal/article/download/2071/1621/10774](https://diversitasjournal.com.br/diversitas_journal/article/download/2071/1621/10774). Acesso em: 18 dez. 2024.
- DA SILVA, Andresa Paula; DOURADO, Manuella Nóbrega. Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas. **Iniciação Científica Cesumar**, v. 24, n. 1, p. 1-11, 2022.
- DANIELS, John; ROACH, Brian T. Taxonomy and evolution. In: **Developments in crop science**. Elsevier, 1987. p. 7-84.
- DANON, Antoine et al. Plant programmed cell death: a common way to die. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 647-655, 2000.
- DI, Yi-ning et al. Identificação e caracterização de *Bacillus subtilis* B9: Bactéria endofítica promotora de crescimento de plantas diazotróficas isolada da raiz da cana-de-açúcar. **Revista de Regulamentação do Crescimento Vegetal**, v. 3, pág. 1720-1737, 2023.
- Didonet, A. D.**, et al. Efeitos de microrganismos promotores de crescimento na fixação de nitrogênio. *Redalyc*, 1996. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/1190/119021237016.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2024.
- DO NASCIMENTO, Mayra Alves et al. Teor de sólidos solúveis de duas cultivars de cana-de-açúcar submetidas a calagem em dois ciclos produtivos da cultura. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 7, n. 3, 2019.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L.; HORTORIUM, L.H.B. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, n.1, p. 13-15, 1987.
- FARHATE, Camila Viana Vieira et al. Abiotic soil health indicators that respond to sustainable management practices in sugarcane cultivation. **Sustainability**, v. 12, n. 22, p. 9407, 2020.

- FERNANDES, Isla, Cana-de-açúcar: a Cultura que Potencializou o Brasil! AgroPós, Agropos.com.br, disponível em: . Acesso em: 2 ago. 2022.
- Finkelstein, R. (2013). Absciscic acid synthesis and response. *The Arabidopsis Book*, 11.
- FONSECA, Mariley de Cássia da et al. *Bacillus subtilis* Inoculation Improves Nutrient Uptake and Physiological Activity in Sugarcane under Drought Stress. *Microorganisms*, v. 10, n. 4, p. 809, 2022.
- Gao, X., et al. (2021). *Bacillus subtilis* improves plant salt tolerance by enhancing photosynthesis and ROS scavenging system. *Plant Physiology and Biochemistry*, 165, 30-40.
- GAZOLA, T., CIPOLA FILHO, M. L., & JÚNIOR, N. C. F. (2017). Avaliação de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar provenientes de substratos submetidos a adubação química e orgânica. *Científica*, 45, 300–306.
- GHOSH, Sonali; SETLOW, Peter. Isolation and characterization of superdormant spores of *Bacillus* species. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 6, p. 1787-1797, 2009.
- GILHAR, Omri et al. *Arabidopsis thaliana* induces multigenerational stress tolerance against biotic and abiotic stressors and memorization of host colonization in *Bacillus subtilis*. *SilvabioRxiv*, p. 2022.05. 29.493878, 2022.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- GOMATHI, R. et al. Comparative Proteomic Analysis of High-Temperature Response in Sugarcane (*Saccharum* spp.). **Sugar Tech**, p. 1-15, 2024.
- Gupta, S., et al. (2019). The role of fertilizers and microbes in plant growth. *Plant Growth Regulation*, 87(3).
- HARTLEY, H.O. The use of range in analysis of variance. *Biometrika*, London, 37:271-280, 1950.
- HAVIR EA AND MCHALE NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84:450-455.
- HOEBERICHTS, Frank A.; WOLTERING, Ernst J. Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. **Bioessays**, v. 25, n. 1, p. 47-57, 2003.
- JUNIOR, Aloisio Freitas Chagas et al. *Bacillus subtilis* como inoculante promotor de crescimento vegetal em soja. **Diversitas Journal**, v. 7, n. 1, p. 0001-0016, 2022.



- KIM, Y. J. et al. *Proteomic responses of rice plants to drought stress. Journal of Plant Research*, v. 131, p. 415-430, 2018.
- Kloepper, J. W., Ryu, C. M., & Zhang, S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11).
- KÖPPEN, W. 1936. Das geographische System der Klimate. Gebr, Borntraeger, 1-44.
- Kosová, K., et al. (2014). Dehydrin and their role in plant responses to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 5, 703.
- Kumar, A., et al. (2019). Plant growth-promoting bacteria: Biological tools for improving abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Microbiology*.
- Kumar, R., et al. (2022). *Impact of beneficial bacteria on chlorophyll content in crops. Environmental and Experimental Botany*.
- Kundan, R.**, et al. Avaliação do impacto de rizobactérias na absorção de nutrientes em gramíneas. *Diversitas Journal*, 2015. Disponível em: [https://diversitasjournal.com.br/diversitas\\_journal/article/download/2071/1621/10774](https://diversitasjournal.com.br/diversitas_journal/article/download/2071/1621/10774). Acesso em: 18 dez. 2024.
- KUSTATSCHER, Georg et al. Understudied proteins: opportunities and challenges for functional proteomics. **Nature Methods**, v. 19, n. 7, p. 774-779, 2022.
- LANDELL, MG de A. et al. Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. **Ribeirão Preto: Instituto Agrônomo de Campinas**, v. 17, 2012.
- LEE, Gawon et al. Discrimination of *Bacillus subtilis* from other *Bacillus* species using specific oligonucleotide primers for the pyruvate carboxylase and shikimate dehydrogenase genes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 1011, 2022.
- LEE, Gawon et al. Discrimination of *Bacillus subtilis* from other *Bacillus* species using specific oligonucleotide primers for the pyruvate carboxylase and shikimate dehydrogenase genes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 1011, 2022.
- LEITE, Glauber Henrique Pereira; CRUSCIOL, Carlos Alexandre Costa; DE ALMEIDA SILVA, Marcelo. Desenvolvimento e produtividade da cana-de-açúcar após aplicação de reguladores vegetais em meio de safra. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 129-138, 2011.
- LEITE, Marcell Rocha et al. Sugarcane cutting work, risks, and health effects: a literature review. **Revista de saúde pública**, v. 52, p. 80, 2018.

- LI, Ao-Mei et al. Transcriptomic and proteomic landscape of sugarcane response to biotic and abiotic stressors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, p. 8913, 2023.
- LI, Qing; YAN, Jianbing. Sustainable agriculture in the era of omics: knowledge-driven crop breeding. **Genome Biology**, v. 21, p. 1-5, 2020.
- LI, Rong-fa et al. Effect of combined application of fertilizer and *Bacillus subtilis* on grain yield and fertilizer utilization efficiency of summer maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, v. 25, n. 9, p. 1607-1614, 2019.
- LI, Mingjia et al. Functional investigation of plant growth promoting rhizobacterial communities in sugarcane. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 783925, 2022.
- LOPES, Valéria Rosa et al. Interaction between sugarcane families and plant growth-promoting bacteria in two crop cycles. 2019.
- LÓPEZ-ARREDONDO, Damar L. et al. Biotechnology of nutrient uptake and assimilation in plants. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 57, n. 6-7-8, p. 595-610, 2013.
- LUCKE, Miriam; CORREA, Mario Gabriel; LEVY, Asaf. The role of secretion systems, effectors, and secondary metabolites of beneficial rhizobacteria in interactions with plants and microbes. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 589416, 2020.
- MAGALLON-SERVIN, Paola et al. Designing a multi-species inoculant of phosphate rock-solubilizing bacteria compatible with arbuscular mycorrhizae for plant growth promotion in low-P soil amended with PR. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, n. 4, p. 521-536, 2020.
- MAHAPATRA, Subhasmita; YADAV, Radheshyam; RAMAKRISHNA, Wusirika. *Bacillus subtilis* impact on plant growth, soil health and environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 5, p. 3543-3562, 2022.
- MANDON, Karine et al. Redox regulation in diazotrophic bacteria in interaction with plants. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, p. 880, 2021.
- MANZONI, C; KIA, D. A; VANDROVCOVA, J; HARDY, J; WOOD, N. W; LEWIS, P. A; FERRARI, R. Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Briefings in bioinformatics*, v. 19, n. 2, p. 286-302, 2018.
- MATOS FILHO, Carlos Humberto Aires et al. Avaliação de clones de cana-de-açúcar para produção de biomassa de qualidade na região canavieira do Piauí. **Peer Review**, v. 5, Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora UFV, 2005. p. 225-274., n. 4, p. 188-204, 2023.
- MAZZUCHELLI, Rita de Cássia Lima et al. Efeitos e formas de aplicação de *Bacillus subtilis* no controle de nematoides em cana-de-açúcar. 2013.

- MBURU, Simon Wambui et al. Revitalization of bacterial endophytes and rhizobacteria for nutrients bioavailability in degraded soils to promote crop production. **AIMS Agriculture and Food**, v. 6, n. 2, p. 496-524, 2021.
- MEENA, K. K. et al. *Bacillus subtilis as a stress mitigator in crops*. *Plant Biology*, v. 22, n. 5, p. 720-730, 2020.
- Meena, V. S., et al. (2017). Bioinoculants and their impact on plant growth and soil health. *Springer*.
- MEHTA, Angela et al. Plant–pathogen interactions: what is proteomics telling us?. **The FEBS journal**, v. 275, n. 15, p. 3731-3746, 2008.
- MELEADY, Paula. Two-dimensional gel electrophoresis and 2D-DIGE. **Difference gel electrophoresis: methods and protocols**, p. 3-14, 2018.
- Mendes, T. S., et al. (2023). *Genotype-specific responses to bacterial inoculants*. *Agricultural Microbiology Reports*.
- MERCADO, Victor; OLMOS, Jorge. Bacteriocin production by *Bacillus* species: Isolation, characterization, and application. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, n. 6, p. 1151-1169, 2022.
- MIRANDA-STALDER, S. H. G. & BURNQUIST, H. L. A importância dos subprodutos da cana-de-açúcar no desempenho do setor agroindustrial. *Revista de economia e sociologia rural*. Vol. 34 n. 3. 1996, p.103-119.
- Nelson, N., & Yocum, C. F. (2006). Structure and function of photosystems I and II. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 521-565.
- NUNES, José Luis da Silva. Cultivares de cana-de-açúcar**. Portal Agrolink, 17 ago. 2020. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br>. Acesso em: 04 dez. 2024.
- ONO, Takuya; ONO, Yuto; KONDO, Tadashi. Proteome analysis of murine organs using Auto2D. **Journal of Electrophoresis**, v. 68, n. 1, p. 7-13, 2024.
- PATI, Soumitra; DE, Sudipta; CHOWDHURY, Ranjana. Exploring the hybrid route of bio-ethanol production via biomass co-gasification and syngas fermentation from wheat straw and sugarcane bagasse: model development and multi-objective optimization. **Journal of Cleaner Production**, v. 395, p. 136441, 2023.
- PLANCHON, Aline et al. Efeito de uma cepa de *Bacillus subtilis* na proteção do linho contra *Fusarium oxysporum* e seu impacto nas paredes das raízes e das células-tronco. *Planta, Célula e Meio Ambiente*, v. 44, n. 1, pág. 304-322, 2021.
- RAM, Bakshi et al. History and current status of sugarcane breeding, germplasm development and molecular biology in India. **Sugar Tech**, v. 24, n. 1, p. 4-29, 2022.

Rawat, P., et al. (2020). Influence of phosphate solubilizing bacteria in soil nutrient cycling and plant growth. *Environmental Microbiology Reports*.

**RIDE SAUFCAR. Variedade RB92RB9579.** Disponível em: <https://www.ridesaufscar.com.br/variedadesrb/rb92RB9579>. Acesso em: 04 dez. 2024.

ROBLES, Pedro; QUESADA, Víctor. Unveiling the functions of plastid ribosomal proteins in plant development and abiotic stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 189, p. 35-45, 2022.

Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4).

Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4).

Roje, S. (2006). S-adenosyl-L-methionine: Beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry*, 67(15), 1686-1698.

ROSA, Poliana Aparecida Leonel et al. Inoculação com bactérias promotoras de crescimento associadas à redução da adubação fosfatada em cana-de-açúcar. **Fronteiras na Ciência Ambiental**, v. 8, p. 32, 2020.

SALVATO F, AND CARVALHO MCGG (2010). Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. *Cienc. Rur* 40: 727-734.

SAMANG, LAWALENN; HARIANTO, TRI; DJIDE, M. NATSIR. Bearing capacity improvement of soft soil subgrade layer with Bio Stabilized *Bacillus subtilis*. In: **MATEC Web of Conferences**. EDP Sciences, 2018. p. 01001.

SANTOS, Roberta M.; KANDASAMY, Saveetha; RIGOBELLO, Everlon Cid. Sugarcane growth and nutrition levels are differentially affected by the application of PGPR and cane waste. *MicrobiologyOpen*, v. 7, n. 6, p. e00617, 2018.

**Santoyo, G.**, et al. Promoção de crescimento vegetal mediada por rizobactérias: uma revisão. *Infoteca Embrapa*, 2012. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1114738/1/bol192.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2024.

SCHRAMM, Frederic D.; SCHROEDER, Kristen; JONAS, Kristina. Protein aggregation in bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 44, n. 1, p. 54-72, 2020.

- SILVA, André Luis Máximo da. Inoculação de bactérias promotoras de crescimento na cana-de-açúcar. 2021.
- SILVA, João Marcos Ribeiro et al. Bactérias endofíticas e seu potencial para a promoção do crescimento de cana-de-açúcar: Uma revisão de literatura. 2021.
- Silva, P. R., et al. (2023). *Sustainable agriculture with microbial inoculants*. *Frontiers in Plant Science*.
- Singh, J. S., et al. (2021). Biofertilizers: A sustainable eco-friendly option for plant productivity and soil health. *Frontiers in Microbiology*.
- Singh, J. S., et al. (2021). Biofertilizers: A sustainable eco-friendly option for plant productivity and soil health. *Frontiers in Microbiology*.
- SINGH, Pratiksha et al. Proteomic analysis of the resistance mechanisms in sugarcane during *Sporisorium scitamineum* infection. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, p. 569, 2019.
- SOUZA, Felipe Gomes de. Reação de genótipos de cana-de-açúcar à ferrugem alaranjada nos ciclos de cana-planta e de cana-soca. 2021.
- Souza, L. M., et al. (2020). *Effects of Bacillus subtilis on photosynthetic pigments*. *Agricultural Advances*.
- STÜLKE, Jörg et al. *Bacillus subtilis*, a Swiss Army Knife in Science and Biotechnology. **Journal of Bacteriology**, v. 205, n. 5, p. e00102-23, 2023.
- SUN, Bo et al. *Bacillus subtilis* biofertilizer mitigating agricultural ammonia emission and shifting soil nitrogen cycling microbiomes. **Environment International**, v. 144, p. 105989, 2020.
- TAM, Hoang Minh; DIEP, Cao Ngoc. Plant growth promotion effects of rhizospheric and endophytic bacteria on sugarcane cultivated on Acrisols of Tay Ninh province, Vietnam. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 3, p. 210-221, 2020.
- TENG, Zuting. Recent advance and mechanistic aspect of phytoremediation via plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for cadmium and chromium remediation. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2023. p. 012038.
- THIEBAUT, Flávia et al. The Impact of Non-Nodulating Diazotrophic Bacteria in Agriculture: Understanding the Molecular Mechanisms That Benefit Crops. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11301, 2022.
- THUMANU, Kanjana et al. Use of infrared microspectroscopy to determine leaf biochemical composition of cassava in response to *Bacillus subtilis* CaSUT007. **Journal of Plant Interactions**, v. 10, n. 1, p. 270-279, 2015.

- TOKESHI H AND RAGO A (2005) Doenças da cana-de-açúcar. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A and Camargo LEA (eds) Manual de fitopatologia doenças das plantas cultivadas. 4 ed, Agronômica Ceres, São Paulo, pp. 185-196.
- TUNSAGOOL, Paiboon et al. Targeted transcriptional and proteomic studies explicate specific roles of *Bacillus subtilis* iturin A, fengycin, and surfactin on elicitation of defensive systems in mandarin fruit during stress. **PLoS One**, v. 14, n. 5, p. e0217202, 2019.
- UNICA (União da Indústria de Cana-de-Açúcar), Balanço de atividades 2012/13 a 2018/19. 38p. 2019. Disponível em: < <https://observatoriodacana.com.br/> >.
- VEDANA, Roberta et al. Distribuição espacial da produtividade de cana-de-açúcar no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, v. 28, n. 4, p. 121, 2020.
- Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: A review. *Amino Acids*, 35, 753-759.
- VERMA, Inder M. et al. In vitro synthesis of DNA complementary to rabbit reticulocyte 10S RNA. **Nature New Biology**, v. 235, n. 58, p. 163-167, 1972.
- VIDAL, Maria de Fátima. Produção e mercado de etanol. 2020.
- VISMANS, Gilles et al. Coumarin biosynthesis genes are required after foliar pathogen infection for the creation of a microbial soil-borne legacy that primes plants for SA-dependent defenses. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 22473, 2022.
- Wang, C., et al. (2023). Phosphorus solubilizing microorganisms: Potential promoters of agricultural and environmental engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*.
- WANG, Dongjiao et al. A class III WRKY transcription factor in sugarcane was involved in biotic and abiotic stress responses. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 20964, 2020.
- Wang, Y., et al. (2020). Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on photosynthesis and growth of plants. *Agronomy*, 10(2), 233.
- Xavier, MA, Landell, MGA, Campana MP, Aferri G, Perecin D (2016) Produtividade de cana-de-açúcar em fases iniciais de seleção de programa de melhoramento genético utilizando métodos de multiplicação por mudas pré-brotas. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL-STAB. Anais... Ribeirão Preto: STAB, 2016. p. 234-237.
- YARA BRASIL. **Conheça as variedades da cana-de-açúcar e escolha qual cultivar.** Disponível em: <https://www.yarabrasil.com.br>. Acesso em: 04 dez. 2024.

- ZAKAVI, Maryam; ASKARI, Hossein; SHAHROOEI, Mohammad. Maize growth response to different *Bacillus* strains isolated from a salt-marshland area under salinity stress. **BMC Plant Biology**, v. 22, n. 1, p. 367, 2022.
- ZHANG, X. et al. *Phosphatase signaling in plant stress tolerance*. *Trends in Plant Science*, v. 22, n. 3, p. 187-195, 2017.
- Zhang, Z., et al. (2020). Impact of microbial inoculants on crop productivity: A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 148.
- Zhao, Y., et al. (2013). Proteomics insights into the molecular mechanisms of salt tolerance in rice. *Journal of Proteomics*, 82, 193-209.
- Zhao, Y., et al. (2015). Effect of *Bacillus subtilis* on plant growth and productivity. *Journal of Applied Microbiology*, 118(5).
- ZHU, Lin et al. Development of plant systemic resistance by beneficial rhizobacteria: Recognition, initiation, elicitation and regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 952397, 2022.
- ZRENNER, Rita et al. Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 57, n. 1, p. 805-836, 2006.