

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARINA SONEGHETT COTTA

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE GENÔMICA AMPLA DA INTERAÇÃO ENTRE *BACILLUS PUMILUS* TUAT-1 E *ARABIDOPSIS THALIANA*

CURITIBA

2019

MARINA SONEGHETT COTTA

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE GENÔMICA AMPLA DA INTERAÇÃO ENTRE *BACILLUS*  
*PUMILUS* TUAT-1 E *ARABIDOPSIS THALIANA*

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências-Bioquímica.  
Orientador: Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz.

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Cotta, Marina Soneghett  
Estudo de associação de genômica ampla da interação entre *Bacillus pumilus* TUAT-1 e *Arabidopsis thaliana*. / Marina Soneghett Cotta. – Curitiba, 2019.  
79 p.: il.

Orientador: Leonardo Magalhães Cruz

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Bactérias nitrificantes 2. Genômica I. Título II. Cruz, Leonardo Magalhães - 1971 III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências- Bioquímica.

CDD (22. ed.) 579.362



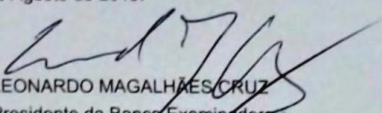
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
(BIOQUÍMICA) - 40001016/03P2

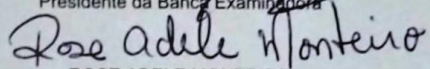
### TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **MARINA SONEGHETT COTTA**, intitulada: **ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE GENÔMICA AMPLA DA INTERAÇÃO ENTRE *BACILLUS PUMILUS* TUAT-1 E *ARABIDOPSIS THALIANA***, sob orientação do Prof. Dr. LEONARDO MAGALHÃES CRUZ, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

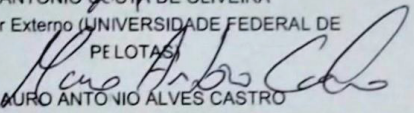
A outorga do título de Doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Agosto de 2019.

  
LEONARDO MAGALHÃES CRUZ  
Presidente da Banca Examinadora

  
ROSE ADELE MONTEIRO  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ)

  
ANTONIO COSTA DE OLIVEIRA  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PELOTAS)

  
MAURO ANTONIO ALVES CASTRO  
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz, pelos ensinamentos, pelo conhecimento compartilhado e pela atenção em todos estes anos de iniciação científica, mestrado e doutorado sob sua orientação. Especialmente, pela paciência, compreensão e apoio durante os imprevistos e dificuldades ao longo de todos esses anos sob sua orientação.

Ao Dr. Gary Stacey por ter me recebido em seu laboratório, por todo ensinamento e por ter me dado a oportunidade fazer parte deste projeto científico.

Às colaboradoras Profa. Dra. Roseli Wassem e Dra. Fernanda Plucani do Amaral pela ajuda, colaboração e conhecimento compartilhado.

Aos Professores Dra. Rose Adele Monteiro, Dr. Mauro Castro e Dr. Antonio Costa de Oliveira por aceitarem fazer parte da banca de defesa da tese de doutorado.

À Prof. Dra. Rose Adele, ao Prof. Dr. Marcelo Müller e ao Dr. Arquimedes Santana por fazerem parte da banca interna e pelas contribuições a este trabalho nas correções dos relatórios.

A todos os professores do Núcleo de Fixação de Nitrogênio pelas discussões e opiniões sobre este trabalho.

Aos técnicos do laboratório D. Roseli, Walter e Bruna.

À minha família, a qual eu dedico meu eterno amor e agradecimento, que acreditou e confiou nas minhas escolhas, me apoiando incondicionalmente para que todos os meus sonhos e objetivos fossem realizados. Pai, Mãe, Thiago e Matheus, vocês foram fundamentais durante todos esses anos e me carregaram no colo nos momentos difíceis e quando tudo dava errado, essa tese não seria possível sem vocês ao meu lado.

Aos colegas de laboratório e professoras que acabaram se tornando amigos muito especiais durante a nossa convivência. Especialmente à Vanessa e à Fernanda que me ouviram, aconselharam, estimularam e sempre tiveram palavras para me confortar e me animar a seguir em frente. E, às amigas para a vida toda que a vida acadêmica me deu, Nessana, Augusta, Anelis, Fernanda e Vivian, vocês são exemplo e orgulho para mim, e sempre foram parte da minha motivação para seguir adiante.

Às grandes amigas que fiz durante o estágio sanduíche e que foram essenciais na minha vida longe do Brasil. Carol e Beverly, vocês são grandes responsáveis por este trabalho e nunca poderei agradecer a tudo que vocês fizeram por mim.

Ao Willian, o qual estive ao meu lado desde o mestrado e é essencial na minha vida. Compartilhar o mestrado, doutorado e todas as dificuldades nesses anos com você permitiu que chegássemos inteiros ao final disso tudo.

À Bianca, minha grande amiga desde a graduação, amo você, obrigada por tudo!

Aos meus amigos que as vezes não entendem o que eu faço, mas compreendem minha ausência e estão ali sempre que eu preciso. Anne, Marina, Marcelo, Fernanda, Ludmilla e Andressa, amo vocês!

Às representantes discentes, Ana, Isabela e Dainesy por lutarem pelos nossos direitos incansavelmente. Obrigada por toda dedicação!

À coordenação da Pós-Graduação, pelo auxílio em nossa formação.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq, INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio e Fundação Araucária, pela bolsa e suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

E por fim, a Deus e ao universo, por conhecer todas essas pessoas e por terem me dado forças para chegar até aqui.

A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca.

E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.

**Paulo Freire**



## RESUMO

A bactéria promotora do crescimento vegetal (PGPB) *Bacillus pumilus* é uma fixadora de nitrogênio e produtora de giberelinas que aumenta o conteúdo de nitrogênio e a superfície e comprimento da parte aérea de plantas. Além disso, esta bactéria é capaz de melhorar o crescimento das plantas sob condições de estresse por seca e salinidade. A estirpe TUAT-1 pode aumentar as raízes e a biomassa de arroz e o conteúdo de nitrogênio e clorofila. Neste estudo, através do estudo de associação de genômica ampla (GWAS), nós avaliamos a interação entre TUAT-1 e *Arabidopsis thaliana*. Para este objetivo, 288 ecótipos de *A. thaliana* foram triados para parâmetros de arquitetura da raiz: comprimento de raiz principal, números de raízes laterais, zona ramificada, comprimento total de raiz e comprimento de raiz lateral. Vários ecótipos foram significativamente afetados pela inoculação com TUAT-1, enquanto alguns ecótipos responderam positivamente para o crescimento, alguns deles mostraram inibição do crescimento da raiz pela inoculação. Além disso, alguns ecótipos não responderam à inoculação por esta PGPB. Estes resultados mostram a especificidade estirpe-ecótipo da interação planta-bactéria. As análises do GWAS revelaram SNPs significantes em todos os parâmetros avaliados, levando a identificação de diversos genes. Os genes candidatos selecionados são altamente associados à interação entre TUAT-1 e *A. thaliana* e à promoção do crescimento. Neste trabalho, nós mostramos que alguns dos parâmetros de raiz se devem a traços genéticos separáveis associados a promoção do crescimento da planta. Neste estudo, nós validamos genes de interação e promoção do crescimento previamente reportados e encontramos genes potencialmente envolvidos nestes mecanismos. Nós sugerimos que a interação planta-bactéria e a promoção do crescimento são características quantitativas e multigênicas. Este conhecimento expande o nosso entendimento dos mecanismos funcionais que direcionam a promoção do crescimento vegetal por PGPB.

Palavras chave: *Bacillus pumilus*, *Arabidopsis thaliana* e GWAS



## ABSTRACT

The plant growth promoting bacterium (PGPB) *Bacillus pumilus* is a nitrogen fixer and a gibberellin producer that increases the nitrogen content and shoot length and surface in plants. In addition, this PGPB has the capability of improving plant growth under drought and saline conditions. The strain TUAT-1 can increase rice's roots and biomass and the content of nitrogen and chlorophyll. In this study, through genome-wide association study (GWAS), we evaluated the interaction between TUAT-1 and *Arabidopsis thaliana*. In order to do that, 288 *A. thaliana* accessions were screened for root architecture traits: main root length (MRL), number of lateral roots (NLR), branched zone (BZ), total root length (TRL) and lateral root length (LRL). Several ecotypes were significantly affected by TUAT-1 inoculation, while some of the ecotypes responded positively for growth. A few ecotypes showed inhibition of root growth upon inoculation. Besides that, some of the ecotypes did not respond to the PGPB inoculation. These results showed the strain-genotype specificity of the plant-bacteria interaction. GWAS analysis revealed significant SNPs in all the traits evaluated, leading to the identification of several genes. The candidate genes selected were very likely associated with the interaction between TUAT-1 and *Arabidopsis* and the plant growth promotion. Here, we show that some of the root architecture characteristics are genetic separable traits associated with the plant growth. In this study, we validated previous reported *Bacillus spp.* and its plant interaction and growth promotion genes and highlight the potential genes involved in these mechanisms. We suggest that plant-bacteria interaction and the plant growth promotion are quantitative and multigene traits. This knowledge expands our understanding of the functional mechanisms driving the plant growth promotion by PGPB.

Key words: *Bacillus pumilus*, *Arabidopsis thaliana* and GWAS.

## LISTA DE FIGURAS

Figure 1 - Desequilíbrio de ligação.....	19
Figure 2 - Mecanismos de ação de PGPB para a promoção do crescimento vegetal.....	26
Figure 3 - Phenotype screening from 288 <i>A. thaliana</i> ecotypes inoculated with TUAT-1 .....	44
Figure 4 - Significant SNPs identified by GWAS.....	46
Figure 5 - Genetic traits identified by GWAS.....	49
Supplementary Figure 6 - <i>A. thaliana</i> response upon TUAT-1 inoculation.....	59
Supplementary Figure 7 - Correlation between traits $\Delta$ phenotypes values for each ecotype .....	60
Supplementary Figure 8 - Gene interaction networks .....	61
Supplementary Figure 9 - Chromosome map.....	62
Supplementary Figure 10 - Allele effect of the candidate genes from the AE data set GWAS analysis. ....	63
Supplementary Figure 11 - Allele effect of the candidate genes from the RE data set GWAS analysis. ....	64

## LISTA DE TABELAS

Table 1 - Mudanças fisiológicas e bioquímicas induzidas por Bacillus em plantas de cultura agrícola .....	32
Table 2 - Candidate genes around the significant SNPs.....	55
Supplementary Table 3 - Co-expressed genes among the identified genes in GWAS analysis....	65
Supplementary Table 4 - Co-expressed genes with the candidate genes by ATTED-II .....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABA -	ácido abscísico
ACC -	1-aminociclopropano-1-carboxilato
As -	arsênio
ATP -	adenosina trifosfato
Cd -	cádmio
Cl -	cloro
Cr -	cromo
Cu -	cobre
EPS -	exopolissacarídeos
GWAS -	estudo de associação de genômica ampla
IAA -	ácido indol acético
ISR -	resistência sistêmica induzida
K -	potássio
N -	nitrogênio
N <sub>2</sub> O -	óxido nitroso
Na -	sódio
NaCl <sup>-</sup> -	cloreto de sódio
Ni -	níquel
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -	nitrato
P -	fósforo
Pb -	chumbo
PGPB -	bactérias promotoras do crescimento vegetal
ROS -	espécies reativas de oxigênio
SA -	ácido salicílico
SNF -	fixação simbiótica de nitrogênio
SNP -	polimorfismo de nucleotídeo único
VOC -	compostos orgânicos voláteis
Zn -	zinco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	17
2.1	Estudo de associação de genômica ampla	17
2.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	20
2.3	Bactérias promotoras do crescimento vegetal	22
2.4	Mecanismos de promoção do crescimento vegetal por PGPB	23
2.5	Especificidade da associação entre PGPB e a planta hospedeira	26
2.6	<i>Bacillus</i> promotores do crescimento vegetal	27
2.7	<i>Bacillus pumilus</i>	32
2.7.1	GWAS para a interação entre planta e bactéria	34
<b>3</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b>	36
3.1	ABSTRACT	36
3.2	INTRODUCTION	37
3.3	MATERIAL AND METHODS	39
3.3.1	Plant inoculation and growth promotion assay	39
3.3.2	GWAS analysis	40
3.3.3	Genetic traits identification	40
3.3.4	Candidate genes selection	41
3.4	RESULTS	42
3.4.1	<i>A. thaliana</i> ecotypes response upon TUAT-1 inoculation	42
3.4.2	Significant SNPs identified by GWAS	44
3.4.3	Genetic traits identification	47
3.4.4	Candidate genes selection	50

3.5	DISCUSSION .....	56
3.6	SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	59
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Práticas modernas de agricultura aumentaram intensivamente a produtividade das culturas agrícolas, porém este aumento se deve, em sua maioria, ao uso de fertilizantes e pesticidas químicos, o que danifica drasticamente o meio ambiente. O aumento na produtividade agrícola se faz necessário devido às demandas de alimentação, de processos industriais e de biocombustíveis, para uma população mundial, que tem o tamanho estimado de 9 bilhões de habitantes em 2050. Porém o melhoramento da produtividade agrícola deve ser sustentável e não causar danos ao meio ambiente. Entre os microrganismos do solo, são encontradas bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB), estas bactérias colonizam as raízes das plantas e melhoram seu crescimento. Além disso, PGPB também desempenham um importante papel no controle de fitopatógenos e na proteção contra os estresses abióticos.

A interação planta-bactéria vem sendo estudada há muito tempo, entretanto existem poucos estudos analisando esta interação e a promoção do crescimento através de estudo de associação de genômica ampla (GWAS), uma poderosa ferramenta para a análise de variação natural. Até o momento, dois estudos sobre a interação entre PGPB e plantas. O primeiro deles analisou as bases genéticas da variação para a fixação simbiótica de nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* inoculado com *Rhizobium tropici*. O segundo trabalho investigou a interação entre *Pseudomonas simiae* WCS417r e *Arabidopsis thaliana*. Além disso, a *A. thaliana* foi um dos primeiros organismos não-humanos a ser investigado através do GWAS. Esta planta é um organismo ideal para a análise do GWAS, visto que ela pode manter linhagens puras através da autofertilização, o que permite a repetição da fenotipagem de indivíduos geneticamente idênticos.

A maior parte das PGPB pertencem aos filos *Proteobacteria* e *Firmicutes*, entre as *Firmicutes*, *Bacillus spp.* é a promotora do crescimento vegetal predominante. A habilidade destas bactérias de formar esporos confere a ela a sobrevivência por um longo tempo sob condições desfavoráveis. O *Bacillus pumilus* é uma bactéria fixadora de nitrogênio e produz quantidades significantes de giberelinas, mais de 200 ng.ml<sup>-1</sup> em menos de 24 horas. Esta bactéria também desempenha um importante papel na promoção do crescimento vegetal sob condições de estresse por seca e salinidade. Além disso, o *B. pumilus* também apresenta atividade antifúngica. O *B. pumilus* TUAT-1, estirpe utilizada no presente trabalho, foi originalmente isolada de raízes de



arroz, e tem a capacidade aumentar características da arquitetura da raiz e a biomassa, além dos conteúdos de nitrogênio e clorofila nesta planta.

Neste trabalho nós analisamos a interação entre *Bacillus pumilus* TUAT-1 e *Arabidopsis thaliana* e a promoção do crescimento da planta através do GWAS. Um painel de 288 ecótipos de *A. thaliana* foi utilizado com o objetivo de identificar regiões genômicas associadas à promoção do crescimento vegetal.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Estudo de associação de genômica ampla**

A relação causal entre polimorfismos genéticos dentro de espécies e diferenças fenotípicas observadas entre indivíduos é de interesse biológico fundamental. Os estudos de associação genômica ampla (GWAS) são desenhos experimentais utilizados para detectar associações entre variantes genéticas e características em amostras de populações (VISSCHER, 2017). O GWAS identifica ou estuda a correlação entre a genética de variantes, características e fenótipos em populações de qualquer organismo baseado em polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos dados de sequenciamento. Esta abordagem explora o genoma completamente, em contraste com outras técnicas que exploram uma quantidade menor de áreas cromossômicas especificadas previamente. Consequentemente, o GWAS é uma técnica realizada sem a conjectura de uma hipótese, porém é uma abordagem capaz de gerá-las através dos seus resultados (CHALLA e NEELAPU, 2018).

O GWAS é amplamente utilizado para o estudo de doenças humanas, com o principal objetivo entender melhor a biologia da doença para obter uma prevenção ou um tratamento melhor. Porém esta técnica pode ser utilizada para entender melhor as características de qualquer organismo. O caminho do GWAS para a biologia não é direto, porque a associação entre uma variante genética em um locus gênico e uma característica não é diretamente informativa em relação ao gene alvo ou ao mecanismo através do qual essa variante é associada a diferenças fenotípicas. Entretanto, novos tipos de dados, novas tecnologias moleculares e novos métodos analíticos têm fornecido ferramentas para preencher a lacuna de conhecimento entre a sequência e o fenótipo (VISSCHER, 2017).

Existem alguns conceitos fundamentais para o desenvolvimento e entendimento do GWAS. O SNP, a unidade moderna de variação genética, é um deles. SNPs são mudanças únicas em pares de base na sequência de DNA que ocorrem em alta frequência. Nos estudos genéticos, geralmente, SNPs são usados como marcadores genéticos de uma região genômica e a maioria deles tem um impacto mínimo nos sistemas biológicos. Porém, em alguns casos os SNPs podem ter consequências funcionais causando mudanças em aminoácidos, na estabilidade do mRNA

transcrito ou na afinidade de ligação dos fatores transcricionais (MACDONALD, 1992). Apesar de existirem quatro nucleotídeos, SNPs normalmente tem dois alelos, ou seja, dentro de uma população existem comumente duas possibilidades de pares de base para a posição de um SNP. A frequência de um SNP é dada em termos de menor frequência alélica, o que significa a frequência do alelo menos comum em determinada população (BUSH and MOORE, 2012).

Outro importante conceito para o GWAS é o desequilíbrio de ligação, que é a propriedade dos SNPs, em uma extensão genômica contínua, que descreve o grau em que cada alelo de um SNP é herdado ou correlacionado com o alelo de outro SNP em uma população (Fig. 1). Este conceito está relacionado a dois marcadores em um cromossomo que permanecem fisicamente ligados ao longo da população. Os eventos de recombinação de geração para geração quebram segmentos cromossômicos e esse efeito é amplificado através das gerações até que todos os alelos de uma população estejam independentes, ou seja, em equilíbrio de ligação. Quando existe uma ligação entre dois marcadores em uma escala populacional, isto é denominado desequilíbrio de ligação (BUSH and MOORE, 2012). Portanto, quando se faz uma análise de GWAS é necessário analisar o desequilíbrio de ligação dos SNPs estatisticamente associados ao fenótipo (associação direta) para verificar se existem SNPs indiretamente associados àquela característica.

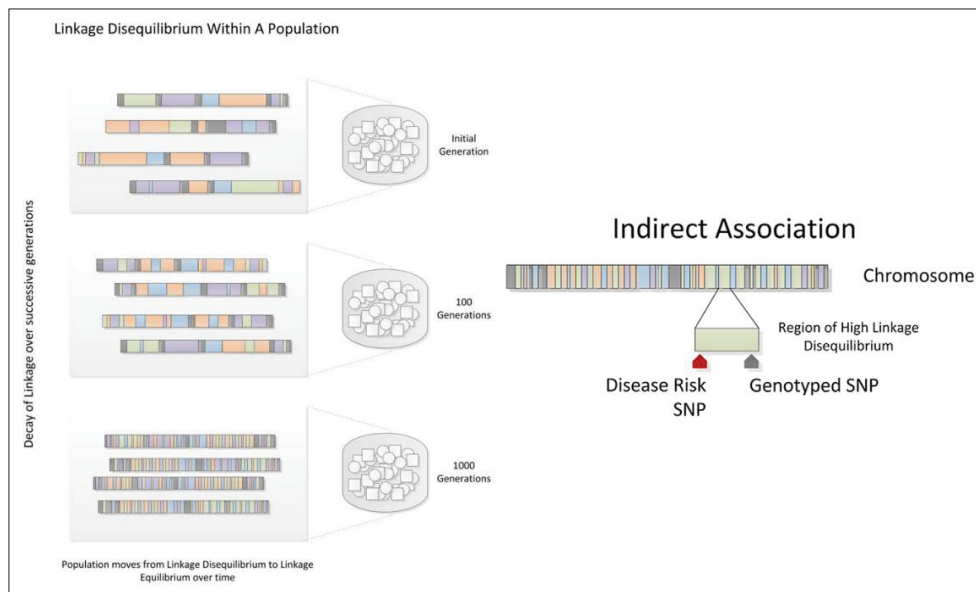


Figure 1 - Desequilíbrio de ligação. Em uma população, extensões contínuas de cromossomos da geração inicial são reduzidas de tamanho sequencialmente pelos eventos de recombinação. Ao longo do tempo, pares de marcadores genéticos em um cromossomo movem-se do desequilíbrio de ligação para o equilíbrio de ligação, visto que os eventos de recombinação ocorrem entre qualquer ponto do cromossomo. O SNP genotipado geralmente está em uma região de alto desequilíbrio de ligação com um alelo influente. O SNP genotipado estatisticamente associado ao fenótipo apresenta uma associação direta com o fenótipo, enquanto o SNP em desequilíbrio de ligação com o SNP genotipado é indiretamente associado ao fenótipo. Fonte: Bush WS, Moore JH (2012) Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. PLoS Comput Biol 8(12): e1002822.

As abordagens de estudos de associação genômica foram originalmente desenhadas para populações compostas por indivíduos não relacionados, porém os grandes conjuntos de dados genômicos inevitavelmente contêm indivíduos relacionados distantemente (SUL, 2018). Importantes melhoras na metodologia estatística do GWAS têm ocorrido recentemente, o que inclui o desenvolvimento de modelos mistos que levam em conta o efeito de confusão devido a estrutura das populações. O uso de modelos mistos tem sido implementado via pacotes para Python e R e também em uma ferramenta online, o GWA-Portal (SEREN, 2018). O GWA-Portal, metodologia utilizada no presente trabalho, é um programa online pré-carregado com os dados genotípicos de todos ecótipos de *Arabidopsis* comumente utilizados, que fornece diversas opções estatísticas e facilita a metanálise (KORTE e FARLOW, 2013).

A *Arabidopsis thaliana* foi um dos primeiros organismos não-humanos para o qual o GWAS se tornou possível e tem desempenhado um importante papel no desenvolvimento de metodologias estatísticas para populações altamente estruturadas (ATWELL, 2010). *A. thaliana* é

um organismo ideal para a análise por GWAS, pois ela pode manter as linhagens puras através da autofertilização, o que permite fenotipar repetidamente indivíduos geneticamente idênticos (KORTE e FARLOW, 2013). Esta variedade de linhagens puras torna possível capturar genótipos locais e crescê-los sob uma variedade de condições, e uma consequência natural destes fatores, foi a geração e a caracterização de dados de polimorfismos de genômica ampla (CLARK, 2007). Mais de 1.300 ecótipos distintos de *A. thaliana* foram genotipados para 250.000 SNPs (HORTON, 2012).

## 2.2 *Arabidopsis thaliana*

A *A. thaliana* pertence à família *Brassicaceae* no grupo das eudicotiledôneas das angiospermas vasculares. Ela é o modelo genético central e organismo de referência universal para ciência de plantas e de culturas agrícolas. A integração entre diferentes áreas de pesquisa no estudo desta planta contribuiu amplamente para o entendimento molecular de conceitos chave em biologia (KRÄMER, 2015).

Diversas propriedades permitem que a *Arabidopsis* seja o modelo para o estudo de plantas: tamanho pequeno; tempo de geração curto; habilidade de crescer bem em condições controladas, tanto em solo, como em placas com meio de cultura; alta fecundidade, mais de 10.000 sementes por planta; facilidade na manutenção de mutantes, devido a autofertilização; possibilidade de cruzamento entre diferentes linhagens; possui o menor genoma conhecido entre as plantas (125 Mb), com menos sequências repetitivas do que outras plantas; possui apenas 5 cromossomos e pode ser facilmente transformada via transferência de gene por *Agrobacterium*, um pré-requisito para diversos experimentos genéticos moleculares (PAGE e GROSSNIKLAUS, 2002).

O sucesso da *Arabidopsis* como organismo se deve principalmente à possibilidade para a triagem de genética *forward*, onde a variação genética é artificialmente induzida e as plantas mutantes são triadas para os fenótipos de interesse (PAGE e GROSSNIKLAUS, 2002). Ao contrário da genética *reverse*, onde se determina qual seria o fenótipo consequente de uma sequência genética em particular, o que é a abordagem do GWAS. Estas duas abordagens podem ser complementares, pois os genes candidatos resultantes das análises do GWAS podem validados experimentalmente através da construção de mutantes.

A principal abordagem genética para inserção mutacional em *Arabidopsis* é a T-DNA (DNA transferido) mediada por *Agrobacterium*. Esta metodologia resulta na integração de uma sequência de T-DNA, que é parte de um grande plasmídeo bacteriano, de maneira aleatória e estável, no genoma nuclear da planta. O *floral dipping* é um método eficaz para a transformação por T-DNA, onde as plantas de *Arabidopsis* são crescidas até a floração e mergulhadas em uma solução contendo *Agrobacterium*. Esta abordagem permite gerar milhares de mutantes de maneira relativamente fácil e rápida (PAGE e GROSSNIKLAUS (2002).

Devido à grande quantidade de mutantes gerados, foi necessário que se criassem centros organizados para o armazenamento e distribuição destes mutantes (estoques). Dois centros de estoques foram estabelecidos no início dos anos 90: *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) e *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC). Desde, então estes centros vêm sendo apoiados por agências financiadoras e os estoques recebem contribuições da comunidade que estuda esta planta. Desde a criação destes centros o número de estoques e sua distribuição vem aumentando rapidamente. Em 1992, 8.000 estoques foram distribuídos pelo ABRC, ao passo que em 2014, mais de 180.000 estoques foram distribuídos, sendo a grande maioria pertencente às categorias de mutantes T-DNA e linhagens individuais. (PROVART, 2016).

Além da organização de centros de estoques, a comunidade da *Arabidopsis* também tem uma longa história de organização de dados de genoma e outros tipos de dados em portais de acesso público. Estes portais e a disponibilidade de ferramentas online modificaram o jeito de desenhar e interpretar experimentos. Uma importante ferramenta online é o GWA-Portal, citado na seção 2.1 deste trabalho. Além da análise de GWAS, este software permite que sejam feitas análises de desequilíbrio de ligação e efeito alélico (SEREN, 2018). O desenvolvimento de ferramentas para a análise fenotípica de *Arabidopsis* é essencial para a para o estudo desta planta. O programa EZ-Root-VIS (ROGERS, 2018) permite a análise de plantas de *Arabidopsis* crescidas em placas com meio de cultura, além de fornecer análises estatísticas para grandes conjuntos de dados de fenotipagem. Alguns portais disponibilizam dados de expressão gênica que são fornecidos individualmente por pesquisadores para auxiliar no entendimento sobre a resposta da *Arabidopsis* com relação ao seu desenvolvimento e sob diferentes condições ambientais (TOUFIGHI, 2005). O ATTED-II (OBAYASHI, 2018) é um banco de dados de co-expressão que permite a identificação

de genes com padrões de expressão similares, o que permite uma triagem *in silico* para identificar genes associados a uma via biológica específica.

As características biológicas acima citadas, o desenvolvimento de centros de armazenamento para estoques de mutantes e a criação de bancos de dados e ferramentas online para *Arabidopsis* demonstram sua importância como organismo modelo. Devido a todas estas vantagens, muitas descobertas foram realizadas em *Arabidopsis* e posteriormente estudadas e aplicadas em plantas maiores e de maior importância agrícola.

### **2.3 Bactérias promotoras do crescimento vegetal**

As contemporâneas práticas de agricultura aumentaram drasticamente o rendimento agrícola ao longo das últimas décadas, este aumento é essencialmente devido à aplicação de fertilizantes e pesticidas químicos, equipamentos que permitem a irrigação de grandes áreas e o desenvolvimento de híbridos. A maior produção agrícola se faz necessária para que ela atenda as demandas alimentícia, de processos industriais e de biocombustíveis de uma população global que é estimada a atingir 8 bilhões de habitantes em 2025 e 9 bilhões em 2050 (RAMAKRISHNA, 2019 e VEJAN, 2016). Entretanto, o uso intenso de fertilizantes e pesticidas químicos causa riscos à saúde humana e problemas ambientais como contaminação da água, degradação da qualidade do solo e redução na biodiversidade (TILMAN 2002).

O uso excessivo de fertilizantes nitrogenados produz óxido nitroso ( $N_2O$ ), um gás que contribui para efeito estufa e o aquecimento global. Além disso, os fertilizantes reduzem a fixação biológica de nitrogênio no solo. Durante a fertilização do solo, o nitrato de amônio é utilizado e devido ao influxo desse componente, as plantas não necessitam de microrganismos simbióticos fixadores de nitrogênio para fornecer nitrato de amônio, o que causa a diminuição da simbiose. O excesso de nitrato de amônio favorece a população de bactérias nitrificantes, visto que estas bactérias o utilizam para a produção de nitrato. Esse nitrato em abundância é então utilizado por bactérias desnitrificantes para a produção de  $N_2O$  e o excesso de nitrato é lixiviado para os lençóis freáticos (GALLOWAY 2008). Consequentemente, o aumento nos processos microbianos de nitrificação e desnitrificação aumentam a produção natural de  $N_2O$ .



Devido à crescente demanda agrícola e seu negativo impacto ambiental e na saúde humana, a agricultura está mudando para uma abordagem sustentável e que não causa danos ao meio ambiente. Para uma maior produção, as plantas de cultivo precisam apresentar as seguintes características: resistência a doenças, seca, metais pesados e um melhor valor nutricional. Microrganismos do solo podem auxiliar na obtenção destas propriedades, eles desempenham um importante papel na regulação da fertilidade do solo, ciclagem de nutrientes e manutenção da diversidade de plantas (FITZSIMONS and MILLER 2010).

Entre os microrganismos do solo, são encontradas as bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPB). Estas bactérias colonizam as raízes das plantas e aumentam o seu crescimento. Além deste aumento, as PGPB também exercem um papel no controle de fitopatógenos e na compensação de estresses biótico e abiótico. Conseqüentemente, em razão destas características PGPB são promissores biofertilizantes. Elas podem ser classificadas de acordo com o tipo de interação com as plantas: simbióticas, que vivem dentro das plantas e trocam metabólitos com elas diretamente, e rizobactérias de vida livre, que vivem fora das células das plantas. A maioria das bactérias simbióticas permanecem no espaço intercelular da planta hospedeira, mas algumas bactérias são capazes de formar interações mutualísticas e penetrar nas células das plantas. Em alguns casos, as bactérias mutualísticas podem integrar sua fisiologia à de plantas leguminosas, formando estruturas especializadas chamadas nódulos, onde as bactérias fixam nitrogênio para a sua hospedeira (VEJAN, 2016).

#### **2.4 Mecanismos de promoção do crescimento vegetal por PGPB**

PGPB promovem o crescimento vegetal por diversos mecanismos de ação, eles podem ser classificados em direto ou indireto. Os mecanismos diretos estão relacionados a facilitação na aquisição de recursos e modulação dos níveis hormonais da planta, o que inclui biofertilização, estimulação do crescimento da raiz, rizoremediação e controle do estresse. Por outro lado, os mecanismos indiretos são compostos por ações de biocontrole, que abragem a redução no impacto de doenças, ação antibiótica, indução do sistema de resistência e a competição por nutrientes e nichos (GRAY and SMITH, 2005 e VURUKONDA, 2018). As abordagens das PGPB para a promoção do crescimento de plantas incluem: tolerância ao estresse abiótico, aumento na captação

de nutrientes, produção de fitormônios, produção de sideróforos, produção de compostos orgânicos voláteis e produção de enzimas de proteção (VEJAN, 2016). Os mecanismos de promoção do crescimento estão resumidos na figura 2.

O estresse abiótico é considerado o maior causador da redução na produtividade agrícola e depende do tipo de solo e de fatores da planta. As PGPB podem atenuar a toxicidade pela poluição de cádmio, por exemplo, pela capacidade de se ligar aos íons de cádmio e assim diminuindo sua disponibilidade no solo (PISHCHIK, 2002). O estresse pela salinidade e seca também é um importante fator abiótico, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* tem a capacidade de melhorar o crescimento de *Vigna radiata* sob condições de seca (SARMA and SAIKIA, 2014). A absorção de água pela planta depende da abertura dos estômatos, e Naveed e colaboradores (2014) reportaram que a condutância estomatal é aumentada pela PGPB *Burkholderia phytofirmans* em relação a plantas não inoculadas sob condições de seca.

As PGPB também podem promover o crescimento pelo aumento na captação de macro e micronutrientes, melhorando a disponibilidade de nutrientes na rizosfera. Bactérias fixadoras de nitrogênio podem converter o nitrogênio atmosférico em amônia, o qual é utilizado pela planta. O nitrogênio é o maior fator limitante para o crescimento de plantas, visto que é necessário para as sínteses de aminoácidos e proteínas. As bactérias fixadoras de nitrogênio são organismos majoritariamente simbióticos e capazes de formar nódulos em plantas leguminosas, porém bactérias de vida livre como *Azospirillum* e *Burkholderia* também podem fixar nitrogênio e se associar a plantas como milho, trigo e arroz. Além disso, no solo, há uma grande disponibilidade de fósforo, porém ele não pode ser absorvido pelas plantas nesta forma, limitando assim, seu crescimento. Algumas bactérias são capazes de converter fósforo em fosfato, disponibilizando este nutriente para a planta. *Azospirillum*, *Bacillus* e *Pseudomonas* são exemplos de bactérias capazes de realizar esta conversão (PÉREZ-MONTAÑO, 2014).

Algumas bactérias têm a capacidade de produzir ou alterar a concentração de fitormônios envolvidos no crescimento vegetal através da produção de reguladores do crescimento vegetal. Fitormônios são substâncias orgânicas, encontradas em concentrações extremamente baixas, que exercem influência em processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos da planta. (VEJAN, 2016). Os fitormônios podem estimular ou inibir o crescimento da planta, influenciando processos de crescimento, diferenciação e desenvolvimento. A auxina, por exemplo, é um dos principais

hormônios reguladores do crescimento vegetal, agindo direta ou indiretamente. O *Bacillus spp* tem a capacidade de produzi-la e mostrou um efeito positivo no crescimento de batata (*Solanum tuberosum*) (AHMED and HASNAIN, 2010).

Outro mecanismo das PGPB que pode contribuir para um maior crescimento vegetal é a produção de sideróforos. O ferro, na maneira como é encontrado no solo,  $F^{3+}$ , é altamente insolúvel e não pode ser absorvido pelas plantas. Sideróforos são proteínas quelantes de  $F^{3+}$  do ambiente e quando o ferro é limitado no solo, sideróforos microbianos podem fornecer ferro às plantas, melhorando seu crescimento (FLORES-FÉLIX, 2015).

As bactérias também são capazes de produzir compostos orgânicos voláteis (VOC) induzem resistência sistêmica contra patógenos. *Pseudomonas simiae* WCS417r é uma PGPB e a estimulação do crescimento se deve em parte à produção destes compostos (WINTERMANS, 2016). E por fim, PGPB também possuem a habilidade de produzir enzimas protetoras, controlando agentes fitopatogênicos através da produção de metabólitos que contribuem para as propriedades antifúngicas e antibióticas do sistema de defesa. Este mecanismo envolve, por exemplo, a produção de enzimas hidrolíticas, que inibem o crescimento fúngico, visto que na maioria dos fungos a parede celular é composta por quitinas e beta-glucanos (RAMAKRISHNA, 2019). Estirpes pertencentes às famílias Pseudomonadaceae e Comamonadaceae são capazes de proteger a planta contra a inibição do crescimento mediada por fungos (DURÁN, 2018)

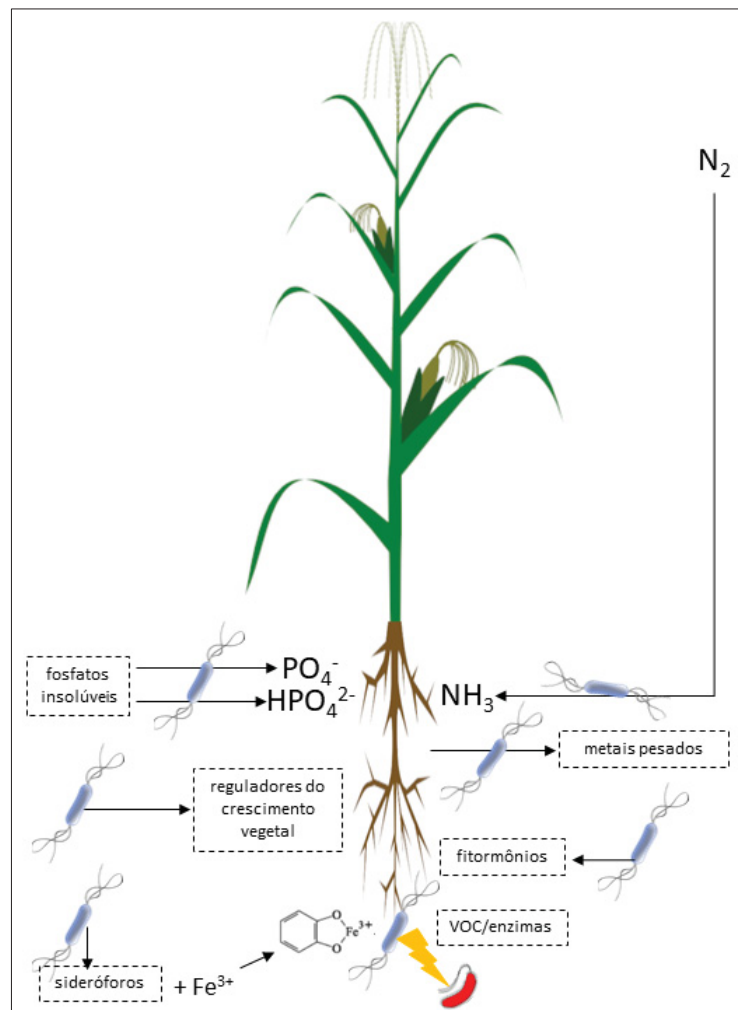


Figure 2 - Mecanismos de ação de PGPB para a promoção do crescimento vegetal. Os mecanismos de ação das PGPB incluem: solubilização de fosfatos, produção de substâncias que alteram as concentrações de fitormônios, produção de sideróforos, produção de compostos orgânicos voláteis (VOC) ou enzimas para a defesa contra patógenos, produção de fitormônios, ligação a metais pesados e fixação de nitrogênio. Fonte: a autora.

## 2.5 Especificidade da associação entre PGPB e a planta hospedeira

A maioria dos grupos de PGPB pertence aos filos Proteobacteria e Firmicutes, entre as firmicutes, *Bacillus spp.* é a bactéria predominante com atividade de promoção do crescimento vegetal. As plantas hospedeiras que se associam com PGPB pertencem as famílias Fabaceae, Poaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Crassulaceae e Solanaceae. A soja, importante cultura agrícola, pertence à família Fabaceae (família das leguminosas) e relações simbióticas entre bactérias

endofíticas e fixadoras de nitrogênio e leguminosas são muito bem caracterizadas (OLDROYD, 2011). Plantas como sorgo e milho pertencem à família Poaceae, as PGPB associadas a estas plantas são bactérias de vida livre como *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia sp.* e *Azospirillum sp.*, e bactérias endofíticas como *Bacillus spp.* (RAMAKRISHNA, 2019).

A preferência da planta por determinadas bactérias tem sido demonstrada visto que comunidade microbianas associadas a plantas e solo mostram certa especificidade que pode ser atribuída aos metabólitos secundários liberados por exsudatos da raiz. Um estudo identificou  $\alpha$ -diversidade (dentro da amostra) e  $\beta$ -diversidade (entre as amostras) na rizosfera de 27 linhagens de milho ao longo de 4 campos em diferentes locais nos Estados Unidos, o que provavelmente está relacionado à genética do hospedeiro (PEIFFER, 2013). Os dados existentes mostram que existe alguma semelhança entre as bactérias associadas a diferentes plantas, mas ao mesmo tempo, existem bactérias específicas associadas a espécies de plantas (RAMAKRISHNA, 2019).

## 2.6 *Bacillus* promotores do crescimento vegetal

O *Bacillus spp.* tem a habilidade de formar esporos, o que permite a este organismo sobreviver por um longo tempo sob condições desfavoráveis, além de secretar diversos metabólitos que promovem o crescimento vegetal e protegem a planta contra patógenos. Algumas PGPB tem sido comercializadas devido a sua sobrevivência em diversos ambientes com diferentes fatores bióticos e abióticos (RADHAKRISHNAN, 2017). A primeira bactéria comercial, Alinit, foi desenvolvida de *Bacillus subtilis* FZB24 e resultou em 40% de aumento no rendimento da colheita (KILIAN, 2001). Biofertilizantes a base de *Bacillus* são mais ativos quando comparados a biofertilizantes a base de *Pseudomonas* devido à maior produção de metabólitos efetivos e a formação de esporos, características do *Bacillus*, que aumentam a viabilidade das células nos produtos comercializados (RADHAKRISHNAN, 2017).

*Bacillus spp.* são bactérias gram positivas encontradas em todos os nichos meio ambiente e promovem o crescimento vegetal por diversas maneiras. Os *Bacillus* podem converter a forma complexa de nutrientes essenciais, como P e N, em formas simples e disponibilizá-los para a captação pelas raízes das plantas. A secreção de fosfatases e ácidos orgânicos por *Bacillus spp.* acidifica o ambiente ao seu redor para facilitar a conversão de fosfato inorgânico em fosfato livre.

Fosfato é envolvido no metabolismo de ácidos nucleicos, fosfolípidos e ATP. Além disso, algumas espécies de *Bacillus* possuem o gene *nifH* e produzem nitrogenase, que é capaz de fixar nitrogênio atmosférico e fornecê-lo para as plantas. Nitrogênio é um importante componente de proteínas, ácidos nucleicos e outros compostos orgânicos nas plantas (KANG, 2015). Esta bactéria também possui a propriedade de quelar  $\text{Fe}^{3+}$  através da produção de sideróforos, os quais solubilizam o ferro dos minerais e compostos orgânicos da rizosfera e o tornam disponível para a planta (WALKER and CONNOLLY, 2008). O *Bacillus spp.* também sintetiza substâncias promotoras do crescimento vegetal como ácido indol acético (IAA), ácido abscísico (ABA) giberelinas e citoquininas, que aumentam a divisão e a elongação celular nas raízes e na parte aérea. A 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase também pode ser produzida por *Bacillus*, inibindo a síntese de etileno e, assim, aumentando o crescimento vegetal (RADHAKRISHNAN, 2017).

Fatores de estresses biótico e abiótico tem grandes efeitos em plantas de cultivo. As mudanças induzidas por *Bacillus* na planta, como regulação no transporte de água, captação de nutrientes e ativação dos sistemas imune e antioxidante, atenuam os efeitos do estresse. Plantas inoculadas com *Bacillus spp.* captam mais água (MARULANDA, 2009), N, P e  $\text{K}^+$  (BARNAWAL, 2013), o que é um importante mecanismo contra danos causados em condições de seca. Além disso, esta bactéria regula o transportador de potássio de alta afinidade 1 (HKT1), que modula a homeostase de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  para atenuar o estresse causado por seca. O  $\text{K}^+$  desempenha um importante papel na abertura estomatal, manutenção da pressão de turgor, balanço osmótico e controle da taxa de transpiração nas plantas sob estresse hídrico (LOUTFY, 2012). Os mecanismos pelos quais o *Bacillus spp.* promove o crescimento ou protege a planta sob condições de estresse estão resumidos na tabela 1.

A limitação de água perturba os processos fisiológicos normais da planta, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS), o que danifica proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. A associação de plantas com *Bacillus* pode reduzir a formação de ROS. O *B. safensis* aumenta a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase, peroxidase, ascorbato redutase e glutathiona redutase (KASIM, 2013). A condição de estresse hídrico também afeta o metabolismo de aminoácidos, durante esta condição, alguns aminoácidos são acumulados e desencadeiam a produção de metabólitos secundários para atenuar o estresse oxidativo. A síntese de aminoácidos das famílias

aromáticas, glutâmicas e aspartáticas é maior em plantas associadas a *Bacillus spp* (GAGNÉ-BOURQUE, 2016). A produção de hormônios e ACC desaminase por *Bacillus* regula o crescimento vegetal aumentando os níveis de hormônios relacionados ao estresse. A acumulação de ABA aumenta a tolerância pela ativação de enzimas antioxidantes e previne a perda de água por fechamento dos estômatos (ZHU, 2011). Enquanto o ácido salicílico (SA) induz a expressão de genes relacionados ao estresse para manter a estabilidade da membrana e prevenir a acumulação de ROS (JUMALI, 2011).

A condição de seca também inibe a produção de pigmentos, enquanto *Bacillus spp.* estimula a síntese de clorofila e carotenoides a e b em plantas estressadas, o que aumenta a fotossíntese (ABEER, 2015). Devido às características citadas acima, a interação entre a planta e *Bacillus spp.* promove a tolerância à seca por aumentar a captação de água, o transporte de nutrientes, a síntese de hormônios e pigmentos e por regular genes relacionados ao estresse e a antioxidantes.

Outro importante fator de estresse abiótico é a alta salinidade. Para tolerar o estresse salino as plantas devem prevenir a captação em excesso de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , entretanto elas devem continuar captando nutrientes essenciais como  $\text{K}^+$ , P e  $\text{NO}_3^-$ . *Bacillus insolitus* MAS17 produz exopolissacarídeos (EPS) na rizosfera do solo que se ligam a  $\text{Na}^+$  e inibem o seu transporte para dentro das células da planta, atenuando os efeitos do estresse salino (ASHRAF, 2004). *Bacillus spp.* também pode reduzir a toxicidade da salinidade nas plantas inibindo a peroxidação lipídica. *B. subtilis* aumenta a síntese lipídica, especificamente dos ácidos oleico, linoleico e linolênico e de fosfolipídeos em plantas sob estresse salino, o que atenua a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo (HAN, 2014). O *B. subtilis* RH-4 tolerante a salinidade aumenta a síntese de pigmentos fotossintéticos, carboidratos, proteínas e osmólitos, como prolina e glicina, em plantas de grão de bico com injúrias devido à salinidade (QURASHI, 2013). Sob condições de estresse salino *Bacillus spp.* pode produzir fitormônios para aumentar a concentração de IAA e giberelinas, mas reduzir as concentrações de ABA (MOHAMED and GOMAA, 2012).

Solos agrícolas contaminados com traços de metais depositados de efluentes industriais afetam a cultura agrícola e alteram a comunidade microbiana. Microrganismos solubilizam ou convertem metais tóxicos em formas não tóxicas e podem ser utilizados para a fitorremediação de solo com metais pesados. O *B. licheniformis* aumenta a acumulação e distribuição de Cu, Zn, Cd, Cr e Pb em plantas crescidas em solos contaminados com metais pesados, o que reduz os níveis de



metas tóxicos no solo (BRUNETTI, 2012). Os metais Pb e As, maior contaminação industrial de solos, aceleram a peroxidação lipídica nas plantas. *Bacillus spp.* podem aliviar esse efeito pela redução da peroxidação lipídica e da atividade da superóxido dismutase e pelo aumento de amilase e protease para promover o crescimento vegetal em solos contaminados (PANDEY, 2013). Na presença de Ni e Cr, *Bacillus* podem melhorar a tolerância a estes metais pelo aumento de pigmentos fotossintéticos e leg-hemoglobina (JAMIL, 2014).

A utilização de *Bacillus* é uma abordagem ambientalmente segura para aumentar a produtividade agrícola na presença de pestes, um fator de estresse biótico. *B. thuringiensis* é um bioinseticida bem conhecido que pode controlar um amplo espectro de insetos. Os insetos *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera littoralis*, *Oryzophagus oryzae*, *Spodoptera frugiperda* e *Chilo partellus* inibem o crescimento vegetal e causam danos às frutas, mas o *B. thuringiensis* inibe o crescimento das larvas dos insetos (ARRIZUBIETA, 2016). Os *Bacillus* colonizam diversas partes das plantas, incluindo a filosfera e larvas e/ou insetos adultos ingerem os tecidos da planta contendo *Bacillus* durante a alimentação. O primeiro estágio de infecção nas larvas é no epitélio intestinal por proteínas cristalinas das bactérias, que interagem com membranas peritróficas de quitina. Nos estágios mais avançados de infecção, as proteínas endoxitinas cristalinas, lipopetídeos e policetídeos da bactéria modificam a vacuolização do citoplasma, induzem a formação de vesículas, lisam a borda da membrana e degradam a membrana apical, levando ao dano das microvilosidades e a morte da larva (BOUKEDI, 2016).

Outro fator de estresse biótico é a presença de bactérias, fungos e vírus. O *Bacillus spp.* inibe o crescimento microbiano no solo e nos tecidos vegetais. A formação de biofilme ao redor da superfície da raiz por *Bacillus spp.* e a secreção de toxinas, que degradam a parede celular bacteriana, inibem o crescimento de populações bacterianas patogênicas e reduz a incidência de doenças em plantas (ELSHAKH, 2016). Bactérias patogênicas como *R. solanacearum* e *Xanthomonas oryzae* afetam o sistema imune das plantas diminuindo a atividade de enzimas de defesa, porém a atividade destas enzimas é acelerada com a administração de *Bacillus spp.* (CHITHRASHREE, 2011).

Fungos são o maior grupo causador de doenças em plantas, porém seus efeitos também podem ser atenuados com a utilização de *Bacillus spp.* Esta bactéria ataca a parede celular dos micélios e as quitosanases, proteases, celulasas, glucanases, sideróforos e o ácido cianídrico da

bactéria quebram e deformam as hifas, o que leva a alteração na estrutura e função celulares devido a vacuolização e vazamento do protoplasto (BEN KHEDHER, 2015). Além disso os efeitos da infecção por fungo, podem ser atenuados pela inoculação de *Bacillus spp.* pela reprogramação de atividade de enzimas de defesa e de fitormônios (RADHAKRISHNAN, 2017). O segundo maior grupo causador de doenças em plantas é composto por vírus. Alguns *Bacillus spp.* produzem compostos antivirais contra patógenos. Em pepino, a doença causada por infecção do vírus do mosaico do tabaco é reduzida pela interação com *Bacillus* através da ativação da resistência sistêmica induzida (ISR) da planta (ZHANG, (2004). O *B. amyloliquefaciens plantarum* pode formar biofilme e produzir surfactina defendendo a planta de infecção viral por desencadear a maquinaria da IRS. O *Bacillus spp.* também pode auxiliar na defesa contra o vírus do mosaico do tabaco inibindo a síntese da proteína de revestimento viral e aumentando a expressão de genes sinalizadores de resistência a doença, genes de defesa e de genes da expansina da parede celular em plantas (WANG, 2009)

Stress factors	Plant functions		References
	Stressed plants	Stressed plants with <i>Bacillus</i>	
<b>DROUGHT</b>	Reduce plant growth Decrease the water, nutrients (N, P, K, Ca, Mg, Zn, Cu, Mn, and Fe) and pigments Up or down regulate the antioxidants (CAT, SOD, POD, APX, and GR), hormones (SA, JA, and ABA) and drought responsible genes	Enhance plant growth Increase the water, nutrients (N, P, K, Ca, Mg, Zn, Cu, Mn, and Fe), pigments and hormones (SA, JA, and ABA). Up or down regulate the antioxidants (CAT, SOD, POD, APX, and GR) and drought responsible genes	Marulanda et al., 2009; Jumali et al., 2011; Barnawal et al., 2013; Castillo et al., 2013; Kasim et al., 2013; Armada et al., 2014, 2015; Timmusk et al., 2015; Kakar et al., 2016
<b>SOIL SALINITY</b>	Reduce plant growth Decrease the water, nutrients (N, P, K, Ca, Mg, S, Mn, Cu, and Fe), antioxidants (CAT and POD), pigments and hormones (IAA and GA). Increase the Na, Cl, ABA, and caspase activity; Up or down regulate the salt stress responsible genes	Enhance plant growth Increase the water, nutrients (N, P, K, Ca, Mg, S, Mn, Cu, and Fe), antioxidants (CAT and POD), pigments and hormones (IAA and GA). Decrease the Na, Cl, ABA and caspase activity; Up or down regulate the salt stress responsible genes	Ashraf et al., 2004; Jha and Subramanian, 2012; Mohamed and Gornaa, 2012; Karlidag, 2013; Nautiyal et al., 2013; Qurashi and Sabri, 2013; Kang et al., 2014b
<b>HEAVY METALS</b>	Reduce plant growth Decrease the water, nutrients (P, Ca, Fe, Mn, Zn, Cu, Cd Cr, and Pb) and pigments Up or down regulate the antioxidants (SOD, POD, APX, and DHAR)	Enhance plant growth Increase the water, nutrients (P, Ca, Fe, Mn, Zn, Cu, Cd Cr, and Pb) and pigments Up or down regulate the antioxidants (SOD, POD, APX, and DHAR)	Wani and Khan, 2010; Malekzadeh et al., 2012; Gururani et al., 2013; Wang et al., 2013; Jamil et al., 2014
<b>PEST</b>	Increase the larval population Reduce or stimulate the JA, ISR, and allelochemicals	Decrease the larval population Enhance the JA, ISR, and allelochemicals	Ben-Khedher et al., 2015a; Arrizubieta et al., 2016; Boukedi et al., 2016; Gadhav and Gange, 2016; Zebelo et al., 2016
<b>PATHOGENIC BACTERIA</b>	Increase the pathogenic bacterial population Decrease the defense enzymes (PAL, POD, PPO, SOD, CAT, and LOX), SA, pathogen resistant genes and proteins	Decrease the pathogenic bacterial population Increase the defense enzymes (PAL, POD, PPO, SOD, CAT, and LOX), SA, pathogen resistant genes and proteins	Chithrathree et al., 2011; Almonaay et al., 2013; Kurabachew and Wydra, 2014; Jiang et al., 2015; Fousia et al., 2016; Hinarejos et al., 2016
<b>PATHOGENIC FUNGI</b>	Increase the pathogenic fungal population Up or down regulate the antioxidants (APX, GPX, POD, CAT, GR, PPO, and SOD), defense enzymes (PAL, chi, and glu), hormones (JA, ABA, IAA, GA, and SA)	Decrease the pathogenic fungal population Up or down regulate the antioxidants (APX, GPX, POD, CAT, GR, PPO, and SOD), defense enzymes (PAL, chi, and glu), hormones (JA, ABA, IAA, GA, and SA)	Liu et al., 2010; Chowdappa et al., 2013; Jain et al., 2013; Kang et al., 2015b; Kim et al., 2015; Narendra-Babu et al., 2015; Rahman et al., 2015; Yang et al., 2015

Table 1 - Mudanças fisiológicas e bioquímicas induzidas por *Bacillus* em plantas de cultura agrícola durante seca, estresse por salinidade, acúmulo de metais pesados e infecção por fungos e bactérias patogênicos. Fonte: Radhakrishnan R.; Hashem A. and Abd\_Allah, E.F. (2017) *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. *Front. Physiol.* 8:667.

## 2.7 *Bacillus pumilus*

Probanza e autores (1996) demonstraram que a bactéria *Bacillus pumilus* é uma PGPB, fixadora de nitrogênio, capaz de crescer em meio livre de nitrogênio e de reduzir acetileno a etileno. Em *Alnus glutinosa* (alder europeia) foi verificado o aumento no conteúdo de nitrogênio e na superfície e comprimento da parte aérea em plantas tratadas com o meio de cultura livre de bactérias. Neste estudo, o *B. pumilus* foi incubado até atingir a fase estacionária e o meio de cultura foi filtrado e aplicado nas plantas quando atingiam o estágio de 4 folhas maduras.

Gutierrez-Manero e autores (2001) demonstraram que *B. pumilus* CECT 5105 produz quantidades significativas de giberelinas, mais de 200 ng.ml<sup>-1</sup> de cultura em 24 h de incubação, enquanto bactérias como *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* produzem cerca de 15 ng.ml<sup>-1</sup> depois de 2 a 5 dias de incubação. Este mesmo estudo mostrou que o meio, em que estas bactérias são cultivadas, tem a capacidade de alongar o caule e a parte aérea de alder (*Alnus glutinosa*). Entretanto, mais estudos são necessários para compreender a promoção do crescimento por *B. pumilus* pois as características aumentadas nas plantas tratadas não são explicadas somente pela produção de giberelinas. Lee e colaboradores (2004) também comprovaram a produção de giberelinas por *B. pumilus*. Neste estudo plântulas de pimenta inoculadas com *B. pumilus* CJ-69 tiveram a altura e o peso fresco aumentados em 20% e 12%, respectivamente.

Xie e colaboradores (2019) avaliaram os efeitos do *B. pumilus* em alcaçuz chinês (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) em condições de estresse por seca. Eles verificaram que a inoculação com *B. pumilus* aumenta o comprimento da raiz, número de raízes laterais e o peso seco, recuperando as plantas da inibição do crescimento causado pela seca. Neste estudo foi verificado que a inoculação com *B. pumilus* aumenta em 34.9% a biomassa total de plantas sob estresse hídrico. Os autores sugerem que a promoção do crescimento nesta condição se deve ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes que levam ao aumento de alguns metabólitos secundários como a glicirrizina.

O *B. pumilus* também apresenta atividade antifúngica. Gurav e autores (2017) verificaram que uma quitinase extracelular produzida por *B. pumilus* RST25 é capaz de quebrar a molécula de quitina em fragmentos de N-acetyl D-glucosamine. Ensaios in vitro confirmaram o potencial antifúngico desta quitinase contra *Fusarium solani* e *Aspergillus niger*. Além disso, sementes cobertas com esta quitinase foram efetivas em controlar a invasão de fungos patogênicos.

Ansari e colaboradores (2019) analisaram a promoção do crescimento em trigo por *B. pumilus* FAB10 sob estresse salino. Nas plantas tratadas com NaCl nas concentrações de 75, 125 e 250 mM, plantas inoculadas aumentaram o comprimento da raiz em 36.2, 52.7 e 57%, respectivamente. Neste estudo a diminuição de enzimas antioxidantes e no conteúdo de malonaldeído também foi observada nas plantas inoculadas na presença de NaCl.

A estirpe *B. pumilus* TUAT-1, organismo de estudo no presente trabalho, foi originalmente isolada de plantas de arroz no Japão, onde é comercializada como bioinoculante. Win e colaboradores (2018) analisaram a promoção de crescimento em arroz por *B. pumilus* TUAT-1 combinado com diferentes concentrações de nitrogênio em campo. Eles mostraram que na fase inicial do crescimento, para comprimento da raiz e área de superfície da raiz, os tratamentos inoculados são significativamente maiores que os não inoculados. Após 21 dias as plântulas foram transferidas para o campo, e neste momento, em todos os tratamentos com nitrogênio, as plântulas de arroz inoculadas com TUAT-1 produziram uma biomassa aproximadamente 17% maior que as não inoculadas. 45 dias após a transferência para o campo, a combinação de TUAT-1 e diferentes concentrações de nitrogênio também teve efeito significativo no conteúdo de clorofila e na altura da planta. Neste trabalho, também é relatado que a promoção do crescimento pela inoculação de TUAT-1 foi acompanhada pelo aumento dos níveis de nitrogênio nos tecidos da planta testados na forragem do arroz.

### **2.7.1 GWAS para a interação entre planta e bactéria**

A interação entre plantas e bactérias vem sendo estudada há muito tempo. Embora poucos trabalhos tenham sido publicados sobre a análise desta interação através do GWAS, esta abordagem se mostrou promissora para o entendimento da interação entre planta e bactéria e a promoção do crescimento vegetal por PGPB.

Wintermans e autores (2016) analisaram a promoção do crescimento em *Arabidopsis* pela rizobactéria *Pseudomonas simiae* WCS417r através do GWAS. Eles analisaram 302 ecótipos de *Arabidopsis* para características da arquitetura da raiz e peso seco da parte aérea. Neste estudo, todos os ecótipos responderam positivamente à inoculação com WCS417r, apesar de haver uma grande variação no grau desta resposta. Os autores encontraram genes candidatos que codificam proteínas importantes para o processo de promoção do crescimento, como o transportador de citoquinina (PUP19), a proteína relacionada a fotossíntese Golden2-like (GLK1), a proteína Rubisco relacionada a biogênese (DEAD box RH39), a transportador transmembrana de carboidrato (AT2G18480), a proteína Nitrilase-like 1 (NLP1) e a hidroximetiltransferase de serina (SHM2) relacionada a fotorespiração mitocondrial. Os resultados encontrados neste estudo

forneem componente genéticos que podem contribuir pra a capacidade de promoção do crescimento pela *Pseudomonas simiae* WCS417r.

Kamfwa e autores (2015) utilizaram o GWAS para analisar a fixação simbiótica de nitrogênio (SNF) resultante da interação entre feijão (*Phaseolus vulgaris*) e *Rhizobium tropici* CIAT 899. Eles utilizaram um painel de 259 genótipos de feijão para avaliar os seguintes parâmetros: conteúdo de clorofila, score de nodulação, biomassa da parte aérea, N% na biomassa da parte aérea, N% na semente, nitrogênio derivado da fixação (Ndfa), Nfda% na parte aérea, Nfda na parte aérea e Nfda na semente. Neste estudo, os experimentos foram realizados em casa de vegetação e em campo. Os autores identificaram três genes candidatos relacionados a fixação biológica de nitrogênio que codificam para um receptor rico em leucina repetitiva (LRR-RLK) que desempenha um papel importante na formação do nódulo. Outro gene candidato, identificado neste trabalho, codifica para uma proteína transportadora cálcio. Após a percepção de fatores de nodulação pela planta, ocorre um aumento nos níveis de cálcio livre no citoplasma das células dos pelos radiculares.

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

#### **Genome-wide Association Studies Reveal Important Candidate Genes for the *Bacillus pumilus* and *Arabidopsis thaliana* Interaction**

Marina Soneghett Cotta<sup>1,2</sup>; Fernanda do Amaral<sup>1</sup>; Roseli Wassem<sup>1,2</sup>; Leonardo Magalhães Cruz<sup>2</sup>; Fábio de Oliveira Pedrosa<sup>2</sup>; Emanuel Maltempi de Souza<sup>2</sup>; Tadashi Yokoyama<sup>3</sup>; Gary Stacey<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Divisions of Plant Science and Biochemistry, C. S. Bond Life Science Center, University of Missouri, Columbia, MO, USA.

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

<sup>3</sup> Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan

#### **3.1 ABSTRACT**

The plant growth promoting bacterium (PGPB) *Bacillus pumilus* is a nitrogen fixing and a gibberellin producer that increases the nitrogen content and shoot length and surface in plants. In addition, this PGPB has the capability of improving plant growth under drought and saline conditions. The strain TUAT-1 can increase rice's roots and biomass and the content of nitrogen and chlorophyll. In this study, through genome-wide association study (GWAS), we evaluated the interaction between TUAT-1 and *Arabidopsis thaliana*. In order to do that, 288 *A. thaliana* accessions were screened for root architecture traits: main root length (MRL), number of lateral roots (NLR), branched zone (BZ), total root length (TRL) and lateral root length (LRL). Several ecotypes were significantly affected by TUAT-1 inoculation, while some of the ecotypes responded positively for growth, a few ecotypes showed inhibition of root growth upon inoculation. Besides that, some of the ecotypes did not respond to the PGPB inoculation. These results showed the strain-genotype specificity of the plant-bacteria interaction. GWAS analysis revealed significant SNPs in all the traits evaluated, leading to the identification of several genes. The candidate genes selected were very likely associated with the interaction between TUAT-1 and *Arabidopsis* and the plant growth promotion. Here, we show that some of the root architecture characteristics are genetic separable traits associated with the plant growth. In this study, we validated previous reported genes involved in *Bacillus spp.* and plant interaction genes and growth promotion and, highlighted the potential genes involved in these mechanisms. We suggest that plant-bacteria interaction and the plant growth promotion are quantitative and multigene traits. This knowledge expands our understanding of the functional mechanisms driving the plant growth promotion by PGPB.

### 3.2 INTRODUCTION

Modern agriculture practices increased intensively crop yield, due to the use of chemical pesticides and fertilizers, which dramatically damages the environment. The risen in crop yield is necessary due to food, industrial processes and biofuels demands, since the estimated population for 2050 is about 9 billion people (RAMAKRISHNA, 2019 and VEJAN, 2016). Nonetheless, the ways to improve agriculture must be sustainable and environment friendly. Among soil microorganisms, are plant growth promoting bacteria (PGPB), which colonize plant roots and improve its growth. In addition, PGPB play an important role in phytopathogen control and management of biotic and abiotic stresses (VEJAN, 2016).

Plant-bacteria interaction has been studied for a long time, though there are few studies analyzing this interaction and the growth promotion using genome-wide association study (GWAS), a powerful tool to analyze natural variation. So far, two studies were published about PGPB and plant interaction analysis through GWAS. The first one evaluated the genetic basis of variation for symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* inoculated with *Rhizobium tropici* (KAMFWA, 2015). The second analyzed *Pseudomonas simiae* WCS417r and *Arabidopsis thaliana* interaction (WINTERMANS, 2016). In addition, *A. thaliana* was one of the first non-human organisms investigated by GWAS analyses (ATWELL, 2010). This plant is the ideal organism for GWAS analysis, since it can maintain pure inbred lines through self-fertilization, which makes it possible to repeat phenotype of genetically identical individuals (KORTE and FARLOW, 2013).

Most part of PGPB groups belong to Proteobacteria and Firmicutes phylum. Among firmicutes, *Bacillus spp.* is the predominant PGPB. They have spore-forming ability and can survive for a long time under unfavorable conditions (RADHAKRISHNAN, 2017). *B. pumilus* is a nitrogen fixing, as well as a gibberellin producer that can increase the nitrogen content and shoot surface in plants (PROBANZA, 1996). This bacterium produces significant amounts of gibberellins, more than 200 ng.ml<sup>-1</sup> after 24 h (GUTIERREZ-MANERO, 2001 and LEE, 2004). *B. pumilus* also plays an important role on growth promotion under drought and salt stress (HAN, 2014 and XIE 2019) and has antifungal activity (GURAV, 2017). The strain *B. pumilus* TUAT-1, was originally isolated from rice roots, and shown that it can increase root architecture traits and biomass and the content of nitrogen and chlorophyll in this plant (WIN, 2018).



In this study, we used genome-wide association study (GWAS) to understand *B. pumilus* TUAT-1 and *Arabidopsis thaliana* interaction. A panel comprising 288 *A. thaliana* ecotypes was used with the aim to identify traits and genomic regions associated with the plant growth promotion.

### 3.3 MATERIAL AND METHODS

#### 3.3.1 Plant inoculation and growth promotion assay

A panel with 288 *A. thaliana* ecotypes was used to perform this study. The plants were grown under controlled conditions at 22° C with 16/8 h photoperiod. Arabidopsis seeds were sterilized and sited for 4 days at 4° C in the dark. After that, seeds were germinated in Petri dishes with ½ Murashige-Scoog (MS) media (MURASHIGE and SKOOG, 1962) which were placed vertically in a growth chamber. After 6 days, seedlings were transferred to another plate with ½ MS media and inoculated. For each ecotype, there were 3 plates for the control and 3 plates for inoculation. Each plate had a total of 5 plants. The plates were then placed vertically again in a growth chamber for an additional 6 days. For the control plants, 25 µL of 1% saline was added in the plate approximately 3 cm distance away from root tip for each plant. Whereas, the treatment plants were inoculated with 25 µL of TUAT-1 (10<sup>8</sup> CFU/mL). Before treatment, TUAT-1 culture was grown overnight on TSB media at 30° C and diluted 10 times for the inoculation.

After 6 days of inoculation, images were obtained with scanner EPSON PERFECTION V500 PHOTO at 800 dpi. The pictures of the root were analyzed by a software, EZ-Rhizo (ROGERS, 2018), which provided the measures of the root traits analyzed in this study: main root length (MRL), number of lateral roots (NLR), branched zone (BZ), total root length (TRL) and lateral root length (LRL). In total, the 5 traits were measured in approximately 8,640 roots. Averaged root traits data were obtained with GraphPad Prism version 8.00 in Windows. Statistically significant differences between control and inoculated plants was accessed by the same program using multiple Student t test (\*: p < 0.05).

The 5 trait phenotypes were measured by the changes of inoculated plants from the control plants. These phenotypes were calculated by  $\Delta = A2 - A1$ , where A1 was the average of the control plants and A2 was the average of the inoculated plants. A phenotype heatmap was built using OLIVER (TESSMER, 2019) to analyze all of phenotypes from the 288 ecotypes and the relation between the traits.

### **3.3.2 GWAS analysis**

The  $\Delta$  phenotype was used to perform GWAS analysis. Genome-wide association mapping was conducted using GWA-Portal web interface (SEREN, 2018). In this study, two different data sets were used to perform GWAS analysis. The first set, was composed by all ecotypes that were phenotyped (AE data set), while the second set, was composed by the ecotypes that showed at least one trait with significant difference between the control and the inoculated plants (RE data set).

The 250K SNP Dataset from GWA-Portal was used to perform the analysis. The transformations used was LOG and SQRT and the algorithm method was the accelerated mixed model. SNPs with p values lower than  $10^{-7}$  were selected from the growth promotion parameters for gene identification.

### **3.3.3 Genetic traits identification**

To evaluate the impact of the significant SNPs on genomic regions, we analyzed the location of each SNP and the allele effect on the gene through GWA-Portal (SEREN, 2018). The SNPs were classified in the following categories: stop gained, start lost, no synonymous coding, synonymous coding, untranslated region (UTR) prime, intron and intergenic.

Gene identification was performed with GWA-Portal and confirmed through GBrowse tool from The Arabidopsis Information Resource (TAIR) at <https://gbrowse.arabidopsis.org/cgi-bin/gb2/gbrowse/arabidopsis/>. When the SNP was found inside an intergenic region, the linkage disequilibrium (LD) was verified to identify SNPs that were correlated to the significant SNP using the GWA-Portal (SEREN, 2018). SNPs in LD, with the significant intergenic SNPs with a correlation coefficient ( $r^2$ ) higher than 0.5, were used for gene identification. The LD was also specifically analyzed on SNP 29235922 from chromosome 1, which was in a region of high concentration of significant SNPs in the MRL Manhattan plot.

The Gene Ontology (GO) terms were analyzed using the GO Annotations, from TAIR (<https://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp>) and gene ontology networks were built using ClueGo (BINDEA, (2009) to decipher functionally grouped genes.

Networks for gene interaction were also built in order to evaluate the relation between the identified genes. These networks were created using all identified genes, from both data sets, through Cytoscape with String database. To compare our results with previous published data, we also built a network with the identified genes found in this study with genes found for *Pseudomonas simiae* WCS417r and *Arabidopsis thaliana* interaction GWAS (WINTERMANS, 2016).

### **3.3.4 Candidate genes selection**

Candidate genes from were chosen according to the following criteria: genes identified in both data sets or in both transformation analysis, genes with allele alterations that would cause a non-synonymous coding or a stop codon, genes with SNPs in LD with SNP 29235922 in chromosome 1, and genes from the genes interaction networks that had high number of interactions.

To evaluate if the candidate genes were co-regulated with other genes, we verified if they were co-regulated with other genes from other expression data sets using the ATTED-II (OBAYASHI, 2018) gene co-expression database.

## 3.4 RESULTS

### 3.4.1 *A. thaliana* ecotypes response upon TUAT-1 inoculation

Phenotypic analysis was performed using the 288 *Arabidopsis* ecotypes. Several ecotypes were significantly affected by TUAT-1 inoculation: MRL (52.7%), NLR (14.2%), BZ (8.3%), TRL (21.2%) and LRL (19.1%). Many inoculated ecotypes were significantly different from the control for more than one trait, however only one ecotype (Ts-1) showed significant difference for all of the traits (Fig. 3 a). For this study, the plant response (Sup. Fig. 6) was classified in 3 categories: positive response, no response and negative response (Fig. 3). For inoculated ecotypes that showed significant higher measures than the control in a particular trait, the phenotype was considered positive response. In the other hand, for the inoculated ecotypes with significant lower measures than the control, the phenotype was deliberated negative response. The ecotypes that were not significantly affected by inoculation, were considered non-responsive.

For the MRL trait, all ecotypes with significant differences showed decreased measures in the inoculated plant, indicating that this is a general effect of this strain. While for the other traits, the ecotypes showed increased and decreased measures when the difference between control and inoculated plants was significant. The decrease of MRL was already reported for *A. thaliana* (Col-0) inoculated with *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113. The inoculation with UCMB5113 caused 50% reduction of MRL, but an increased outgrowth and elongation of lateral roots, number of root hairs, and total root area compared to control plants (ASARI, 2017).

In our study, 96 ecotypes have no response to TUAT-1 inoculation for all traits (Fig. 3 b). In contrast to our results, a GWAS study of the PGPB *Pseudomonas simiae* WCS417r and *A. thaliana* interaction, all *Arabidopsis* accessions virtually responded to the inoculation for three parameters: shoot fresh weight, number of lateral roots, and main root length. Although the plants showed a large variation, all accessions responded positively for shoot fresh weight and NLR. On the other hand, MRL from all accessions, except Col-0, ranged from a significant decrease to a significant increase in length (WINTERMANS, 2016).

In order to evaluate the individual ecotypes response through different traits, we built a heatmap with all ecotypes' phenotype values and their response categories (Fig. 3 e). Most of the

ecotypes analyzed showed different responsiveness among the traits. To evaluate the correlation between the traits, we checked the correlation coefficient between all pairs of traits. All of them have a positive correlation in both data sets (AE and RE). The strongest correlation was between TRL and LRL, with a correlation coefficient of 0.83 (AE) and 0.88 (RE). The lowest correlation coefficient was found between MRL and LRL, 0.13 (AE) and 0.27 (RE). We also analyzed the link between phenotypes  $\Delta$  values to assess the phenotypes correlation. Although all the pairs showed a positive correlation, the link between the  $\Delta$  ecotypes values (Sup. Fig. 7) suggested that MRL and LRL, the lowest correlation coefficient, the traits were inversely correlated. Therefore, our data suggested that the lateral root length is the main trait that mostly contributed to the total root length.

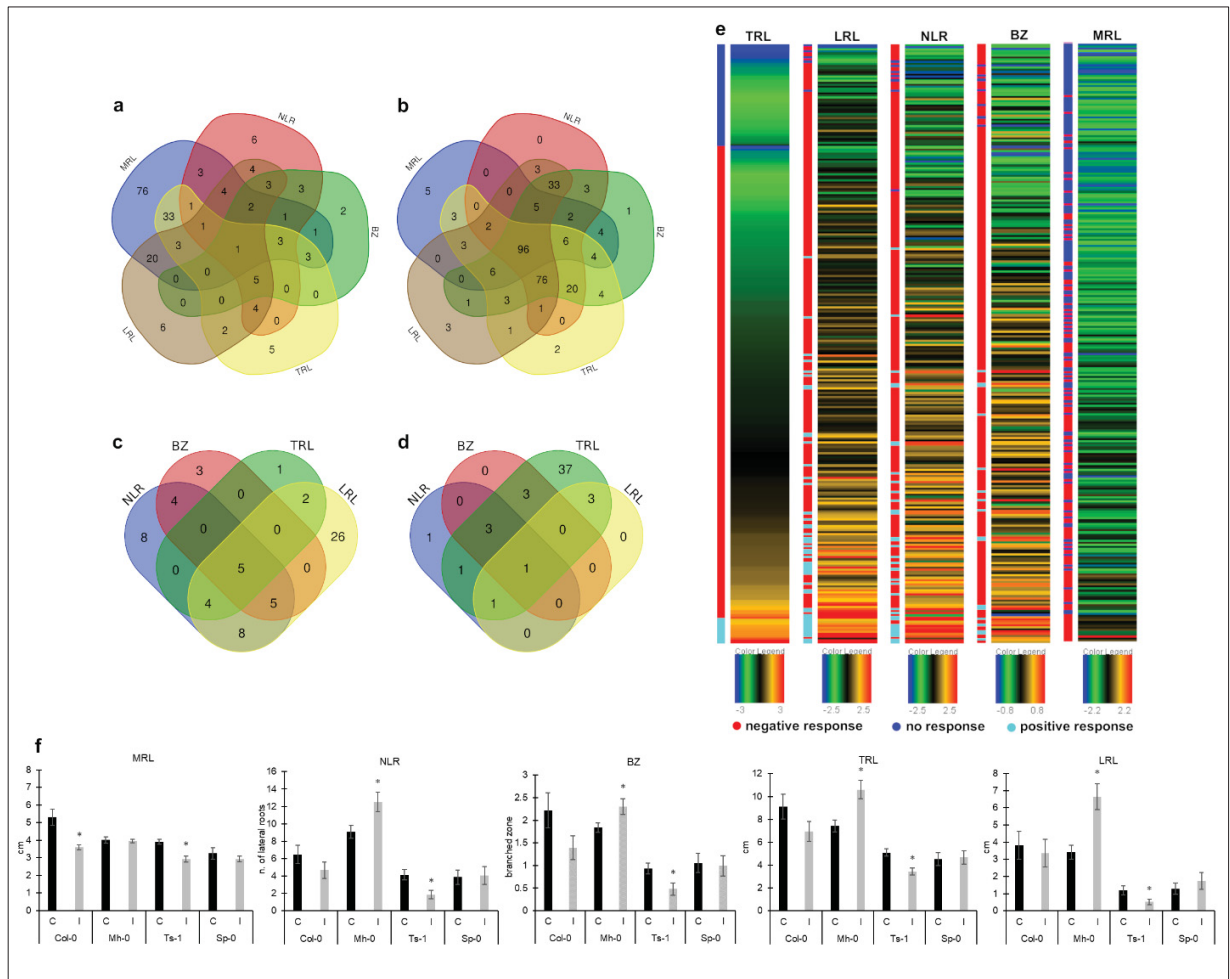


Figure 3 - Phenotype screening from 288 *A. thaliana* ecotypes inoculated with TUAT-1. (a) Venn diagram of significant ecotypes response. (b) Venn diagram of no significant ecotypes response. (c) Venn diagram of positive ecotypes response. (d) Venn diagram of negative ecotypes response. (e) Heatmap of the ecotypes  $\Delta$  phenotype. The heatmap was built sorting from the lowest  $\Delta$  phenotype to the highest and then separated by the plant response category for TRL trait. In the following traits, the ecotypes are in the same order as the TRL trait. (f) Growth promotion analysis of the plant response types. Mh-0, Sp-0 and Ts-1 are, respectively, positive, non and negative responsive ecotypes for the traits that showed significant difference between control and inoculated plants. Col-0 is the reference ecotype.

### 3.4.2 Significant SNPs identified by GWAS

Since we found a large number of non-responsive ecotypes with similar phenotype  $\Delta$  values with the responsive ecotypes, a second data set was created, which excluded the 96 non-responsive ecotypes from the total panel of 288. The new data set (RE data set) was composed by ecotypes that showed a significant response for at least one root trait, while the original data set (AE data set) was composed by all 288 ecotypes. The RE data set was created because the non-responsive

ecotypes showed similar  $\Delta$  phenotype values to the responsive ecotypes, however, due to the variation within the ecotypes, this value was not significant. Hence, these values could not represent the real plant response.

The GWAS accelerated mixed model method from GWA-Portal web interface (SEREN, 2018) was used to analyze the genetic basis of the root architecture of *A. thaliana* in response to TUAT-1 inoculation. The 250K SNP Dataset from GWA-Portal covered 97% and 95% of AE and RE data sets ecotypes, respectively. Since the phenotype data did not show a normal distribution, we transformed the raw data using LOG transformation. We also performed a GWAS analysis with the raw data transformed by SQRT transformation, where a lower number of significant SNPs was found. However, the significant SNPs found in the GWAS analysis with SQRT transformation were already identified by the analysis with LOG transformation, so the results of the SQRT analysis were used to support the selection of some of the candidate genes selected.

The data sets used to perform GWAS produced a list with 160 and 135 SNPs with significant p-values ( $<10^{-7}$ ) for AE and RE data sets, respectively (Fig. 4). Several SNPs were found to be associated with more than one trait. TRL and LRL were traits that shared more SNPs, 19 and 49, for AE and RE data sets, respectively (Fig. 4 d and e). Even with a difference of 96 ecotypes, the data sets shared 72 SNPs.

SNP location and allele effect were analyzed for all significant SNPs, from both data sets, to evaluate the SNPs impact (Fig. 4 f). SNPs found in this study were mostly separated in the following categories: intergenic (27.8%), non-synonymous coding (20.63%), intron (17%), synonymous coding (13.9%), stop gained (5.4%) and UTR prime (5.4%). LD was analyzed for intergenic significant SNPs, where 40 and 41 SNPs were found to be associated with the significant SNPs in AE and RE data sets, respectively. Among these new SNPs, 23 and 27 SNPs were already found to be significant in the GWAS analysis in AE and RE data sets, respectively. Between all SNPs in LD with the significant SNPs, from both analysis, 40% were intergenic, 23,3% intron, 13,3% non-synonymous coding, 10% synonymous coding and 10% UTR prime.



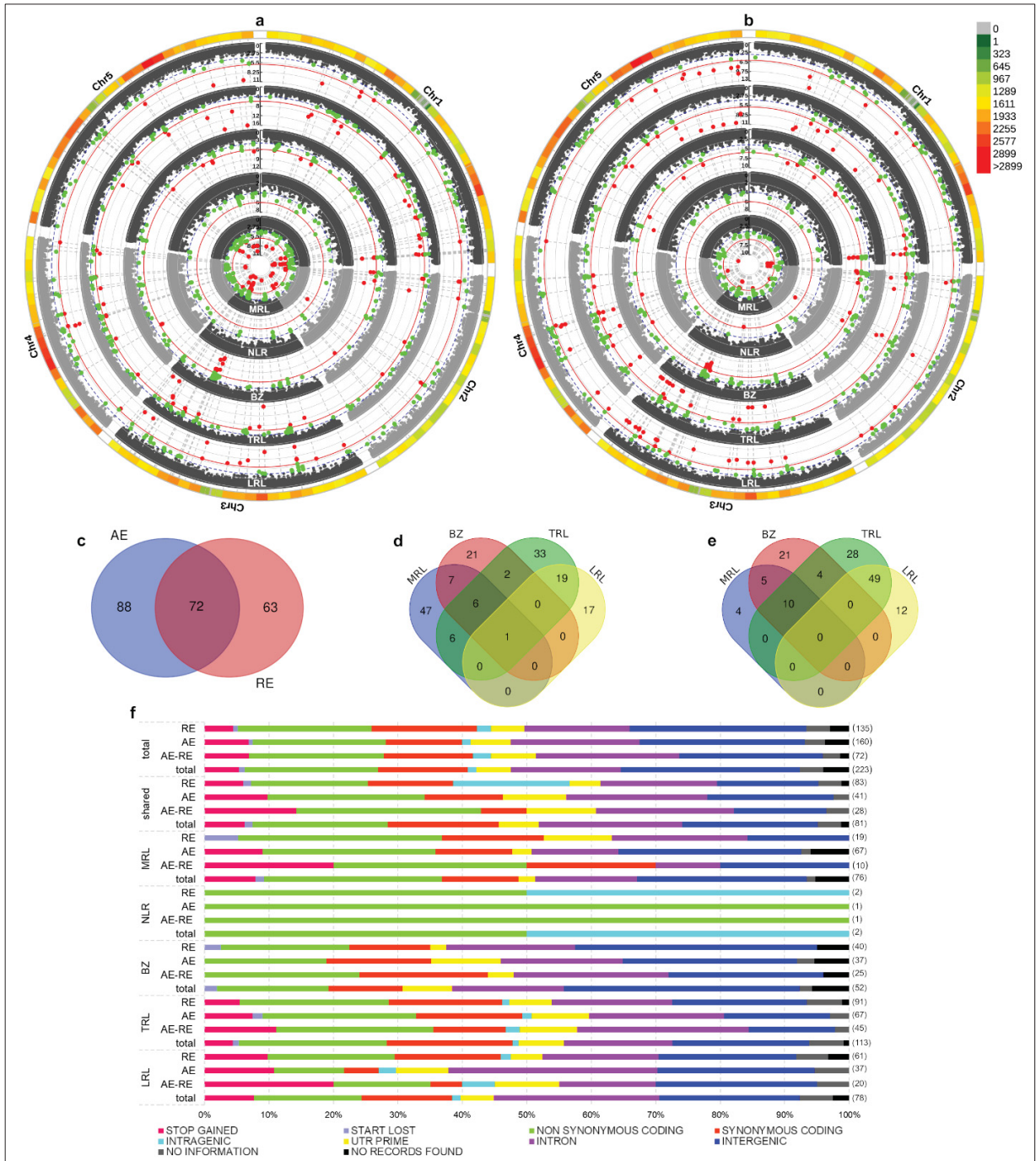


Figure 4 - Significant SNPs identified by GWAS. (a) Circular Manhattan plot from GWAS analysis for AE data set. (b) Circular Manhattan plot from GWAS analysis for RE data set. Colorful circle around Manhattan plots shows SNPs density across the chromosomes. (c) Venn diagram of significant SNPs found in both data sets. (d) Venn diagrams of significant SNPs associated with MRL, BZ, TRL and LRL traits for AE data set. (e) Venn diagrams of significant SNPs associated with MRL, BZ, TRL and LRL traits for AE data set. NLR trait was excluded from Venn diagrams because this trait did not share SNPs with other traits. (f) SNP impact analysis. SNPs were classified as stop gained, start lost, no synonymous coding, synonymous coding, UTR prime, intron and intergenic. SNPs classified as intragenic was inside gene region, however there is no information about the allele effect. SNPs categorized as “no information”

presented allele frequency, but no information about the allele effect and “not records found” SNPs had no information in the database used. The proportion of each SNP impact category was analyzed in 4 different data groups: AE data set (AE), RE data set (RE), SNPs shared by the two data sets analysis (AE-RE) and the total number of SNPs from both data sets (total). Number between parenthesis besides each bar means the number of SNPs found in that data group.

### 3.4.3 Genetic traits identification

Genes around the significant SNPs classified as non-synonymous coding, intron, synonymous coding, stop gained and, UTR prime produced a list of 128 genes. Significant intragenic SNPs led to a list of 39 genes, from which, 24 were already identified in the GWAS analysis around significant SNPs (Fig. 5 a). AE datasets analysis provided a list with 94 genes from GWAS and LD analysis, while RE data set analysis produced a list of 79 genes. The data sets shared 47 genes (Fig. 5 b) and, in total, the final gene list was composed by 143 genes.

Among all identified genes, 37.1% were associated with more than one trait. TRL and LRL were the traits that shared more genes, 34. These results were consistent with the phenotype correlation between the traits, where TRL and LRL were the traits with the strongest positive correlation. Even though, many genes are associated with more than one trait, most of the genes were associated with only one trait (62.9%). Therefore, in this study, most of the genetic traits are associated with particular traits to contribute for the whole root architecture in general.

Although, some genes were associated with more than one root trait, MOD1 was the only gene with a significant SNP associated with 4 different traits. MOD1 gene encodes an enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase, which is a subunit of the fatty acid synthase complex that catalyzes the de novo synthesis of fatty acids. Mutants in this gene have decrease in its enzymatic activity, an impair fatty acid biosynthesis and a decreased amount of total lipids, which leads the effects on plant growth and development and causes premature death (MOU, 2000). The association of *Bacillus* with lipids biosynthesis was already reported, where *B. subtilis* GB03 can increase the lipid synthesis and alleviate the lipid peroxidation and oxidative stress under salt conditions (HAN, 2014).

In order to have a general view of which processes of the identified genes were involved in, we evaluated the GO terms for biological processes (Fig. 5 d). Most of the identified genes were classified as “other” or unknow cellular processes, “other” metabolic or cellular processes and

biosynthetic processes. Among the identified biological processes, for MRL, the higher percentage of genes belonged to stress response (9.8%) and cellular protein modifications processes (9.8%). For NLR, we identified only 2 genes, the first one was involved in transport and the second with response to chemical. For the traits BZ, TRL and MRL, genes were mostly classified as cellular protein modification processes (14.8%), response to stress (16.7%) and, multicellular organism development (19.6%). Genes associated with more than one trait were mostly involved in multicellular organism development (20.7%), while for the total number of identified genes in all traits, genes were mostly categorized in stress response term (12.6%). This analysis showed that biological processes were specific to particular traits instead processes affecting all traits.

GO terms were also analyzed for the total number of genes through ClueGo plug-in (BINDEA, 2009). Genes were analyzed for biological processes, molecular function and cellular components and grouped according to leading terms in a network. The biggest network was composed by 26 genes and 4 leading terms: positive regulation of response to stimulus, cell development, cellular response to extracellular stimulus and response to extracellular stimulus. Smaller networks were also provided by this analysis and the leading terms were: guanyl nucleotide binding, trans-Golgi, phosphatidylinositol binding, guanyl-nucleotide exchange factor activity and nuclease activity (Fig. 5 e).

To investigate whether the genes identified in this study had any connection, we constructed gene interaction networks (Sup. Fig. 8 a). The types of interactions to create these networks were: known interactions, from curated databases or that were experimentally determined, predicted interactions, of genes neighborhood, gene fusions or co-occurrence, genes that were mentioned in the same paper, co-expressed genes and protein homology. The networks were built with all identified genes, from AE and RE data sets. From a total of 143 identified genes, 37 were connected in some way in the networks and 20 genes were co-expressed, forming one group composed by 10 genes, and 5 pairs of co-expressed genes.

Group 1 was composed of AT3G28500, AT2G18110, AT1G77940, AT1G77750, EIF3E, MTSSB, AT3G11964, AT3G16840, AT1G77800 and PSD. This group seemed to be related to protein metabolism in general and involved in important plant traits as cell proliferation and elongation, female gametophytes and plant development, shoot meristem apical activity and leaf initiation (Sup. Fig. 8 a and Sup. Table 3). Among the 5 pairs of co-expressed genes, 3 of them

showed interesting activities as response to phosphate deficiency (pair 3), immune response (pair 4) and transport (pair 5).

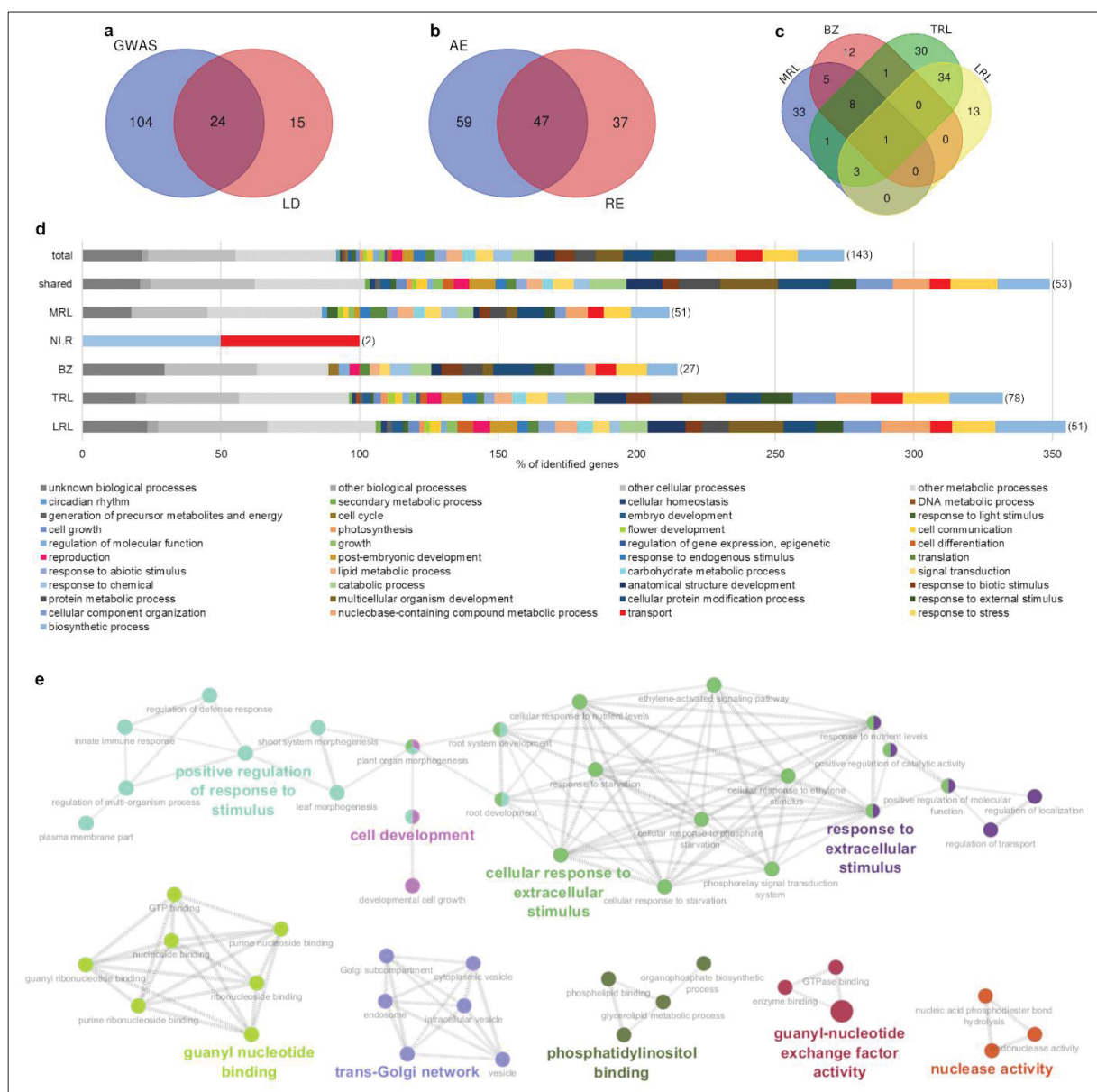


Figure 5 - Genetic traits identified by GWAS. (a) Venn diagram of identified genes from GWAS and LD analysis in both data sets. (b) Venn diagrams of identified genes in AE and RE data set GWAS and LD analysis. (c) Venn diagrams of identified genes associated with MRL, BZ, TRL and LRL traits for identified genes in both analyses. NLR trait was excluded from Venn diagrams because this trait did not share genes with other traits. (d) GO terms for biological processes for each trait, total number of identified genes in all the traits (total) and genes associated with more than one trait (shared). Number between parenthesis represent the number of genes in that data group. The sum of the percentage is higher than 100% because the genes can belong to more than one biological process at the same time. (f) GO network built with all identified genes for biological processes, molecular function and cellular component. Colorful names are the group leading terms.

### 3.4.4 Candidate genes selection

Among the 143 identified genes, 11 were selected as candidate genes for plant-bacteria interaction and growth promotion (Sup. Fig 9). The first criterium to choose candidate genes was select genes identified in both data sets, AE and RE, then we looked for genes with significant SNPs in both data transformation analyses, LOG and SQRT. After that, we selected genes with allele alterations that would cause a non-synonymous coding or a stop codon. We also looked for genes with significant SNPs in linkage disequilibrium with SNP 29235922 in chromosome 1, since this SNP was in a region with high concentration of significant SNPs. Finally, we choose a hub gene from the interaction networks due to its number of interactions (Table 2).

Candidate genes were around significant SNPs in all traits except for NLR and were distributed in all 5 Arabidopsis chromosomes. The 6 from the 11 candidate genes (SYP23, ERF9, PRE2, KOM and ATG14A) presented SNPs in which the allele alteration would cause a non-synonymous coding, leading to a missense mutation. PRE-2 presented 2 significant SNPs in which the allele alteration would lead to a missense mutation. TIN1, AT3G58340, and SKIP4 genes were around SNPs in which the allele alteration would insert a stop codon, causing a nonsense mutation.

PRE-2, KOM, ATG14A and DJC65 genes were around SNPs in linkage disequilibrium with SNP 29235922 and were already identified as significant SNPs in the GWAS analysis. This SNP is in a three prime untranslated region inside the candidate gene NR1. The DJC65 gene was around a SNP in which the allele alteration would cause a synonymous coding, and hence, a silent mutation, however this gene was selected as a candidate gene because it attended to several of the selection criteria. The TIM gene was also around a SNP in which the allele alteration would lead to a silent mutation and it was selected because it is a hub gene in the genes interaction networks and is connected to several genes.

After selecting the candidate genes, to investigate whether the allele alteration in these genes' SNPs would influence on the  $\Delta$  phenotype value, we checked the allele effect of the candidate genes' SNPs using the SNP Viewer tool from GWA-Portal (Seren, 2018). The allele effect was evaluated in both data sets, AE and RE. Only in RE dataset the allele alteration seemed to have an effect in the phenotype (Supp. Fig. 10 and 11).



To verify if the candidate genes were co-regulated with other genes, we analyze the co-expression of these genes with genes from other expression data sets using the ATTED-II. We analyzed the 3 genes that were most expressed with each candidate gene. All candidate genes presented co-expression with other genes, except for AT3G58340 (Sup. Table 4). The allele effect analysis showed that allele alteration in AT3G58340 SNP 21590066 at chromosome 3, had effect in TRL and LRL traits. This gene belongs to a TRAF-like family protein, tumor necrosis factor receptor-associated factor. TRAF proteins are molecular adaptors that regulate innate and adaptive immunity, development, and abiotic stress responses (HUANG, 2016).

The allele effect analysis showed that that allele alteration in SYP23 SNP 9865729 at chromosome 4 influenced in LRL trait (Sup. Fig. 11). SYP23 belongs to a subfamily of Q-SNAREs protein (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) that are responsible for protein trafficking between pre-vacuolar compartments and vacuoles. The SNARE motif is required for interactions between SNARE proteins, and transmembrane domain anchor SNARE proteins at vesicular membrane or target organellar membranes (JAHN and SCHELLER, 2006). SYP23 function redundantly with SYP21 and SYP22 in vacuolar protein transport, vein patterning, myosin cell differentiation and plant growth (SHIRAKAWA, 2010). SYP23 is co-expressed with CKA1, WAV2 and VAMP724. CKA1 is a kinase involved in circadian rhythm and ribosome biogenesis in eukaryotes according to the KEGG pathways. This gene is an  $\alpha$  subunit of CK2 that regulates the circadian-clock associated 1 (CCA1) gene (SUGANO, 1998). WAV2 negatively regulates stimulus-induced root bending through inhibition of root tip rotation (MOCHIZUKI, 2005). VAMP724 forms SNARE complexes with SYP123 and SYP132 for root hair elongation (ICHIKAWA, 2014).

The allele alteration in ERF9 gene SNP 17807267 at chromosome 5 affected TRL and LRL traits (Sup. Fig. 11). ERF9 is an ethylene response factor (ERF). ERF transcription factors are integrators of hormonal pathways and are directly responsible for the transcriptional regulation of several jasmonate (JA)/ethylene (ET)-responsive defense genes. ERFs represent the last layer of regulation that can switch the expression of JA/ET-responsive defensive genes on or off (HUANG, 2016) and ERF9 gene acts as negative regulator of plant defense mechanisms (MARUYAMA, 2013). ERF9 is co-expressed with DUF241 (protein of unknown function), ARGOS and HIP26 genes. ARGOS expression is highly induced by auxin and is involved in the regulation of cell

proliferation during organ development, hence this gene plays an important role in plant growth and development (HU, 2003). HIPP26 encodes for a heavy metal binding protein, that can bind  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$ . The overexpression of HIPP26 in *A. thaliana* enhances toleration to  $\text{Cd}^{33}$ , indicating that HIPP26 can have role in Cd detoxification in plants (TEHSEEN, 2010).

The allele alteration in TIM gene SNP 9072376 at chromosome 2 has effects on LRL trait (Sup. Fig. 11). TIM encodes for a plastid isoform of triose phosphatase isomerase and plays a critical role in the transition from heterotrophic to autotrophic grow. Mutants in this gene show accumulation of dihydroxyacetone phosphate and methylglyoxal that delays the transition from heterotrophic to autotrophic growth, probably due to methylglyoxal accumulation. TIM is co-expressed with VTE3, PGK1 and RLP4. VTE3 encodes proteins involved in the methylation step of plastoquinone biosynthesis. These proteins are also involved in vitamin E biosynthesis (CHENG, 2003). PGK1 is a phosphoglycerate kinase localized exclusively in the chloroplasts of photosynthetic tissues. This protein is co-regulated with other phosphoglycerate kinases to optimize plant growth (ROSA-TÉLLEZ, 2018). RLP4 is a cell surface receptor involved in plant development (WANG, 2008).

Allele effect analysis showed that there was an allele alteration in TIN1 SNP 25786075 at chromosome 5 that has an effect on TRL and LRL traits (Sup. Fig. 11). TIN1 is a tunicamycin induced 1, a plant specific endoplasmic reticulum stress inducible gene. Mutation in this gene affects the secretion of proteins and lipids, culminating in visible altered pollen surface (IWATA, 2012). TIN1 is co-expressed with TMS1, BF1C and DNAJ. TMS1 is the thermosensitive male sterile 1 and is required for thermotolerance in pollen tubes and is responsive to heat shock treatment in seedlings (MA, 2015). BF1C is a key regulator of thermotolerance and its protein accumulates rapidly and is localized in the nuclei during heat stress (SUZUKI, 2008). DNAJ proteins, a heat shock protein family, are molecular chaperones and can respond to various environmental stresses.

The allele alteration in SKIP4 gene SNP 22704328 at chromosome 3 affects TRL and LRL traits (Sup. Fig. 11). SKIP4 encodes a SKIP1 interacting partner. SKIP1 is a splicing factor involved in the regulation of circadian clock (WANG, 2012). SKIP4 is co-expressed with AT5G44080, NF-YB13 and AT5G37930. AT5G44080 is involved in the plant hormonal signal transduction according to the KEGG pathways. This gene belongs to a basic-leucine zipper (bZIP)

transcriptional family protein that regulates diverse biological processes such as pathogen defense, light and stress signaling, seed maturation and flower development (JAKOBY, 2002). In addition, NF-YB13 is a transcriptional factor, and its subunits are involved in photoperiod-regulated flowering (SIEFERS, 2009). AT5G37930 also belongs to TRAF-like family protein, as the candidate gene AT3G58340.

NR1 encodes the cytosolic minor isoform of nitrate reductase (NR). In the involvement of the first step of nitrate assimilation, it contributes about 15% of the nitrate reductase activity in shoots. NR1 is co-expressed with NR2, NIR1 and AT5G26200. According to the KEGG pathways, NR2 and NIR1 are involved in nitrogen metabolism. NR2 also encodes a nitrate reductase involved in nitrate assimilation, while NIR1 encodes a nitrite reductase involved in the second step of nitrate assimilation. The gene AT5G26200 belongs to a mitochondrial substrate carrier family.

PRE-2 belongs to the paclobutrazol-resistance gene family and its genes coordinate growth of floral organs contributing to successful autogamous reproduction in *A. thaliana* (SHIN, 2019), PREs genes also may have a regulatory role in gibberellin-dependent development in *A. thaliana* (LEE, 2006). PRE-2 is co-expressed with PHYE, TAF1 and SUS1. PHYE encodes for a phytochrome E that acts in the regulation of shade avoidance syndrome (DEVLIN, 1998). TAF1 is a transcription initiation factor that works in plant resistance to genotoxic stress and DNA damage response (WATERWORTH, 2015). SUS1 encodes for a sucrose synthase.

KOM is a RHOMBOID-like protein located in the envelope of chloroplasts and chlorophyll-free plastids. The mutant plants in this gene presented a reduction of fertility and an aberrant floral morphology (THOMPSON, 2012). KOM is co-expressed with AT2G25565, AT5G08090 and AT3G57440. AT2G25565 is a C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub>-type RING finger protein and have been very well studied in *Arabidopsis*. They are involved in photomorphogenesis, light signaling, secretory pathway, peroxisome biogenesis, N-end rule pathway, chromatin modifications and stress tolerance (MA, 2009). Whereas, AT5G08090 and AT3G57440 are described as transmembrane and hypothetical proteins, respectively.

ATG14 is an autophagy-related protein that works on the induction of autophagy and autophagosomes formation. ATG14 is co-expressed with G18F, RGLG2, and S6K2. G18F is the *A. thaliana* homolog of yeast ATG18 and this protein is required for autophagosome formation in



Arabidopsis (XIONG, 2005). RGLG2 is a RING domain ubiquitin E3 ligase that negatively regulates the drought stress response through the ethylene response factor 53 (ERF53) (CHENG, 2012). And S6K2 is a S6 kinase, which is a conserved component of signaling pathways that controls growth in eukaryotes. S6K negatively regulates cell division and can influence the rate of polyploidization and lead to chromosome instability (HENRIQUES, 2010).

DJC65 is designated as a J domain-containing cochaperone that recruits heat shock Hsp70 chaperones. DJC65 is down-regulated by cold stress (CHIU, 2013). DJC65 is co-expressed with STN7, SRX and HAD. STN7 is a thylakoid protein kinase involved in control energy allocation in the photosystems in response to light quality. STN7 is required for phosphorylation and migration of light harvesting complex II proteins and long-term alterations in thylakoid composition (PESARESI, 2009). SRX encodes a sulfiredoxine that participate in the signaling mechanism in plant response to photooxidative stress (REY, 2007). HAD belongs to the haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein. This protein family has a diverse substrate specificity and is involved in the enzymatic cleavage by nucleophilic substitution of carbon–halogen bonds and hydrolytic enzyme activities, including phosphatase, phosphonate and phosphoglucomutase reactions (KOONIN and TATUSOV, 1994).

Gene Identifier	Gene Name	Chr.	Position	Dat.	Transf.	p-value			Genetic Variation Explained			Effect	Function	N. of Ecotypes/allele		Gene Function			
						MRL	BZ	TRL	LRL	MRL	BZ			TRL	LRL		reference	alternative	
AT4G17730	SYP23	4	9865729	AE	LOG	7.57E-08	4.15E-10	9.96%	13.21%	281/T	7/C								
				RE	LOG	6.10E-07	1.41E-09	12.88%	18.38%	186/T	6/C								
				AE	SQRT	1.53E-07		9.52%		non-synonymous coding	missense	281/T	7/C						transport
				RE	SQRT	1.72E-07		14.05%				186/T	6/C						
AT5G44210	ERF9	5	17807267	RE	LOG	3.91E-11	4.74E-09	21.48%	17.30%	non-synonymous coding	missense	191/C	1/G			ethylene response factor			
				RE	LOG	2.35E-10	9.71E-13	19.94%	24.57%	synonymous coding	silent	190/A	2/C					plastid isoform of triose phosphatase isomerase	
AT2G21170	TIM	2	9072376	RE	SQRT	1.32E-07		14.29%											
				AE	LOG	1.44E-16	4.74E-11	21.94%	14.54%	stop gained	nonsense	287/C	1/T					plant specific endoplasmic reticulum stress inducible gene	
AT5G64510	TIN1	5	25786075	RE	LOG	3.91E-11	4.74E-09	21.48%	17.30%										
				AE	LOG	1.44E-16	4.74E-11	21.94%	14.54%	stop gained	nonsense	287/C	1/A					abiotic stress response	
AT3G58340		3	21590066	RE	LOG	3.91E-11	4.74E-09	21.48%	17.30%										
				AE	LOG	1.44E-16	4.74E-11	21.94%	14.54%	stop gained	nonsense	287/G	1/A					involved in the regulation of circadian clock	
AT3G61350	SKIP4	3	22704328	RE	LOG	3.91E-11	4.74E-09	21.48%	17.30%										
				AE	LOG	4.47E-11		14.57%				23/G	265/A						
AT1G77760	NR1	1	29235922	RE	LOG	2.16E-07		13.84%											
				AE	SQRT	9.01E-08		9.85%				utr 3 prime							nitrate assimilation
AT1G77800	PRE-2	1	29254754	LOG	7.40E-09			11.43%											
				LOG	2.24E-07			9.27%				non-synonymous coding	missense	27/C	261/T				stress response through hormone
AT1G77860	KOM	1	29284188	RE	LOG	1.07E-07	6.90E-10	14.49%	19.01%	non-synonymous coding	missense	16/A	176/G						
				AE	LOG	2.65E-08	4.16E-11	10.62%	14.62%	11.70%									rhomboid-related intramembrane serine protease
AT1G77890	ATG14A	1	29293213	RE	LOG	1.07E-07	6.90E-10	14.49%	19.01%	non-synonymous coding	missense	16/G	176/A						
				AE	SQRT	7.47E-07		8.51%											induction of autophagy and autophagosomes formation
AT1G77930	D1C65	1	29301869	RE	LOG	1.07E-07	6.90E-10	14.49%	19.01%	synonymous coding	silent	16/A	176/G						
				AE	SQRT	7.47E-07		8.51%											heat shock protein binding

Table 2 - Candidate genes around the significant SNPs. For each gene, the p-value and genetic variation explained values of the SNPs are shown. The possible alteration of the allele, the function of this changes and the number of ecotypes with each allele are represented in the table. The last column shows the function of the gene. \*Chromosome \*\*Data set \*\*\*Transformation type of the raw data.

### 3.5 DISCUSSION

The interaction between plant and PGPB is crucial to the plant growth promotion. The plant host plants prefer specificity on microbial communities, which was already reported in a study with 27 maize inbred lines across different fields. This study identified a small, but significant, fraction of variation in microbial diversity that could be attributed to host genetics (PEIFFER, 2013). In our study, we evaluated *A. thaliana* ecotypes response upon TUAT-1 inoculation for 5 root traits: MRL, NLR, BZ, TRL and LRL. The plant response was classified in three categories: positive, negative and no response. In contrast with the *A. thaliana* response to *Pseudomonas simiae* WCS417r, for which all *Arabidopsis* accessions responded to inoculation. In this case, all ecotypes responded positively for shoot fresh weight and number of lateral roots, and main root length. The accessions' response ranged from significant decreases to significant increases (WINTERMANS, 2016). Our data suggests that the plant response to bacteria inoculation is strain-genotype specific.

For TUAT-1, the three response types were verified in all traits, except MRL. For this trait, all the ecotypes with significant differences showed a decreased measure in the inoculated plant, indicating this is a general effect of this strain. The decrease of the MRL was already reported for *A. thaliana* (Col-0) inoculated with *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 (ASARI, 2017). Only one ecotype showed a consistent response for all the traits. Ts-1 responded negatively to all the traits analyzed, while most of the ecotypes presented different response types among the traits (Fig. 3 a and f). The correlation between the phenotypes showed that the strongest correlation was between TRL and LRL, suggesting that LRL contributes more than the other traits to the total root length. The weakest correlation was between MRL and LRL, although the correlation was positive, the link between the traits  $\Delta$  phenotypes suggests a negative correlation (Sup. Fig. 7).

The GWAS analysis of the two data sets produced a list of 94 and 79 genes, for AE and RE data sets, respectively and even with 96 ecotypes less in RE data set, the data sets presented 47 genes in common. The use of the RE data set gave us a better view of the allele effect. For the genes SYP23, TIN1, AT3G58340, and SKIP4, which were found in both data sets, we only could see the allele effect in the graphics produced by RE data set (Sup. Fig. 10 and 11). The use of a data set without the non-responsive ecotypes was important, and the data suggests that their  $\Delta$  phenotype values may not be representing the real plant response when the difference between

control and inoculated plants are not significant. Our results indicate that the responsiveness of the plant is significant to perform GWAS analysis and not just the phenotype values.

In our study, several genes were associated with more than one trait. The traits TRL and LRL were the traits with more associated genes in common (34). Among the 143 identified genes, 37.1% were associated with more than one trait. In other GWAS analysis of PGPB interaction, there was no overlap between the genes traits that were found (KAMFWA, 2015 and WINTERMANS, 2016). However, in a GWAS study on an interaction between a plant pathogen fungus, *Botrytis cinerea* and *Arabidopsis*, 31% of the genes that were found were associated with two lesion traits. Although, some of the genes were associated with more than one trait, most of the root architecture characteristics were genetic separable traits associated with the plant growth. (Corwin, 2018). These results are consistent with the GO terms analysis, where we found biological processes specific to particular traits instead processes affecting all traits.

In our study, we found a potential PGPB interaction gene. ERF9 is an ethylene response factor, which negatively regulates the plant defense mechanisms (Huang, 2016). This finding suggests that the plant defense is decreased in the presence of TUAT-1. Besides that, the pair of co-regulated genes ATMIN7 and GSL05 are also related with immune response.

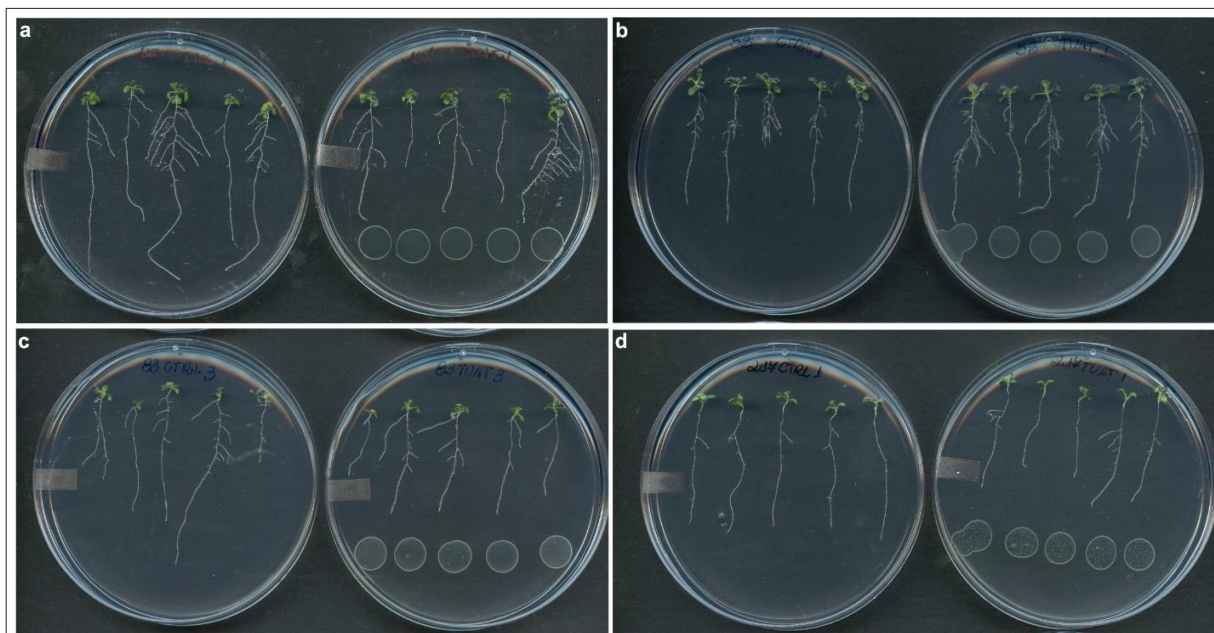
Among the identified genes, there are important genes related to the alleviation of abiotic stress. For instance, the pair of co-regulated genes AL6 and UBP14 which are related to phosphate deficiency. In addition, MOD1 gene can be related to abiotic stress attenuation, since it catalyzes fatty acid syntheses. The increase in lipid syntheses to avoid lipid peroxidation is one of *Bacillus* mechanisms for oxidative stress alleviation (HAN, 2014). Genes that are co-expressed with the candidate genes are also involved in abiotic stress response. HIPP26 gene is involved in Cd detoxification in plants, while SRX participates in the signaling mechanism in response to photooxidative stress (REY, 2007 and TEHSEEN, 2010). Besides that, there are several genes identified in this study, or co-expressed with them, that are involved in thermotolerance, as DJC65, TMS1, DNAJ, and TMS1 (CHIU, 2013; MA, 2015 and SUZUKI, 2008).

We also compared our results with the previous data published about *A. thaliana* response to *Pseudomonas simiae* WCS417r. We create a gene interaction network for genes found in both studies (Sup. Fig. 8). Although the genes identified in TUAT-1 are not the same genes found for

WCS417r and *A. thaliana*, they are, in fact, connected in gene interaction network. 10 of 37 genes identified for WCS417r were connected in some way with genes from TUAT-1 and *A. thaliana* associated genes. 9 of WCS417r are co-expressed with TUAT-1 genes. This comparison suggests that although the plant-bacteria interaction and growth promotion is not specifically regulated by the same genes for the different bacteria, they are involved in the same pathways.

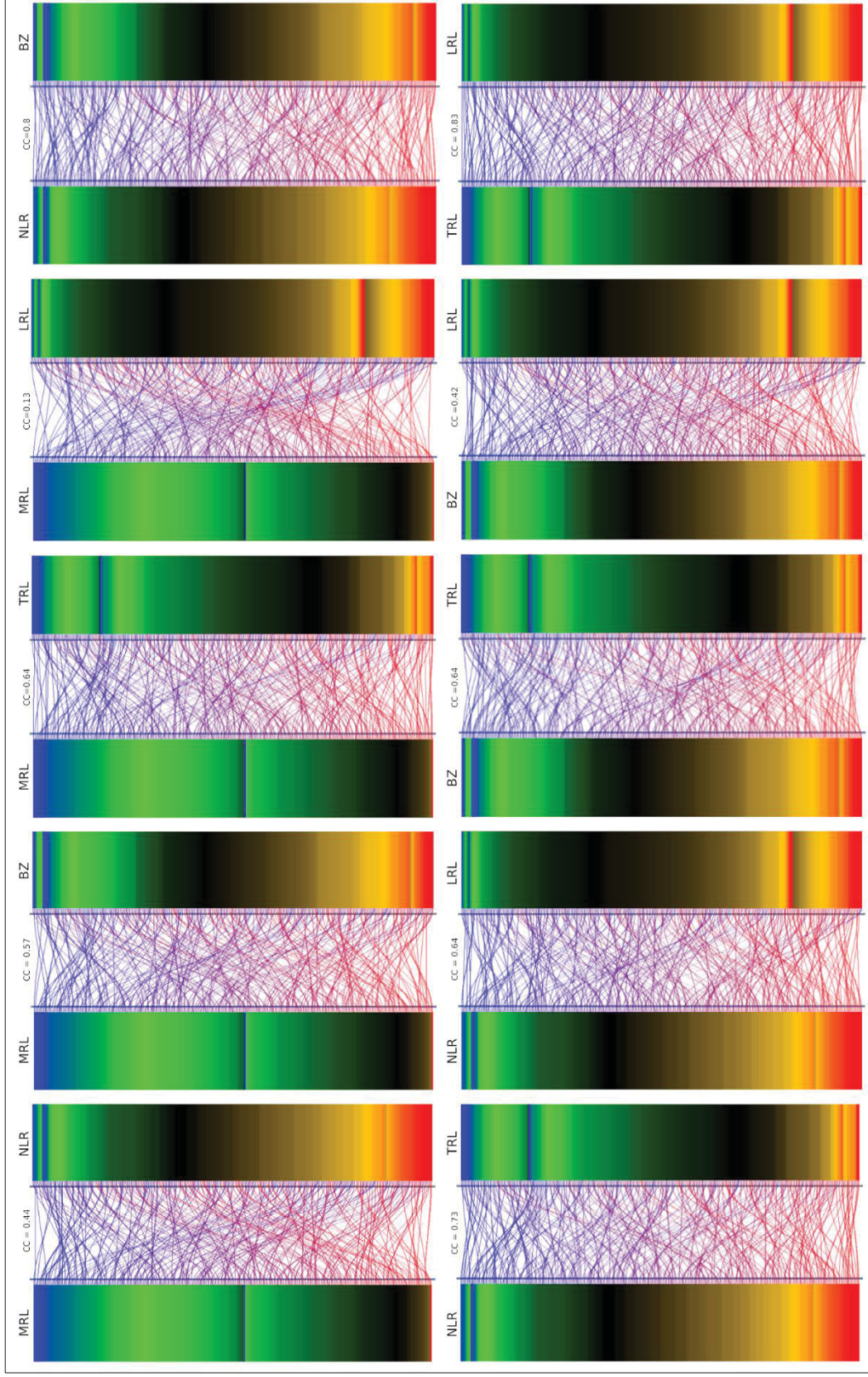
This study showed that the PGPB interaction is strain-genotype specific, since the ecotypes response upon TUAT-1 inoculation is definitely singular. We confirmed the power of GWAS to identify genetic traits underlying PGPB interaction and plant growth promotion. Although, further validation of the candidate genes is necessary, our findings showed important genes related to plant defense and abiotic stress alleviation. Our results corroborate the *Bacillus spp.* growth promotion capability, which is broadly reported.

### 3.6 SUPPLEMENTARY MATERIAL

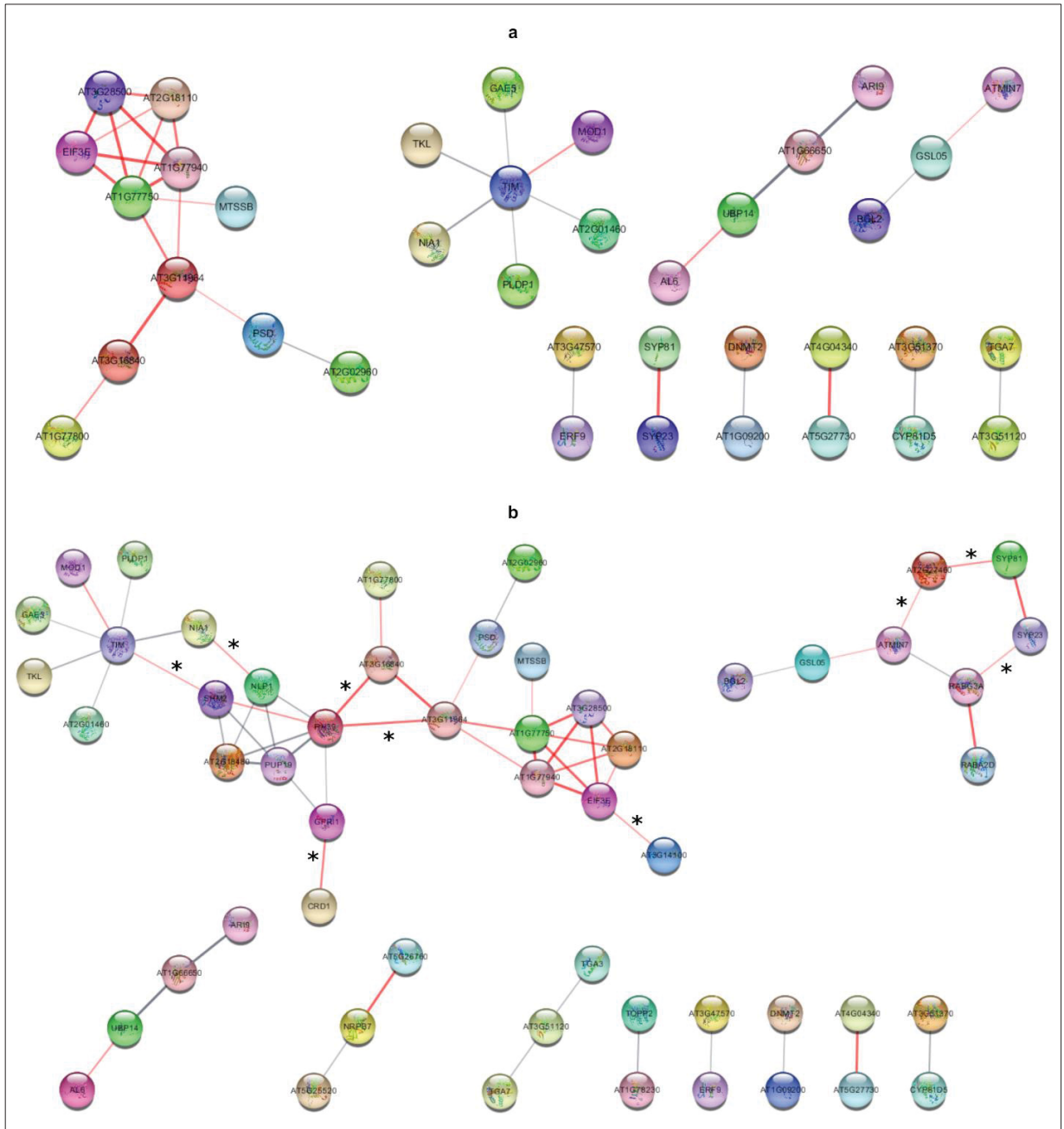


Supplementary Figure 6 - *A. thaliana* response upon TUAT-1 inoculation. (a) is the reference ecotype, Col-0. (b), (c) and (d) are positive (Mh-0), no (Sp-0) and negative (Ts-1) responsive ecotypes respectively.



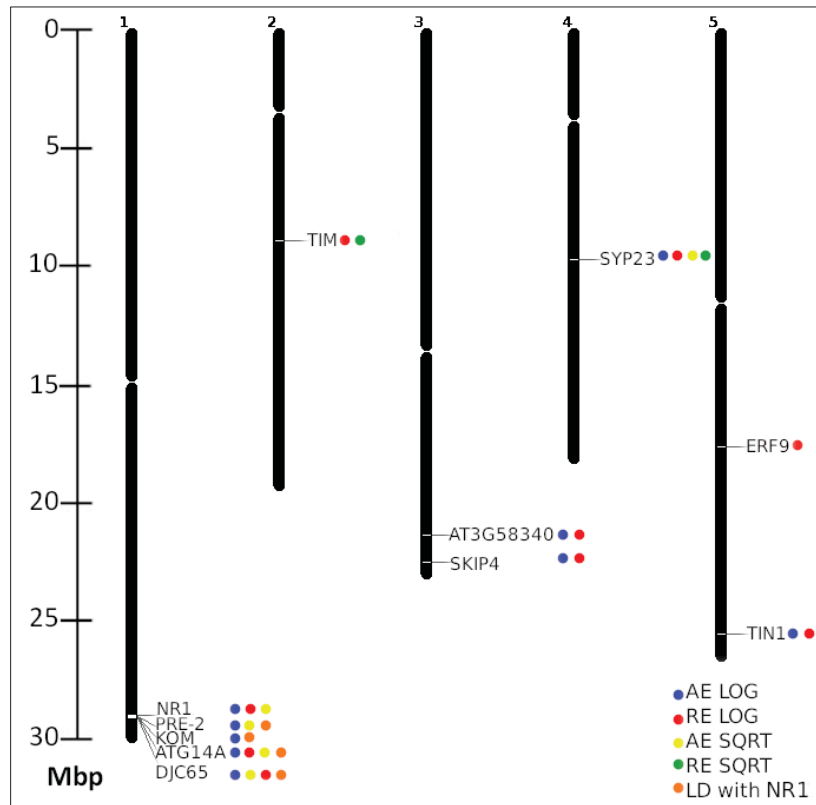


Supplementary Figure 7 - Correlation between traits  $\Delta$  phenotype values for each ecotype. The phenotype correlation coefficient (CC) value is above each pair of traits. The heatmaps were built sorting from the lowest phenotype  $\Delta$  to the highest and then separated by the plant response category for each trait. Lines between the columns connects the same ecotype.

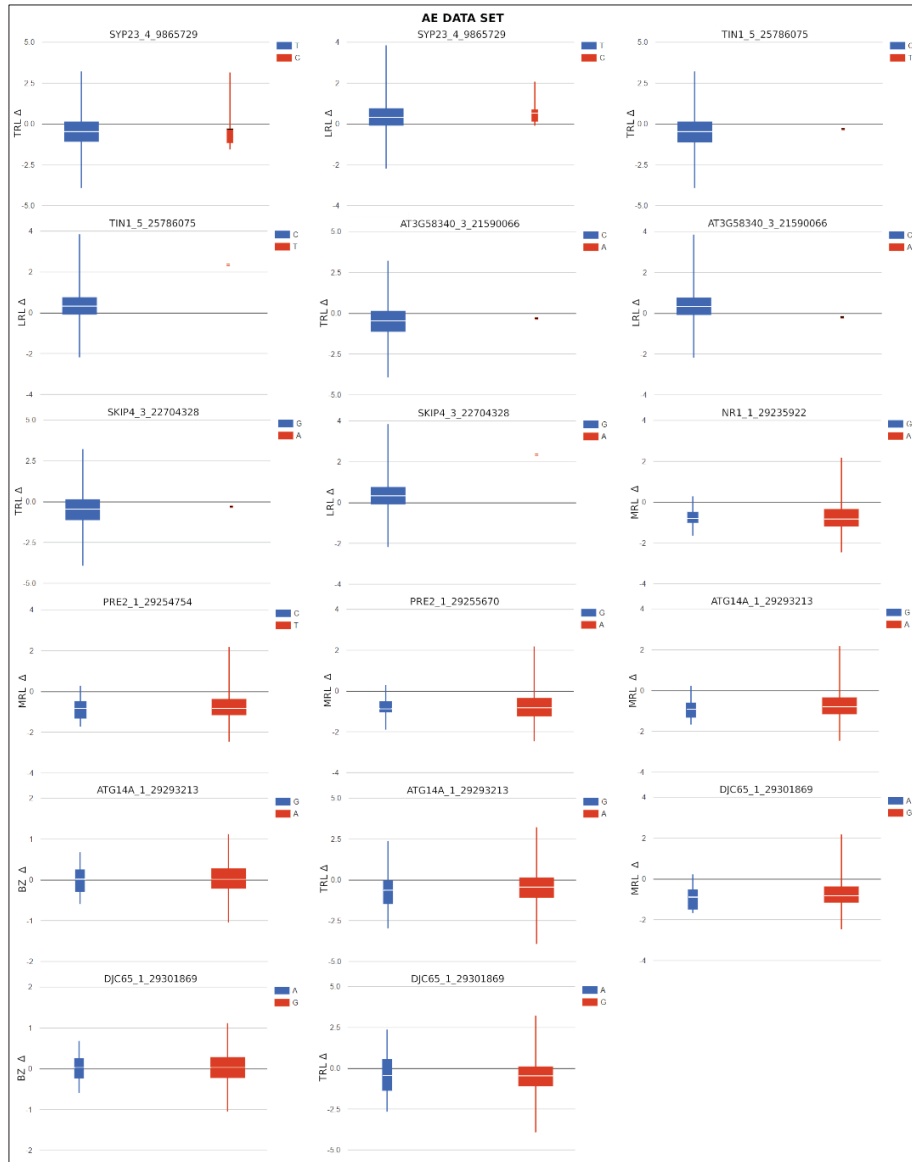


Supplementary Figure 8 - Gene interaction networks. (a) Gene interaction network built from all identified genes (AE and RE data set). (b) Gene interaction network from all genes identified in this work and genes previous reported for *Pseudomonas simiae* WCS417r and *Arabidopsis thaliana* interaction GWAS (WINTERMANS, 2016). The thicker the line connecting the nodes, the strongest is the relation between them. The types of interactions evidence are known interactions from curated databases or experimentally determined; predicted interactions of genes neighborhood, fusions or co-occurrence; or genes mentioned in the same paper, co-expressed genes or protein homology. Red lines connecting genes mean they are co-expressed. \*co-expression between identified genes for TUAT-1 and WCS417r and *Arabidopsis thaliana* interaction.

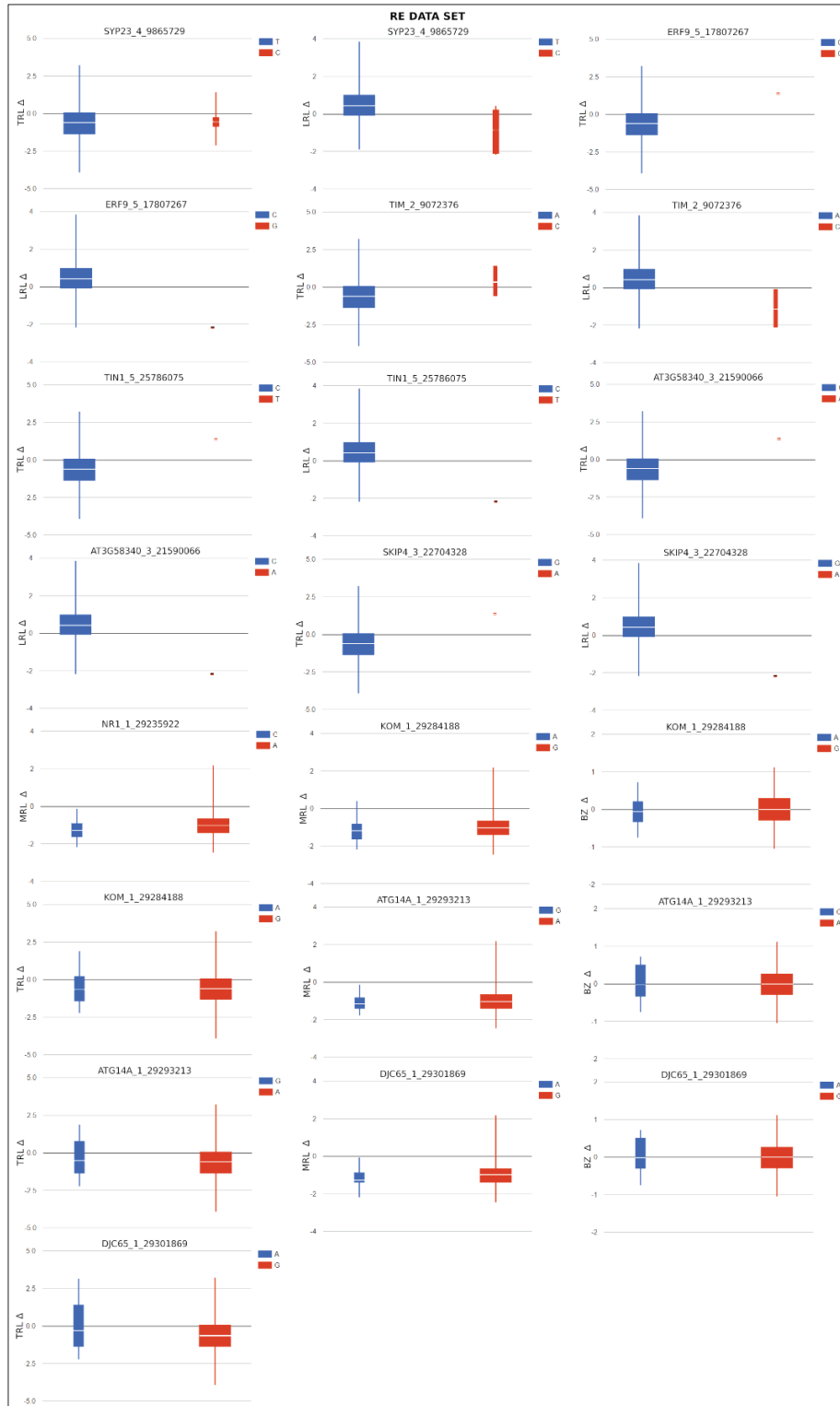




Supplementary Figure 9 - Chromosome map. Localization of the candidate genes in *A. thaliana* chromosomes. The circles next to the genes represent the analysis supporting the candidate gene selection.



Supplementary Figure 10 - Allele effect of the candidate genes from the AE data set GWAS analysis.



Supplementary Figure 11 - Allele effect of the candidate genes from the RE data set GWAS analysis.

Co-expressed groups	Gene Name	Gene Function
1	AT3G28500	60S acidic ribosomal protein, plays an important role in the elongation step of protein synthesis
	AT2G18110	translation elongation factor EF1B/ribosomal protein S6 family protein
	AT1G77940	ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein
	AT1G77750	ribosomal protein S13/S18 family located at the top of the head of the small subunit, it contacts several helices of the 18S rRNA.
	EIF3E	especifically targets and initiates translation of a subset of mRNAs involved in cell proliferation
	MTSSB	Mitochondrially targeted single-stranded DNA binding protein involved in mitochondrial DNA recombination
	AT3G11964	involved in rRNA biogenesis and required for normal development of female gametophytes
	AT3G16840	ATP-dependent helicase activity
	AT1G77800	transcription factor involved in regulation of cell elongation and plant development
2	PSD	tRNA processing and tRNA translocation across the nuclear pore complex involved in shoot apical meristem activity and leaf initiation
	TIM	plastid isoform of triose phosphatase isomerase
3	MOD1	enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase involved de novo synthesis of fatty acids.
	AL6	histone-binding component that specifically recognizes di- or trimethylated histone H3 and acts as upstream regulator of root hair formation during Pi starvation
4	UBP14	ubiquitin-specific protease involved in root responses to phosphate deficiency
	ATMIN7	immunity associated Arabidopsis protein targeted by HopM1, a conserved Pseudomonas syringae virulence protein
5	GSL05	callose formation in response to fungal pathogens and ontributes to PAMP-induced basal defense
	SYP23	involved in intracellular protein transport
6	SYP81	involved in protein transport in the secretory pathway
	AT4G04340	phosphoinositide phosphatase involved in vacuole organization
	AT5G27730	heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase-like protein

Supplementary Table 3 - Co-expressed genes among the identified genes in GWAS analysis.

Candidate Gene	Co-expressed Genes	MR *	Co-expressed genes function	Co-expressed genes KEGG pathways
SYP23	CKA1	1.6	regulates the circadian-clock associated 1.	circadian rhythm and ribosome biogenesis in eukaryotes
	WAV2	3.1	negatively regulates stimulus-induced root bending through inhibition of root tip rotation.	
	VAMP724 DUF241	3.2 5.3	forms SNARE complexes with SYP123 and SYP132 for root hair elongation. protein of unknown function.	
ERF9	ARGOS	9.6	auxin-regulated gene involved in the regulation of cell proliferation during organ development.	
	HIPP26	21.8	heavy metal binding protein.	
TIM	VTE3	8.9	involved in the methylation step of plastoquinone biosynthesis and vitamin E biosynthesis.	
	PGK1	9.4	phosphoglycerate kinase localized exclusively in the chloroplasts of photosynthetic tissues and is co-regulated with other phosphoglycerate kinases to optimize plant growth.	
TIN1	RPL4	11.8	cell surface receptor involved in plant development	
	TM51	1	thermotolerance in pollen tubes and is responsive to heat shock treatment in seedlings	
SKIP4	MBF1C	5.3	key regulator of thermotolerance	plant hormone signal transduction
	DNAJ	6	DNAJ heat shock family protein that respond to various environmental stresses.	
NR1	AT5G44080	4.3	basic-leucine zipper transcriptional family protein, which regulates pathogen defense, light and stress signaling, seed maturation and flower development.	nitrogen metabolism nitrogen metabolism
	NF-YB13	5.6	transcriptional factor involved in photoperiod-regulated flowering.	
PRE2	AT5G37930	12.9	TRAF-like family protein involved in abiotic stress response.	
	NR2	1	encodes nitrate reductase structural gene involved in nitrate assimilation.	
DIC65	NIR1	3.2	involved in the second step of nitrate assimilation and induced by nitrate.	
	PHVE	2.9	phytochrome E involved in regulation of shade avoidance syndrome.	
KOM	TAF1	3.9	transcription initiation factor involved in plant resistance to genotoxic stress and DNA damage response.	
	SUS1	4.9	sucrose synthase.	
ATG14A	AT2G25565	4.5	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -type RING finger protein involved in photomorphogenesis, light signaling, secretory pathway, peroxisome biogenesis, N-end rule pathway, chromatin modifications and stress tolerance.	
	G18F	9.2	Required protein for autophagosome formation.	
ATG14A	AT5G08090	5	transmembrane protein.	
	AT3G57440	6.4	hypothetical protein.	
DIF65	RLG2	11.9	RING domain ligase, which negatively regulates the drought stress response through ERF53.	
	S6K2	11.9	serine/threonine protein kinase 2, which negatively regulates cell division and can influence the rate of polyploidization and lead to chromosome instability.	
DIF65	STN7	2.5	thylakoid protein kinase involved in control energy allocation in the photosystems in response to light.	
	SRX	3.1	sulfiredoxin involved in the signaling mechanism response to photooxidative stress.	
DIF65	HAD	3.2	haloacid dehalogenase-like hydrolase protein family involved in the enzymatic cleavage by nucleophilic substitution of carbon-halogen bonds and hydrolytic enzyme activities.	

Supplementary Table 4 - Co-expressed genes with the candidate genes by ATTED-II. The 3 most co-expressed genes with the candidate genes, their function and the KEGG pathways they belong to are shown in the table. \*Mutual Rank is the ATTED-II original measure to quantify the strength of genes co-expression based on Pearson correlation coefficient.

## 4 CONCLUSÃO

Este estudo analisou a interação de *Bacillus pumilus* TUAT-1 e *Arabidopsis thaliana*, e a consequente promoção do crescimento vegetal, através do GWAS. A triagem fenotípica, realizada em 288 ecótipos de *A. thaliana* para as características da arquitetura da raiz (MRL, NLR, BZ, TRL e LRL), identificou três diferentes tipos de resposta da planta à inoculação com TUAT-1: resposta positiva, resposta negativa e ausência de resposta. Apenas um ecótipo de *Arabidopsis* mostrou resposta constante ao longo dos 5 parâmetros analisados, enquanto a maioria dos ecótipos apresentou diferentes respostas para cada característica analisada. Os parâmetros com maior correlação foram TRL e LRL, o que sugere que o comprimento de raiz lateral é o maior contribuinte para o comprimento total da raiz. Os dados sugerem que a interação entre planta e bactéria é extremamente específica e que a genética da planta hospedeira tem grande influência no sucesso da interação. Os resultados deste trabalho também indicam que o tipo de respostas da planta é essencial para a análise do GWAS e não somente os valores fenotípicos.

Alguns dos genes identificados através do GWAS estão associados a mais de um parâmetro da arquitetura da raiz. Os parâmetros que apresentaram mais genes em comum foram TRL e LRL, resultados que é compatível com os dados de fenótipo, onde estes também foram os parâmetros com maior correlação. Entretanto, a maioria dos genes está associada exclusivamente a uma característica. Apesar de alguns genes governarem mais de um parâmetro, a maioria dos genes é associada a apenas uma das características da raiz. Estes resultados sugerem que os parâmetros da raiz contribuem individualmente para a promoção do crescimento.

Os genes identificados neste trabalho demonstram que o GWAS é uma excelente ferramenta para o estudo da interação das PGPB. Estes genes estão relacionados, a resposta de defesa, produção ou regulação de hormônios, resposta ao estresse abiótico, produção lipídica, autofagia e outros processos biológicos. As diferentes contribuições e a diversidade funcional dos genes encontrados neste estudo indicam que a promoção do crescimento é uma característica genética quantitativa e multigênica.

## 5 REFERÊNCIAS

ABEER, H.; AL-HUQAIL, A. A.; DILFUZA, E. Impact of plant growth promoting *Bacillus subtilis* on growth and physiological parameters of *Bassia indica* (Indian bassia) grown under salt stress. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 5, p. 1735–1741, 2015.

AHMED, A.; HASNAIN, S. Auxin-producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 313–319, 2010. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/pac.2010.82.issue-1/pac-con-09-02-06/pac-con-09-02-06.xml>>. .

ANSARI, F. A.; AHMAD, I.; PICHTEL, J. Growth stimulation and alleviation of salinity stress to wheat by the biofilm forming *Bacillus pumilus* strain FAB10. **Applied Soil Ecology**, v. 143, n. December 2018, p. 45–54, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.05.023>>. .

ARRIZUBIETA, M.; SIMÓN, O.; TORRES-VILA, L. M.; et al. Insecticidal efficacy and persistence of a co-occluded binary mixture of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HearNPV) variants in protected and field-grown tomato crops on the Iberian Peninsula. **Pest Management Science**, v. 72, n. 4, p. 660–670, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ps.4035>>. .

ASARI, S.; TARKOWSKÁ, D.; ROLČÍK, J.; et al. Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. **Planta**, v. 245, n. 1, p. 15–30, 2017.

ASHRAF, M.; HASNAIN, S.; BERGE, O.; MAHMOOD, T. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. **Biology and Fertility of Soils**, v. 40, n. 3, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00374-004-0766-y>>. .

ATWELL, S.; HUANG, Y. S.; VILHJÁLMSSON, B. J.; et al. Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. **Nature**, v. 465, n. 7298, p. 627–631, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature08800>>. .

BARNAWAL, D.; MAJI, D.; BHARTI, N.; CHANOTIYA, C. S.; KALRA, A. ACC Deaminase-

Containing *Bacillus subtilis* Reduces Stress Ethylene-Induced Damage and Improves Mycorrhizal Colonization and Rhizobial Nodulation in *Trigonella foenum-graecum* Under Drought Stress. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 4, p. 809–822, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00344-013-9347-3>>. .

BINDEA, G.; MLECNIK, B.; HACKL, H.; et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. **Bioinformatics**, v. 25, n. 8, p. 1091–1093, 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btp101>>. .

BOUKEDI, H.; SELLAMI, S.; KTARI, S.; et al. Isolation and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain with a promising toxicity against Lepidopteran pests. **Microbiological Research**, v. 186–187, p. 9–15, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131630009X>>. .

BRUNETTI, G.; FARRAG, K.; SOLER-ROVIRA, P.; et al. The effect of compost and *Bacillus licheniformis* on the phytoextraction of Cr, Cu, Pb and Zn by three brassicaceae species from contaminated soils in the Apulia region, Southern Italy. **Geoderma**, v. 170, p. 322–330, 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016706111003478>>. .

BUSH, W. S.; MOORE, J. H. Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 12, 2012.

CHALLA, S.; NEELAPU, N. R. R. **Genome-Wide Association Studies (GWAS) for Abiotic Stress Tolerance in Plants**. Elsevier Inc., 2018.

CHENG, M.-C.; HSIEH, E.-J.; CHEN, J.-H.; CHEN, H.-Y.; LIN, T.-P. Arabidopsis RGLG2, Functioning as a RING E3 Ligase, Interacts with AtERF53 and Negatively Regulates the Plant Drought Stress Response. **Plant Physiology**, v. 158, n. 1, p. 363–375, 2012. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.111.189738>>. .

CHENG, Z. Highly Divergent Methyltransferases Catalyze a Conserved Reaction in Tocopherol and Plastoquinone Synthesis in Cyanobacteria and Photosynthetic Eukaryotes. **THE PLANT CELL ONLINE**, v. 15, n. 10, p. 2343–2356, 2003. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.013656>>. .



CHITHRASHREE; UDAYASHANKAR, A. C.; CHANDRA NAYAKA, S.; REDDY, M. S.; SRINIVAS, C. Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Biological Control**, v. 59, n. 2, p. 114–122, 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1049964411001629>>. .

CHIU, C.-C.; CHEN, L.-J.; SU, P.-H.; LI, H. Evolution of Chloroplast J Proteins. (K. Wu, Org.) **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70384, 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0070384>>. .

CLARK, R. M.; SCHWEIKERT, G.; TOOMAJIAN, C.; et al. Common Sequence Polymorphisms Shaping Genetic Diversity in *Arabidopsis thaliana*. **Science**, v. 317, n. 5836, p. 338–342, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1138632>>. .

CORWIN, J. A.; SOLTIS, N. E.; ATWELL, S.; et al. Digital Imaging Combined with Genome-Wide Association Mapping Links Loci to Plant-Pathogen Interaction Traits. **Plant Physiology**, v. 178, n. 3, p. 1406–1422, 2018.

DEVLIN, P. F.; PATEL, S. R.; WHITELAM, G. C. Phytochrome E Influences Internode Elongation and Flowering Time in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 10, n. 9, p. 1479–1487, 1998. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.10.9.1479>>. .

DURÁN, P.; THIERGART, T.; GARRIDO-OTER, R.; et al. Microbial Interkingdom Interactions in Roots Promote *Arabidopsis* Survival. **Cell**, v. 175, n. 4, p. 973–983.e14, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30388454>%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC6218654>. .

ELSHAKH, A. S. A.; ANJUM, S. I.; QIU, W.; et al. Controlling and Defence-related Mechanisms of *Bacillus* Strains Against Bacterial Leaf Blight of Rice. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 7–8, p. 534–546, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jph.12479>>. .

FITZSIMONS, M. S.; MILLER, R. M. The importance of soil microorganisms for maintaining diverse plant communities in tallgrass prairie. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 12, p. 1937–1943, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.3732/ajb.0900237>>. .

FLORES-FÉLIX, J. D.; SILVA, L. R.; RIVERA, L. P.; et al. Plants Probiotics as a Tool to Produce

Highly Functional Fruits: The Case of Phyllobacterium and Vitamin C in Strawberries. (S. Osorio-Algar, Org.) **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0122281, 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0122281>>. .

GAGNÉ-BOURQUE, F.; BERTRAND, A.; CLAESSENS, A.; ALIFERIS, K. A.; JABAJI, S. Alleviation of Drought Stress and Metabolic Changes in Timothy (*Phleum pratense* L.) Colonized with *Bacillus subtilis* B26. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00584/abstract>>. .

GALLOWAY, J. N.; TOWNSEND, A. R.; ERISMAN, J. W.; et al. Transformation of the Nitrogen Cycle: Recent Trends, Questions, and Potential Solutions. **Science**, v. 320, n. 5878, p. 889–892, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1136674>>. .

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 395–412, 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071704003608>>. .

GURAV, R.; TANG, J.; JADHAV, J. Novel chitinase producer *Bacillus pumilus* RST25 isolated from the shellfish processing industry revealed antifungal potential against phyto-pathogens. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 125, p. 228–234, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.09.015>>. .

GUTIERREZ-MANERO, F. J.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA, A. N; et al. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, v. 111, n. 2, p. 206–211, 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x>>. .

HAN, Q.-Q.; Lǎ¼, X.-P.; BAI, J.-P.; et al. Beneficial soil bacterium *Bacillus subtilis* (GB03) augments salt tolerance of white clover. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00525/abstract>>. .

HENRIQUES, R.; MAGYAR, Z.; MONARDES, A.; et al. Arabidopsis S6 kinase mutants display chromosome instability and altered RBR1–E2F pathway activity. **The EMBO Journal**, v. 29, n. 17, p. 2979–2993, 2010. Disponível em: <<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2010.164>>. .

HORTON, M. W.; HANCOCK, A. M.; HUANG, Y. S.; et al. Genome-wide patterns of genetic variation in worldwide *Arabidopsis thaliana* accessions from the RegMap panel. **Nature Genetics**, v. 44, n. 2, p. 212–216, 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ng.1042>>. .

HU, Y.; XIE, Q.; CHUA, N.-H. The *Arabidopsis* Auxin-Inducible Gene ARGOS Controls Lateral Organ Size. **The Plant Cell**, v. 15, n. 9, p. 1951–1961, 2003. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.013557>>. .

HUANG, P.-Y.; CATINOT, J.; ZIMMERLI, L. Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 5, p. 1231–1241, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/erv518>>. .

HUANG, S.; CHEN, X.; ZHONG, X.; et al. Plant TRAF Proteins Regulate NLR Immune Receptor Turnover. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 2, p. 204–215, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193131281630004X>>. .

ICHIKAWA, M.; HIRANO, T.; ENAMI, K.; et al. Syntaxin of Plant Proteins SYP123 and SYP132 Mediate Root Hair Tip Growth in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 4, p. 790–800, 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/pcp/article-lookup/doi/10.1093/pcp/pcu048>>. .

IWATA, Y.; NISHINO, T.; IWANO, M.; TAKAYAMA, S.; KOIZUMI, N. Role of the plant-specific endoplasmic reticulum stress-inducible gene TIN1 in the formation of pollen surface structure in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 51–56, 2012. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/plantbiotechnology/29/1/29\\_11.1228a/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/plantbiotechnology/29/1/29_11.1228a/_article)>. .

JAHN, R.; SCHELLER, R. H. SNAREs — engines for membrane fusion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 9, p. 631–643, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrm2002>>. .

JAKOBY, M.; WEISSHAAR, B.; DRÖGE-LASER, W.; et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 3, p. 106–111, 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138501022233>>. .

JAMIL, M.; ZEB, S.; ANEES, M.; et al. Role of *Bacillus licheniformis* in Phytoremediation of Nickel Contaminated Soil Cultivated with Rice. **International Journal of Phytoremediation**, v.

16, n. 6, p. 554–571, 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15226514.2013.798621>>. .

JUMALI, S. S.; SAID, I. M.; ISMAIL, I.; ZAINAL, Z. Genes induced by high concentration of salicylic acid in *Mitragyna speciosa*. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 3, p. 296–303, 2011.

KAMFWA, K.; CICHY, K. A.; KELLY, J. D. Genome-wide association analysis of symbiotic nitrogen fixation in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, 2015.

KANG, S.-M.; RADHAKRISHNAN, R.; LEE, K.-E.; et al. Mechanism of plant growth promotion elicited by *Bacillus* sp. LKE15 in oriental melon. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science**, v. 65, n. 7, p. 637–647, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09064710.2015.1040830>>. .

KASIM, W. A.; OSMAN, M. E.; OMAR, M. N.; et al. Control of Drought Stress in Wheat Using Plant-Growth-Promoting Bacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 1, p. 122–130, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00344-012-9283-7>>. .

BEN KHEDHER, S.; KILANI-FEKI, O.; DAMMAK, M.; et al. Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato. **Comptes Rendus Biologies**, v. 338, n. 12, p. 784–792, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S163106911500236X>>. .

KILIAN, M.; STEINER, U.; KREBS, B.; et al. *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, , n. August, p. 72–93, 2001.

KOONIN, E. V.; TATUSOV, R. L. Computer Analysis of Bacterial Haloacid Dehalogenases Defines a Large Superfamily of Hydrolases with Diverse Specificity. **Journal of Molecular Biology**, v. 244, n. 1, p. 125–132, 1994. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283684717116>>. .

KORTE, A.; FARLOW, A. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: A review. **Plant Methods**, v. 9, n. 1, p. 1, 2013. *Plant Methods*. Disponível em: <[Plant Methods](#)>. .

KRÄMER, U. Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*.

**eLife**, v. 4, p. 1–13, 2015.

LEE, I.-J.; SONG, K.-S.; JOO, G.-J.; RHEE, I.-K.; KIM, Y.-M. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 487–491, 2004.

LEE, SUMIN; LEE, SEUNGHEE; YANG, K.-Y.; et al. Overexpression of PRE1 and its Homologous Genes Activates Gibberellin-dependent Responses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, n. 5, p. 591–600, 2006. Disponível em: <<http://academic.oup.com/pcp/article/47/5/591/1844154/Overexpression-of-PRE1-and-its-Homologous-Genes>>. .

LOUTFY, N.; EL-TAYEB, M. A.; HASSANEN, A. M.; et al. Changes in the water status and osmotic solute contents in response to drought and salicylic acid treatments in four different cultivars of wheat (*Triticum aestivum*). **Journal of Plant Research**, v. 125, n. 1, p. 173–184, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10265-011-0419-9>>. .

MA, K.; XIAO, J.; LI, X.; ZHANG, Q.; LIAN, X. Sequence and expression analysis of the C3HC4-type RING finger gene family in rice. **Gene**, v. 444, n. 1–2, p. 33–45, 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111909003242>>. .

MA, Z.-X.; LENG, Y.-J.; CHEN, G.-X.; et al. The THERMOSENSITIVE MALE STERILE 1 Interacts with the BiPs via DnaJ Domain and Stimulates Their ATPase Enzyme Activities in *Arabidopsis*. (M. Sun, Org.) **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0132500, 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0132500>>. .

MACDONALD, M. E.; NOVELLETTO, A.; LIN, C.; et al. The Huntington's disease candidate region exhibits many different haplotypes. **Nature Genetics**, v. 1, n. 2, p. 99–103, 1992. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ng0592-99>>. .

MARULANDA, A.; BAREA, J.-M.; AZCÓN, R. Stimulation of Plant Growth and Drought Tolerance by Native Microorganisms (AM Fungi and Bacteria) from Dry Environments: Mechanisms Related to Bacterial Effectiveness. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 2, p. 115–124, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00344-009-9079-6>>. .

MARUYAMA, Y.; YAMOTO, N.; SUZUKI, Y.; et al. The *Arabidopsis* transcriptional repressor

ERF9 participates in resistance against necrotrophic fungi. **Plant Science**, v. 213, p. 79–87, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168945213001829>>. .

MOCHIZUKI, S.; HARADA, A.; INADA, S.; et al. The Arabidopsis WAVY GROWTH 2 Protein Modulates Root Bending in Response to Environmental Stimuli. **The Plant Cell**, v. 17, n. 2, p. 537–547, 2005. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.104.028530>>. .

MOHAMED, H. I.; GOMAA, E. Z. Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress. **Photosynthetica**, v. 50, n. 2, p. 263–272, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11099-012-0032-8>>. .

MOU, Z.; HE, Y.; DAI, Y.; LIU, X.; LI, J. Deficiency in Fatty Acid Synthase Leads to Premature Cell Death and Dramatic Alterations in Plant Morphology. **The Plant Cell**, v. 12, n. 3, p. 405–417, 2000. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.12.3.405>>. .

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>>. .

NAVEED, M.; HUSSAIN, M. B.; ZAHIR, Z. A.; MITTER, B.; SESSITSCH, A. Drought stress amelioration in wheat through inoculation with Burkholderia phytofirmans strain PsJN. **Plant Growth Regulation**, v. 73, n. 2, p. 121–131, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10725-013-9874-8>>. .

OBAYASHI, T.; AOKI, Y.; TADAKA, S.; KAGAYA, Y.; KINOSHITA, K. ATTED-II in 2018: A Plant Coexpression Database Based on Investigation of the Statistical Property of the Mutual Rank Index. **Plant and Cell Physiology**, v. 59, n. 1, p. e3–e3, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/pcp/article/59/1/e3/4690683>>. .

OLDROYD, G. E. D.; MURRAY, J. D.; POOLE, P. S.; DOWNIE, J. A. The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. **Annual Review of Genetics**, v. 45, n. 1, p. 119–144, 2011. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genet-110410-132549>>. .

PAGE, D. R.; GROSSNIKLAUS, U. The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 2, p. 124–136, 2002.

PANDEY, S.; GHOSH, P. K.; GHOSH, S.; DE, T. K.; MAITI, T. K. Role of heavy metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 11–17, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12275-013-2330-7>>. .

PEIFFER, J. A.; SPOR, A.; KOREN, O.; et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 16, p. 6548–6553, 2013. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1302837110>>. .

PÉREZ-MONTAÑO, F.; ALÍAS-VILLEGAS, C.; BELLOGÍN, R. A.; et al. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research**, v. 169, n. 5–6, p. 325–336, 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131300164X>>. .

PESARESI, P.; HERTLE, A.; PRIBIL, M.; et al. Arabidopsis STN7 Kinase Provides a Link between Short- and Long-Term Photosynthetic Acclimation. **The Plant Cell**, v. 21, n. 8, p. 2402–2423, 2009. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.108.064964>>. .

PROBANZA, A.; LUCAS, J. A.; ACERO, N.; GUTIERREZ MAÑERO, F. J. The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth 1. Characterization of growth promoting and growth inhibiting bacterial strains. **Plant and Soil**, v. 182, n. 1, p. 59–66, 1996.

PROVART, N. J.; ALONSO, J.; ASSMANN, S. M.; et al. 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. **New Phytologist**, v. 209, n. 3, p. 921–944, 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nph.13687>>. .

QURASHI, A. W.; SABRI, A. N. Osmolyte accumulation in moderately halophilic bacteria improves salt tolerance of chickpea. **Pakistan Journal of Botany**, v. 45, n. 3, p. 1011–1016, 2013.

RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD\_ALLAH, E. F. *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2017.00667/full>>. .



RAMAKRISHNA, W.; YADAV, R.; LI, K. Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. **Applied Soil Ecology**, v. 138, n. October 2018, p. 10–18, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.019>>. .

REY, P.; BÉCUWE, N.; BARRAULT, M.-B.; et al. The Arabidopsis thaliana sulfiredoxin is a plastidic cysteine-sulfinic acid reductase involved in the photooxidative stress response. **The Plant Journal**, v. 49, n. 3, p. 505–514, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.2006.02969.x>>. .

ROGERS, S.; ARMSTRONG, E. M.; SHAHZAD, Z.; et al. EZ-Root-VIS: A Software Pipeline for the Rapid Analysis and Visual Reconstruction of Root System Architecture. **Plant Physiology**, p. pp.00217.2018, 2018.

ROSA-TÉLLEZ, S.; ANOMAN, A. D.; FLORES-TORNERO, M.; et al. Phosphoglycerate Kinases Are Co-Regulated to Adjust Metabolism and to Optimize Growth. **Plant Physiology**, v. 176, n. 2, p. 1182–1198, 2018. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.17.01227>>. .

SARMA, R. K.; SAIKIA, R. Alleviation of drought stress in mung bean by strain Pseudomonas aeruginosa GGRJ21. **Plant and Soil**, v. 377, n. 1–2, p. 111–126, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11104-013-1981-9>>. .

SEREN, Ü. GWA-Portal: Genome-Wide Association Studies Made Easy. . p.303–319, 2018. Disponível em: <[http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7747-5\\_22](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7747-5_22)>. .

SHIN, K.; LEE, I.; KIM, E.; et al. PACLOBUTRAZOL-RESISTANCE Gene Family Regulates Floral Organ Growth with Unequal Genetic Redundancy in Arabidopsis thaliana. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 869, 2019. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/20/4/869>>. .

SHIRAKAWA, M.; UEDA, H.; SHIMADA, T.; et al. Arabidopsis Qa-SNARE SYP2 proteins localized to different subcellular regions function redundantly in vacuolar protein sorting and plant development. **The Plant Journal**, v. 64, n. 6, p. 924–935, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.2010.04394.x>>. .

SIEFERS, N.; DANG, K. K.; KUMIMOTO, R. W.; et al. Tissue-Specific Expression Patterns of



Arabidopsis NF-Y Transcription Factors Suggest Potential for Extensive Combinatorial Complexity. **Plant Physiology**, v. 149, n. 2, p. 625–641, 2009. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.108.130591>>. .

SUGANO, S.; ANDRONIS, C.; GREEN, R. M.; WANG, Z. Y.; TOBIN, E. M. Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the Arabidopsis circadian clock-associated 1 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 18, p. 11020–11025, 1998.

SUL, J. H.; MARTIN, L. S.; ESKIN, E. Population structure in genetic studies: Confounding factors and mixed models. (G. S. Barsh, Org.) **PLOS Genetics**, v. 14, n. 12, p. e1007309, 2018. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1007309>>. .

SUZUKI, N.; BAJAD, S.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. The Transcriptional Co-activator MBF1c Is a Key Regulator of Thermotolerance in Arabidopsis thaliana. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 14, p. 9269–9275, 2008. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M709187200>>. .

TEHSEEN, M.; CAIRNS, N.; SHERSON, S.; COBBETT, C. S. Metallochaperone-like genes in Arabidopsis thaliana. **Metallomics**, v. 2, n. 8, p. 556, 2010. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c003484c>>. .

THOMPSON, E. P.; LLEWELLYN SMITH, S. G.; GLOVER, B. J. An Arabidopsis rhomboid protease has roles in the chloroplast and in flower development. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, p. 3559–3570, 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/ers012>>. .

TILMAN, D.; CASSMAN, K. G.; MATSON, P. A.; NAYLOR, R.; POLASKY, S. 2 Tilman. **Nature**, v. 418, n. August, p. 671–677, 2002.

TOUFIGHI, K.; BRADY, S. M.; AUSTIN, R.; LY, E.; PROVART, N. J. The Botany Array Resource: e-Northern, Expression Angling, and promoter analyses. **The Plant Journal**, v. 43, n. 1, p. 153–163, 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.2005.02437.x>>. .

VEJAN, P.; ABDULLAH, R.; KHADIRAN, T.; ISMAIL, S.; NASRULHAQ BOYCE, A. Role of

plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 1–17, 2016.

VISSCHER, P. M.; WRAY, N. R.; ZHANG, Q.; et al. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. **American Journal of Human Genetics**, v. 101, n. 1, p. 5–22, 2017. ElsevierCompany. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.06.005>>. .

VURUKONDA, S. S. K. P.; GIOVANARDI, D.; STEFANI, E. Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of Streptomyces spp. as Endophytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 952, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/19/4/952>>. .

WALKER, E. L.; CONNOLLY, E. L. Time to pump iron: iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 5, p. 530–535, 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369526608001167>>. .

WANG, G.; ELLENDORFF, U.; KEMP, B.; et al. A Genome-Wide Functional Investigation into the Roles of Receptor-Like Proteins in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 147, n. 2, p. 503–517, 2008. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/lookup/doi/10.1104/pp.108.119487>>. .

WANG, S. Molecular Mechanism of Plant Growth Promotion and Induced Systemic Resistance to Tobacco Mosaic Virus by Bacillus spp. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 10, p. 1250–1258, 2009. Disponível em: <<http://jmb.inforang.com/>>. .

WANG, X.; WU, F.; XIE, Q.; et al. SKIP Is a Component of the Spliceosome Linking Alternative Splicing and the Circadian Clock in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 24, n. 8, p. 3278–3295, 2012. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/lookup/doi/10.1105/tpc.112.100081>>. .

WATERWORTH, W. M.; DRURY, G. E.; BLUNDELL-HUNTER, G.; WEST, C. E. Arabidopsis TAF1 is an MRE11-interacting protein required for resistance to genotoxic stress and viability of the male gametophyte. **The Plant Journal**, v. 84, n. 3, p. 545–557, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/tpj.13020>>. .

WIN, K.; OO, A.; OHKAMA-OHTSU, N.; YOKOYAMA, T. Bacillus Pumilus Strain TUAT-1 and Nitrogen Application in Nursery Phase Promote Growth of Rice Plants under Field Conditions. **Agronomy**, v. 8, n. 10, p. 216, 2018.

WINTERMANS, P. C. A.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Natural genetic variation in *Arabidopsis* for responsiveness to plant growth-promoting rhizobacteria. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 623–634, 2016.

XIE, Z.; CHU, Y.; ZHANG, W.; LANG, D.; ZHANG, X. *Bacillus pumilus* alleviates drought stress and increases metabolite accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. **Environmental and Experimental Botany**, v. 158, n. July 2018, p. 99–106, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.11.021>>. .

XIONG, Y.; CONTENTO, A. L.; BASSHAM, D. C. AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 42, n. 4, p. 535–546, 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.2005.02397.x>>. .

ZHANG, S.; REDDY, M. S.; KLOEPPER, J. W. Tobacco growth enhancement and blue mold disease protection by rhizobacteria: Relationship between plant growth promotion and systemic disease protection by PGPR strain 90-166. **Plant and Soil**, v. 262, n. 1/2, p. 277–288, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/B:PLSO.0000037048.26437.fa>>. .

ZHU, S.-Q.; CHEN, M.-W.; JI, B.-H.; JIAO, D.-M.; LIANG, J.-S. Roles of xanthophylls and exogenous ABA in protection against NaCl-induced photodamage in rice (*Oryza sativa* L) and cabbage (*Brassica campestris*). **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 13, p. 4617–4625, 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/err170>>. .