

# 利用加權基因共表現網絡分析蕈狀芽孢桿菌BM103 對阿拉伯芥韌性轉錄基因體的影響

張道禾<sup>1</sup>、張碧芳<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> 國立中興大學循環經濟研究學院植物保健學程助理教授。

<sup>2</sup> 國立中興大學植物病理學系／循環經濟研究學院植物保健學程教授。

\* pfchang@nchu.edu.tw

## 摘 要

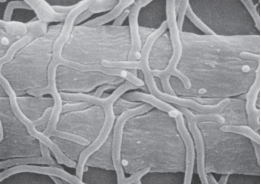
在全球氣候變遷背景下，提高作物對非生物逆境的韌性成爲當前農業研究的重要課題。本研究利用加權基因共表現網絡分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 探討蕈狀芽孢桿菌 (*Bacillus mycoides*, BM103) 對模式植物阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 在不同逆境下的轉錄基因體影響。本研究分析阿拉伯芥在處理 BM103 後，分析其根部與幼苗在不同逆境 (高溫 and 乾旱) 下的發育情形，並進一步分析阿拉伯芥種子在處理 BM103 後於不同逆境下的轉錄基因體變化。在根部發育的表型中，處理 BM103 可在逆境下明顯提升根部發育性狀，顯示 BM103 具有提升阿拉伯芥韌性的效益，爲進一步了解 BM103 對阿拉伯芥韌性基因的影響，分析 18 組「阿拉伯芥-BM103-逆境」轉錄基因體數據，其中包括高溫與乾旱逆境。利用 WGCNA 取得共 7 個基因表現模組，其中四個基因表現模組與阿拉伯芥的根部發育表型具有高度關聯性，後續並利用轉錄因子富集分析 (transcription factor enrichment analysis, TFEA) 取得數個與該些模組相關的轉錄因子，最終取得 45 個高度相關的韌性基因，針對該些基因進行基因功能分類 (gene ontology) 和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 路徑分析，發現該些韌性基因所參與的反應含括光合作用、逆境訊號反應、荷爾蒙訊號傳遞、蛋白質後修飾等，本研究結果顯示 BM103 具有提升阿拉伯芥韌性的能力，且轉錄基因體的結果顯示提升阿拉伯芥韌性能力並非單一因子參與其中，未來分析提升植物韌性能力時需分析多種韌性基因表現做爲生物標記，始能精準判斷效益。

**關鍵字：**非生物逆境、基因功能分類、KEGG路徑分析、轉錄因子富集分析

## 前 言

氣候變遷對全球農業活動造成相當嚴重的危害。根據聯合國政府間氣候變化專門委員會 (Intergovernmental Panel on Climate

Chang, IPCC) 報告，全球平均溫度在近十年間已上升 1.1°C，也因此極端高溫、乾旱和洪水等自然災害在近年變得更加頻繁 (IPCC, 2023)。這些氣候的變化直接影響農作物產量和品質，在義大利東北部，預估至 21 世



紀末將會有 76% 的耕地可能成為乾旱地區 (Straffelini & Tarolli, 2023)；在臺灣，2023 年 2 至 3 月間的嚴重乾旱造成大面積茶樹、果樹和竹筍遭遇嚴重的損害，該些農業產物損失估計高達 5 億元新台幣 (農業部，2023)。這些由氣候變遷引發的非生物逆境不僅影響作物的生長和產量，同時也改變植物的生理代謝過程，如光合作用效率降低、水分利用效率改變等 (Zandalinas *et al.*, 2021)。因而提高作物對非生物逆境的韌性，開發新的農業技術以適應氣候變遷，是當前農業研究的重要課題。

有益微生物在提高植物韌性方面展現出巨大潛力，成為應對氣候變遷對農業影響的重要策略之一。這些微生物，包括內生菌、植物生長促進根際細菌 (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR) 和叢枝菌根菌 (arbuscular mycorrhiza, AMF) 等，能夠通過多種機制增強植物對生物與非生物逆境的韌性 (Fan *et al.*, 2020; Shah *et al.*, 2021; Veiga *et al.*, 2013)。芽孢桿菌屬細菌 (*Bacillus* spp.) 因其能產生高度耐逆境的內生孢子，特別適合應用於田間 (Sansinenea, 2019)，*Bacillus* sp. 12D6 能減輕小麥和玉米幼苗在乾旱地區的缺水逆境 (Jochum *et al.*, 2019)，蕈狀芽孢桿菌 (*B. mycoides*, BM103) 已被證實可有效降低草莓炭疽病之罹病率 (陳，2017)，液化澱粉芽孢桿菌 (*B. amyloliquefaciens* BA01) 則被證實可防治萵苣黑斑病 (高，2013)，而地衣芽孢桿菌 (*B. licheniformis* EC-34-01) 則對檸檬炭疽病有良好的防治效果 (江，2011)。其他類型的有益微生物也有提升植物耐逆境的能力，如：螢光假單胞菌 (*Pseudomonas fluorescens* TDK1) 可提高花生耐鹽性 (Saravanakumar & Samiyappan, 2007)；鏈黴菌 (*Streptomyces* sp. PGPA39) 能緩解番茄鹽逆境反應並促進生長 (Palaniyandi *et al.*, 2014)；

內生木黴菌 (*Trichoderma hamatum* DIS 219b) 可促進可可樹生長並延緩其乾旱反應 (Bae *et al.*, 2009)；叢枝菌根菌 (*Glomus mosseae*) 則能提高辣椒耐鹽性 (Abdel Latef & Chaoping, 2014)。這些有益微生物通過多種機制提升植物韌性，包括調節植物荷爾蒙的恆定、增強抗氧化系統、改善養分吸收和促進根系發展等 (Barnawal *et al.*, 2012; Jochum *et al.*, 2019; Shah *et al.*, 2021)。其中，某些 PGPR 產生的 1-氨基環丙烷-1-羧酸 (1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC，為乙烯的前趨物) 脫氨酶 (deaminase) 在提升植物逆境耐受性中扮演重要角色 (Rauf *et al.*, 2021)。ACC 脫氨酶能催化 ACC 的分解，降低植物體內乙烯含量。乙烯是重要的植物荷爾蒙，在逆境下含量升高，過量會抑制根系生長並加速植物衰老。通過降低 ACC 含量，PGPR 能緩解因逆境引起的過量乙烯，減輕其對植物生長的抑制，如螢光假單胞菌 S20 產生的 ACC 脫氨酶能增加玉米在高鹽環境下的產量 (Nadeem *et al.*, 2009)。

轉錄基因體分析在研究微生物與植物交互作用中扮演著關鍵角色，為深入理解有益微生物如何提升植物逆境韌性提供了相當有力的分析方法。利用高通量技術能夠全面捕捉植物在與微生物互作過程中的基因表現變化，並且發現在這種情況下的複雜調控網絡和分子機制。利用轉錄基因體分析研究巴西固氮螺菌 *Azospirillum brasilense* 與水稻的交互作用，發現菌株處理明顯改變水稻根部的基因表現模式，特別是與氮代謝、荷爾蒙訊號和根系發育相關的基因 (Drogue *et al.*, 2014)。木黴菌 *T. harzianum* 利用提高番茄中與防禦反應、荷爾蒙代謝和二次代謝相關的基因來增強植物的韌性 (Coppola *et al.*, 2019)。除了利用差異表現基因分析之外，現在也有許多分析方法適用於更為複雜的

生物交互作用，其中加權基因共表現網絡分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 是一種系統生物學方法，特別適用於分析複雜的轉錄基因體數據。WGCNA 通過構建基因共表現網絡，將具有相似表現模式的基因聚類成模塊，並將這些模塊與特定的生物學特徵或表型相關聯 (Langfelder & Horvath, 2008)。這種方法在植物-微生物互作研究中尤為有用，因為它可以揭示潛在的功能模塊和關鍵調控基因。如：利用WGCNA分析 *B. subtilis* TR21 對香蕉的影響以及防治香蕉黃葉病的能力，成功識別出與植物生長和抗病性相關的關鍵基因模組 (Sun *et al.*, 2022)；另外轉錄基因體也可以利用轉錄因子富集分析 (transcription factor enrichment analysis, TFEA) 協助發現新的分子調控機制 (Rubin *et al.*, 2021; Shim & Seo, 2020)，學者們分析液化澱粉芽孢桿菌 (*B. amyloliquefaciens*) FZB42菌株對阿拉伯芥轉錄基因體的影響，發現FZB42處理阿拉伯芥後改變代謝網絡相關的基因表現，其中有許多轉錄因子的參與 (Liu *et al.*, 2017)。此外，轉錄基因體分析為開發更精確的生物標記提供了基礎。隨著生物資訊的發展，如基因功能分類 (gene ontology, GO) 和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 路徑資料庫的完整與成熟 (Ashburner *et al.*, 2000; Kanehisa *et al.*, 2002)，能夠完整解釋轉錄基因體的數據，將基因表現變化與具體的生物學功能和代謝路徑完整聯結。這樣的系統性分析方法可以為微生物-植物交互作用的整體效應提供新的視角，不僅深化基礎生物學的知識，同時也為開發新型農業生物技術產品和永續農業的應用提供了重要的科學依據。

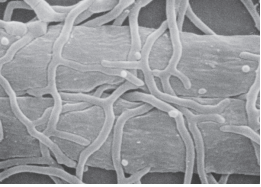
本次研究目標為探討有益微生物對模式植物阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) 在非生物逆境條件下的影響，並分析其潛在的分子

機制。蕈狀芽孢桿菌 (*B. mycooides*) BM103 能有效降低草莓炭疽病發病率 (陳, 2017)，並減少金線連莖腐病病情約 30-40% (黃, 2019; 彭與黃, 2019)，因 BM103 效果顯著，因此本研究以 BM103 作為研究標的，利用 WGCNA 加上 TFEA 方法，分析 18 組「阿拉伯芥-BM103-逆境」轉錄基因體數據，同時比較 BM103 對阿拉伯芥在高溫和乾旱逆境下的生長發育影響，期望能夠找出關鍵的基因表現模組和調控網絡。通過這些分析為未來開發微生物的植物保護策略提供理論基礎以及建立篩選平台。

## 材料與方法

### 植物材料和微生物菌株

本研究使用阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana* Col-0) 作為試驗材料。種子來源為中興大學循環經濟研究學院植物保健學程。參照 Chang 氏 (2022) 發表之種子表面消毒方法，以 50% 家用漂白水 (Clorox bleach®, 有效成份為 2.5% NaOCl) 震盪浸潤種子 10 min，之後使用無菌水漂洗 10 次。消毒後的種子在 4°C 黑暗春化一日後，均勻播至培養土 (福壽牌固根土 (泥炭土90% (泥炭比例為白泥炭60%、黑泥炭40%)、珍珠石10%))，並轉移至控溫環境中生長 (25°C，無光照)，塑膠上蓋覆蓋培養穴盤以保持濕度，無光照培養兩日後即可開蓋並開始光照生長 (光週期：16hr光照和8hr黑暗)，生長約四週後收取種子並利用乾燥箱去除種子水份，種子在 25°C 下保存於透氣之微量離心管。蕈狀芽孢桿菌 BM103 (*Bacillus mycooides*) 菌株由國立中興大學植物病理學系黃振文教授提供。菌株以畫線分離純化，以牛肉煎汁瓊脂培養基 (nutrient agar, NA, 3 g L<sup>-1</sup> Beef extract, 5 g L<sup>-1</sup> peptone, 2% agar) 增量培養一日後，以滅菌後



之棉花棒刮取菌落製作細菌懸浮液，菌株以 25% 甘油保存於 -80°C 冷凍櫃。

### 植物處理微生物和逆境條件

取適量阿拉伯芥種子，經上述表面消毒方法，在無菌水漂洗十次後取有益微生物懸浮液 0.1 ml ( $OD_{600} = 0.1$ ) 加入 0.9 ml 種子懸浮液 (細菌最終濃度為  $10^4$  cfu mL<sup>-1</sup>) 於室溫 (25°C) 均勻震盪混合 1 hr，對照組以 0.1 mL 無菌水處理，種子處理後置於 4°C 暗室均勻震盪混合 24hr。處理後之種子均勻地放置於 1/2 MS 培養基 (2.2 g, Murashige and Skoog salts (PhytoTech Labs®) 1% sucrose, 2% agar) 中，其中水份逆境即於 MS 培養基中加入 5% 的甘露醇 (mannitol) 阻斷水份運輸；而溫度逆境將種子置於 37°C 之培養箱中培養 24 小時 (Silva-Correia *et al.*, 2014)，阿拉伯芥於培養一週後觀察其發芽率與胚根發展。阿拉伯芥種子處理微生物懸浮液後，均勻灑佈於培養土中，並培養於高濕度避光之環境下，待一週後取發芽之幼苗分株定植於穴盤同時澆灌 BM103 懸浮液 1 ml ( $OD_{600} = 0.5$ )，並在定植後一週處理各類逆境，包括乾旱逆境 (不澆水 5 日後復水) 與高溫逆境 (37°C 日溫/35°C 夜溫)，於阿拉伯芥栽培與處理逆境期間每日澆灌 BM103 懸浮液 1 ml ( $OD_{600} = 0.5$ )。

### 生長指標測定

種子處理結果利用簡易照相系統拍攝培養盤，利用複式顯微鏡拍射細部構造 (下胚軸、莖基部及成熟部)，部份種子處理之阿拉伯芥將用於轉錄基因體之分析，苗期處理植株在栽種後第四週以簡易照相系統拍攝阿拉伯芥苗期發育，包括地上部全葉結構、抽苔之主莖及果莢，並紀錄全葉鮮重和抽苔莖重，種子處理與苗期處理所得之相片，利用 ImageJ 影像分析軟體 (Schindelin *et al.*, 2012)

分析以下生長指標 (Nadeem *et al.*, 2009)，種子處理生長指標：下胚軸長、莖基部寬、主根長、平均根毛長及根毛密度；苗期處理生長指標：全葉面積、葉片數、抽苔主莖長及果莢總數。

### 轉錄基因體

種子處理後之樣品，利用市售之植物核酸純化套組萃取總量 RNA (FavorPrep™ Plant Total RNA Kit, FAVORGEN Biotech Corp)，阿拉伯芥樣品 (約 10 株) 收集於震盪離心管，將 500  $\mu$  L FARB buffer 和 5  $\mu$  L  $\beta$ -mercaptoethanol 加入樣品中。利用振盪均質機 (Genetech Biotech) 以陶瓷珠打碎樣品組織。將組織混合液在室溫下靜置 5min，讓細胞壁充分裂解。接著，用過濾管柱 (Filter column) 過濾組織混合液，並以 18,000  $\times$  g 高速離心 1min。取過濾後的上清液，加入等量的 70% 酒精混合，以純化核酸。將混合液移至 FARB 微型管柱 (FARB mini column, FAVORGEN Biotech Corp) 中萃取核酸。使用 DNase I (0.5 U  $\mu$  L<sup>-1</sup>, FAVORGEN Biotech Corp) 處理樣品，去除當中的 genomic DNA。最後，用 RNase-free water 回溶 RNA，並將 RNA 樣品直接委由圖爾思生物科技股份有限公司進行 RNA 定序以及前端分析 (品質控管、轉錄基因體組裝、定量和差異表現分析)，定序使用 Illumina RNA seq 系統取得初始序列資料，品質控管以 FastQC 檢驗序列品質，另外以 MultiQC 將各式樣品品質資料統整 (Ewels *et al.*, 2016)；利用 Trimmomatic 過濾取得高品質的序列資料 (Bolger *et al.*, 2014)；以 HISAT2 將整理後之序料資料比對映射於參考序列，同時計算各基因原始表現量 (raw read counts) (Kim *et al.*, 2015)，差異表現基因 (differential expressed genes, DEG) 利用 DESeq2 以標準化後的基因表現量

transcript per million (TPM) 進行分析 (Love *et al.*, 2014)。

### 生物資訊分析

本次研究使用加權基因共表現網絡分析 (WGCNA) 分析「阿拉伯芥-BM103-逆境」交互作用下之轉錄基因體，使用開源數據分析軟體 R 之 WGCNA (v 1.72) 套裝軟體以 TPM 數據分析基因表現，將高度相關之基因分組聚類成一個模組 (Module) (Langfelder & Horvath, 2008)，在構築共表現網絡與檢測模組後，將基因表現與根部發育性狀連結並聚類成七個主要的模組；聚類模組中與根部發育相關的模組再進一步利用網路工具 PlantRegMap (<https://plantregmap.gao-lab.org/about.php>) 中的轉錄因子富集分析 (TFEA) 取得與該些模組具關聯性之轉錄因子 (Tian *et al.*, 2020)，最終利用 WGCNA 和 TFEA 分析取得 45 個與「阿拉伯芥-BM103-逆境」交互作用高度相關的韌性基因，該些韌性基因之功能性分析利用生物資訊分析平台 TAIR GO annotation (<https://v2.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp>) 取得基因功能分類 (gene ontology) 以及 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>) 取得 KEGG 路徑分析之結果。

### 數據分析

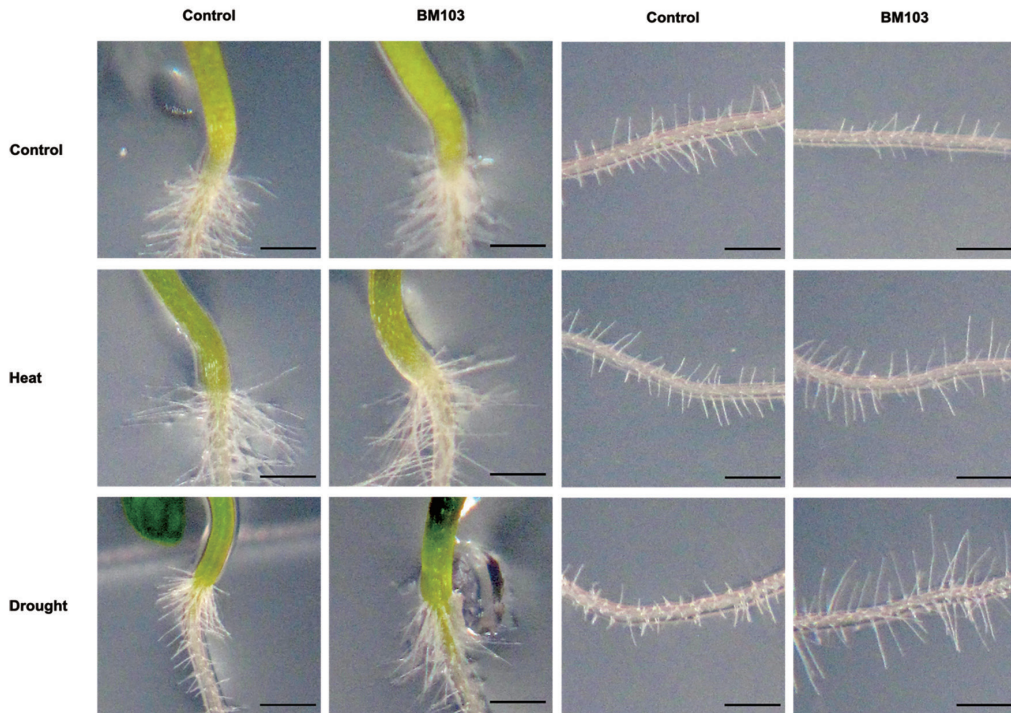
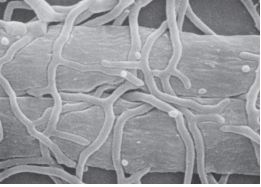
種子和苗期處理性狀數據分析利用 R program (R Core Team, 2021) 進行統計，統計方法為 Student's t-test，以  $P < 0.05$  判斷 BM103 處理組與未處理微生物之對照組數據間是否有顯著差異，數據呈現利用 R program 套裝軟體 ggplot2 繪製盒鬚圖 (Wickham, 2016)，利用 WGCNA 套裝軟體繪製基因模組分析以及 ComplexHeatmap 套裝軟體繪置熱圖 (Gu, 2022)。

## 結 果

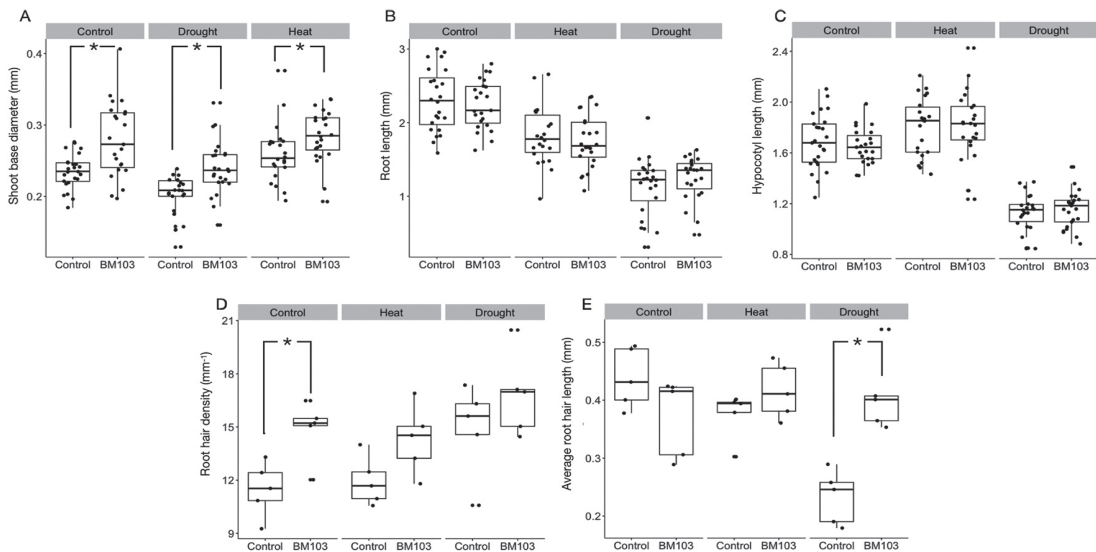
BM103 處理顯著改變了阿拉伯芥的根部形態 (圖一)。在正常生長條件下，BM103 處理組的根系發育明顯優於對照組，其中莖基部有明顯增寬增大的現象。同時在高溫 (37°C) 和乾旱 (5% 甘露醇) 逆境條件下 BM103 對根部發育的促進效果更為明顯。在高溫和乾旱逆境下，BM103 處理組的根部發育狀態，根毛密度與根毛平均長度皆明顯優於對照組。這些結果顯示 BM103 能夠增強阿拉伯芥根系並且提升阿拉伯芥對逆境的韌性。

爲了能夠更加精細分析以及提供後續轉錄基因體中的表型資料，將 BM103 處理阿拉伯芥種子發育的影像資料進一步數據化。爲此分析阿拉伯芥的莖基部寬度、根長、下胚軸長度、根毛密度和平均根毛長度 (圖二)，由數據分析的結果得知，莖基部寬 (圖二 A) 在三種環境條件下，處理 BM103 皆有顯著提升的效果；BM103 處理後對根長與下胚軸長在不同生長條件下皆未有明顯改變 (圖二 B 和 C)；在正常生長條件下處理 BM103 可明顯提升根毛的密度，而在高溫 (37°C) 和乾旱 (5% 甘露醇) 逆境下 BM103 處理也可提升根毛的密度 (圖二 D)；此外，在乾旱逆境下，BM103 的處理可明顯提升阿拉伯芥根毛的長度 (圖二 E)。在種子發育的階段，BM103 在不同的條件下能促進莖基部的生長，BM103 對根毛的發育也具有相當明顯的影響，這樣的現象可能與阿拉伯芥的韌性具有關聯性。

爲了更進一步了解 BM103 在阿拉伯芥植株生長的影響，利用澆灌的方式處理阿拉伯芥幼苗，並且分析阿拉伯芥植株在生長四週後的總葉面積、葉片數、總葉片鮮重、抽苔主莖長、抽苔主莖鮮重及種莢總數 (圖三)。



圖一、阿拉伯芥處理韮狀芽孢桿菌 BM103 後在不同逆境下之根部細部構造。  
阿拉伯芥在對照組 (Control) 和處理韮狀芽孢桿菌 (BM103) 後，在正常生長條件 (Control)、高溫逆境 (Heat, 37°C) 及乾旱逆境 (Drought, 5%甘露醇) 下的下胚軸 (左二行) 和根毛 (右二行) 細部構造，每一小圖右下角之比例尺代表為 1 mm。

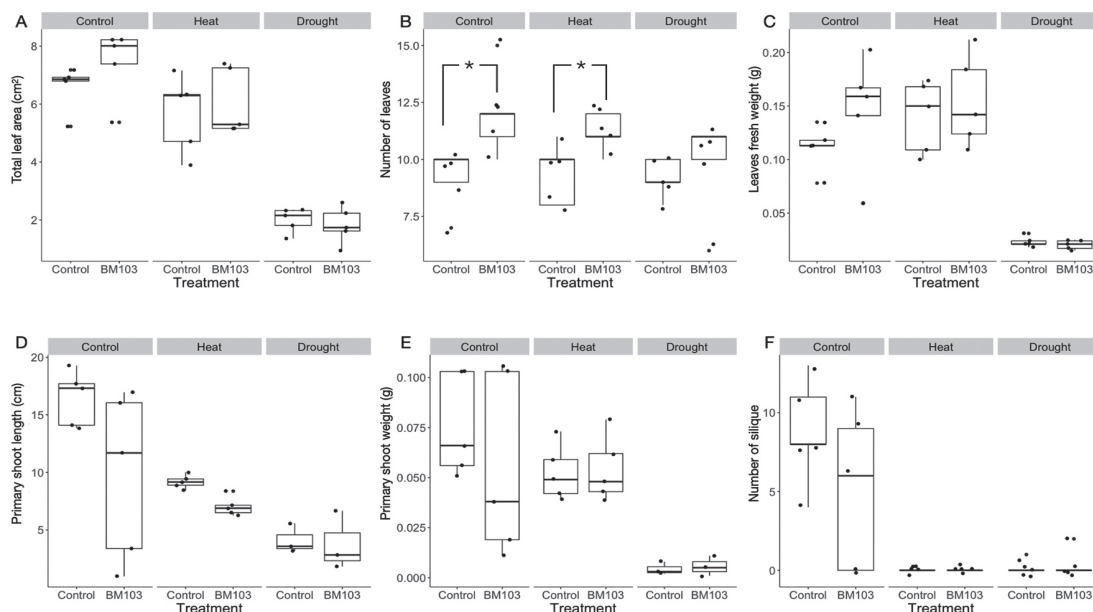


圖二、韮狀芽孢桿菌BM103對阿拉伯芥在正常和逆境條件下種子發育的影響。  
阿拉伯芥在對照條件 (Control)、高溫 (Heat) 及乾旱 (Drought) 逆境下，未接種 (Control) 和接種BM103菌株後的種子發育之比較。每個子圖代表不同的種子發育的不同生長參數，A、莖基部寬、B、根長、C、下胚軸長、D、根毛密度以及E、根毛平均長度。其中盒鬚圖中的箱型表示資料在四分位數的範圍，中線是中位數，點表示各樣品的數據，圖中星號表示 Students't test 統計結果顯示具有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

多數生長參數在處理 BM103 後並無明顯的差異，然而，BM103 處理組的葉片數在正常生長條件與高溫逆境下均有顯著提高的現象(圖三B)，在乾旱逆境下雖然未有統計上的差異，卻也有提高葉片數的趨勢。在苗期生長發育的生長參數中，雖然多數參數並沒有明顯的差異，但處理 BM103 對葉片數的提升可能與阿拉伯芥對逆境的韌性具有關聯性。

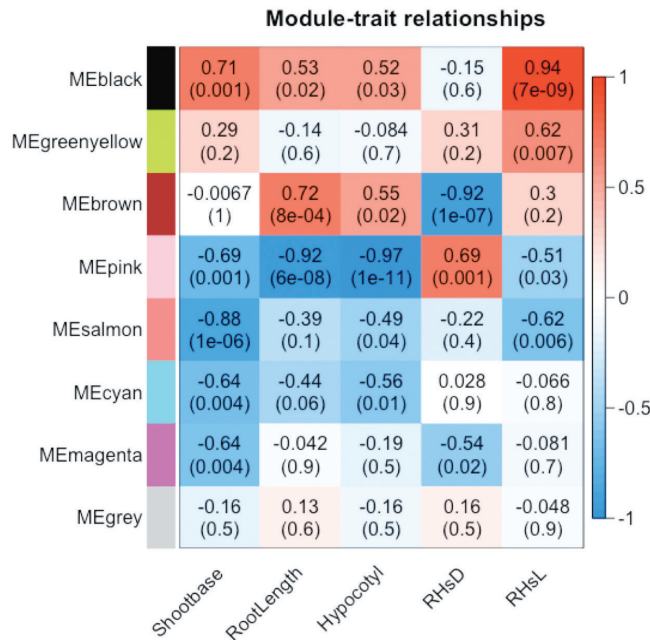
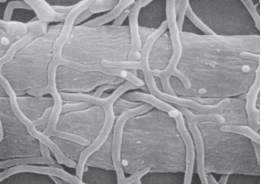
在種子發育與幼苗生長的結果顯示 BM103 具提升阿拉伯芥對逆境之韌性，因此為進一步了解 BM103 在分子生物學層面對植物韌性的影響，利用轉錄基因體的研究方法，將「阿拉伯芥- BM103-逆境」轉錄基因體以加權基因共表現網絡分析(WGCNA)了解轉錄基因體與種子發育的關係。利用 WGCNA 可將轉錄基因體區別為共七大類的基因模組，這些基因模組再進一步與種子發

育性狀進行關聯性分析(圖四)，結果顯示部分基因模組與特定的發育性狀呈現強烈的相關性。MEblack模組與根毛平均長度呈現顯著正相關，MEbrown模組與根長呈現正相關但與根毛密度呈現顯著負相關，MEpink模組與根長和下胚軸長呈現顯著負相關，MEsalmon模組則與莖基部寬呈現顯著負相關。另外針對特徵基因(eigengene)與種子發育相關的性狀進行聚類和關聯熱圖分析(圖五)，在聚類的分析中(圖五左)，根長和下胚軸長在樹狀與MEbrown特徵基因相近，顯示根長和下胚軸長的發育可能與MEbrown模組中的基因調控相關，而莖基部寬和根毛平均長度與MEblack特徵基因被分類在同一群集中，推論這兩者的發育與MEblack模組基因的調控有關係，至於根毛密度則與MEpink模組基因的調控相關。在聚類分析(圖五左)



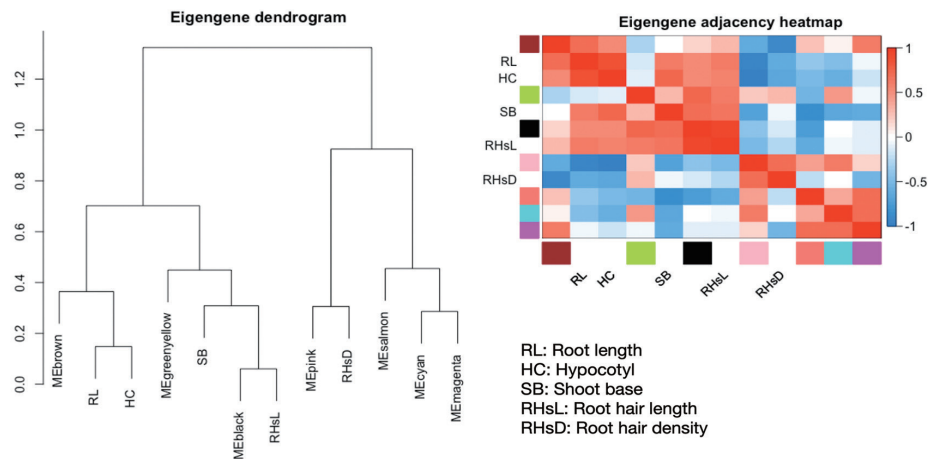
圖三、蕈狀芽孢桿菌BM103對阿拉伯芥苗期在正常和逆境條件下的生長影響。

阿拉伯芥在對照條件 (Control)、高溫 (Heat) 及乾旱 (Drought) 逆境下，未接種 (Control) 和接種BM103菌株後的種子發育之比較。每個子圖代表不同的種子發育的不同生長參數，A、總葉面積、B、葉片數、C、總葉片鮮重、D、抽苔主莖長、E、抽苔主莖鮮重以及F、種莢數。其中盒鬚圖中的箱型表示資料在四分位數的範圍，中線是中位數，點表示各樣品的數據，圖中星號表示 Students't test 統計結果顯示具有顯著差異 (p < 0.05)。



圖四、基因模組與種子發育性狀之關聯性熱圖。

利用加權基因共表現網絡分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 取得基因模組與種子發育的性狀的關聯性，其中每列代表單一基因模組 (以不同顏色表示，其中灰色模組 (MEgrey) 表示無法分類的基因)，每行為發育的性狀，顏色由藍 (負相關) 至紅 (正相關)，顏色深淺代表相關性的強弱，每格的數字代表相關係數以及括號內對應的 p 值。Shootbase：莖基部寬；Root Length：根長；Hypocotyl：下胚軸長；RHsD：根毛密度；RHsL：根毛平均長度。



圖五、特徵基因 (eigengene) 與阿拉伯芥種子發育的關聯性分析。

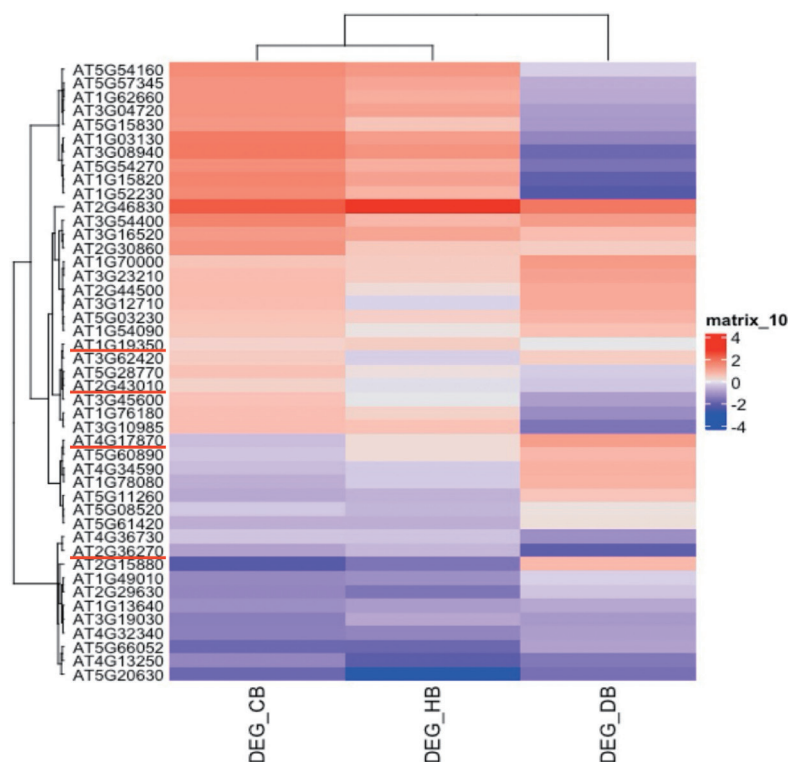
利用加權基因共表現網絡分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 基因模組中規納出之特徵基因 (eigengene) 與阿拉伯芥種子發育的性狀進行關聯性分析並繪製特徵基因與發育性狀的樹狀圖 (左) 與相關性熱圖 (右)，樹狀圖所表示的內容為不同基因模組的特徵基因與發育性狀在聚類的關係，不同的基因模組以顏色命名，熱圖則表示特徵基因 (基因模組以不同顏色顯示，同圖四) 連同種子發育性狀間的相關性強度，顏色自藍色 (負相關) 至紅色 (正相關)，顏色深淺表示相關性的強弱。RL：根長；HC：下胚軸長；SB：莖基部寬；RHsL：根毛平均長度；RHsD：根毛密度。



和關聯性分析 (圖五右) 中根毛密度的性狀明顯與其他性狀的表現有所區隔，特別是根毛長度和根毛密度在生物實體上皆為根毛的性狀，然而在聚類和關聯性沒有明顯的連結，推判在這樣的表現下，平均根毛長度與根毛密度是由不同的基因網絡精密調節所造成的結果。

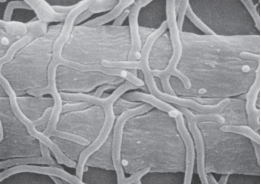
整合 WGCNA 並利用轉錄因子富集分析 (TFEA)，最終篩選出 45 個在「阿拉伯芥-BM103-逆境」交互作用下的核心韌性基因。這些基因在不同處理條件下呈現出複雜的表現模式 (圖六)。在一般生長條件下

(DEG\_CB)，約有 27 個基因在 BM103 處理條件下具有提升表現的趨勢，有 18 個基因降低表現；在高溫逆境下 (DEG\_HB)，所有基因表現模式大致與一般生長條件一致，比較特別的是 AT2G46830 (編碼 circadian clock associated 1) 和 AT5G20630 (編碼 germin-like protein 3) 表現形式在高溫逆境下有明顯的強化；在乾旱逆境中 (DEG\_DB)，約有 23 個基因表現與一般條件下呈現相反的表现形式，如 AT1G52230 (編碼 photosystem I subunit H-2) 和 AT5G54160 (編碼 O-methyltransferase 1) 在處理 BM103 後在乾旱條件下呈現下降的



圖六、最終篩選之核心韌性基因，與該些基因在微生物處理後在不同逆境下的差異表現。

利用加權基因共表現網絡分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 與轉錄因子富集分析 (transcription factor enrichment analysis, TFEA) 取得之 45 個核心韌性基因 (縱軸編號) 以及該些基因在不同條件下的差異表現 (橫軸)，其中顏色自紅色 (表現量上升) 至藍色 (表現量下降) 顏色深淺表示變化的強弱，熱圖左側樹狀圖表示不同基因表現模式的分類，相同表現模式會聚類在同一群集。DEG\_CB：正常培養條件下處理 BM103 之差異基因表現；DEG\_HB：高溫逆境下處理 BM103 之差異基因表現；DEG\_DB：乾旱逆境下處理 BM103 之差異基因表現。紅線標示為圖九所示與植物荷爾蒙相關的基因。

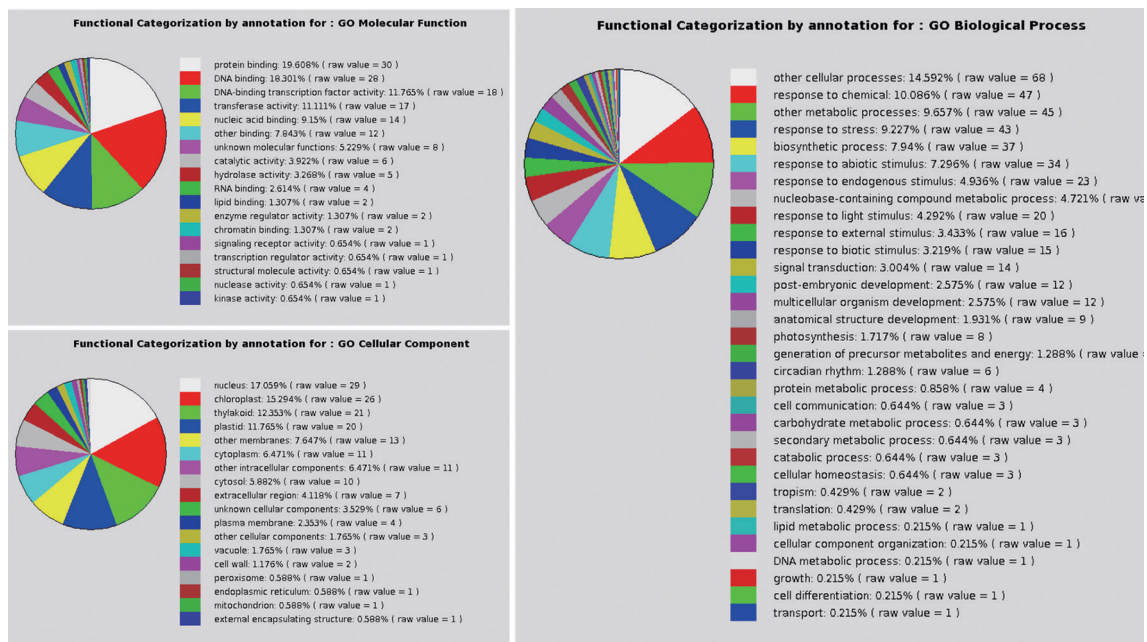


趨勢。這些複雜的基因表現形式，特別是在逆境條件下與一般條件相反或強化的現象，與植物為適應逆境而進行的能量重新分配或代謝反應調整有關，因此要以單一基因完整解釋有益微生物提升植物韌性的效用，在複雜的基因調控網路中具有相當的難度。

利用基因功能分類分析 (gene ontology analysis) 探討核心韌性基因的主要功能類別，結果如 (圖七)。在分子功能 (molecular function) 方面，蛋白質結合 (protein binding, 19.6%) 和DNA結合 (DNA binding, 18.3%) 是最主要的功能類別，顯示大部分核心韌性基因主要利用蛋白質-蛋白質交互作用和轉錄調控來發揮功用。在細胞組成 (cellular component) 方面，細胞核 (nucleus, 17.06%) 為最主要發生的胞器，這與這些基因在轉錄調控中的作用一致；而葉綠體 (chloroplast, 15.29%) 和類囊體 (thylakoid, 12.35%) 次

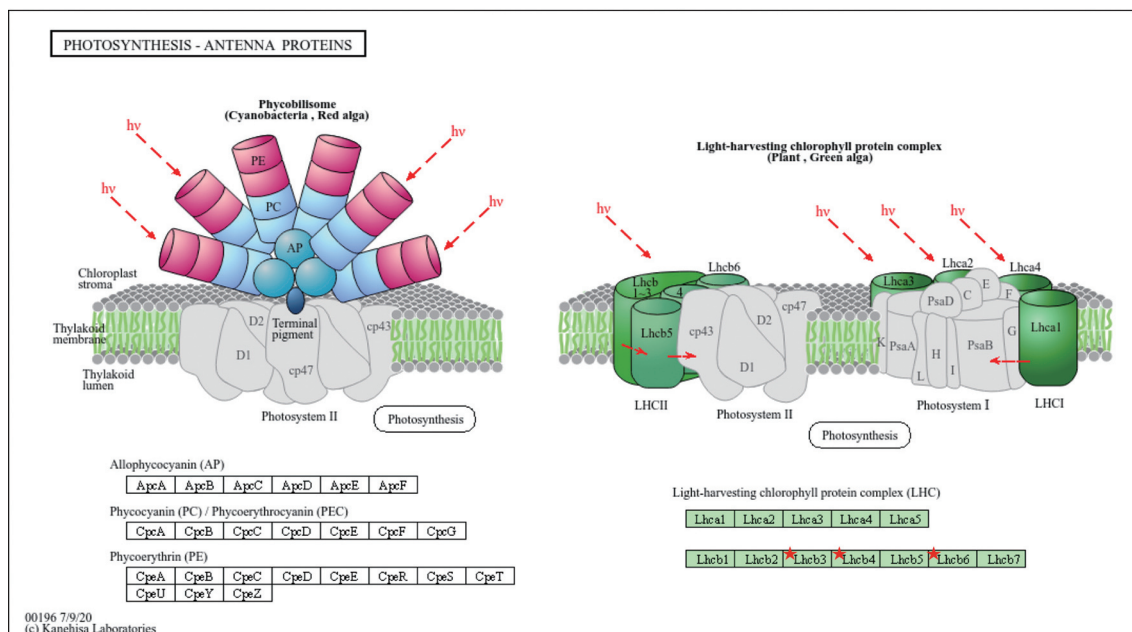
之，這些基因可能在光合作用和能量代謝中發揮重要的功用。在生物進程 (biological process) 方面，對化學物質的反應 (response to chemical, 10.09%) 和其他細胞進程 (other cellular processes, 14.59%) 是最主要的類別，這些基因的表現與植物反應環境變化和調節代謝方面可能具有相當的重要性。

利用KEGG路徑分析進一步探討這些核心韌性基因在代謝與生物相關的反應路徑中之角色。在光合作用路徑中的天線蛋白系統中 (圖八)，部分核心韌性基因與光系統II的光捕捉複合物 (light-harvesting chlorophyll protein complex, LHC) 有關，分別為 Lhcb3 (*AT5G54270*)、Lhcb4 (*AT3G08940*) 及 Lhcb6 (*AT1G15820*)。BM103 可能通過調節光合作用效率來增強植物對環境逆境的韌性。在植物荷爾蒙訊號傳遞路徑中 (圖九)，核心韌性基因主要與吉貝素 (*AT2G43010*)，編碼 TF



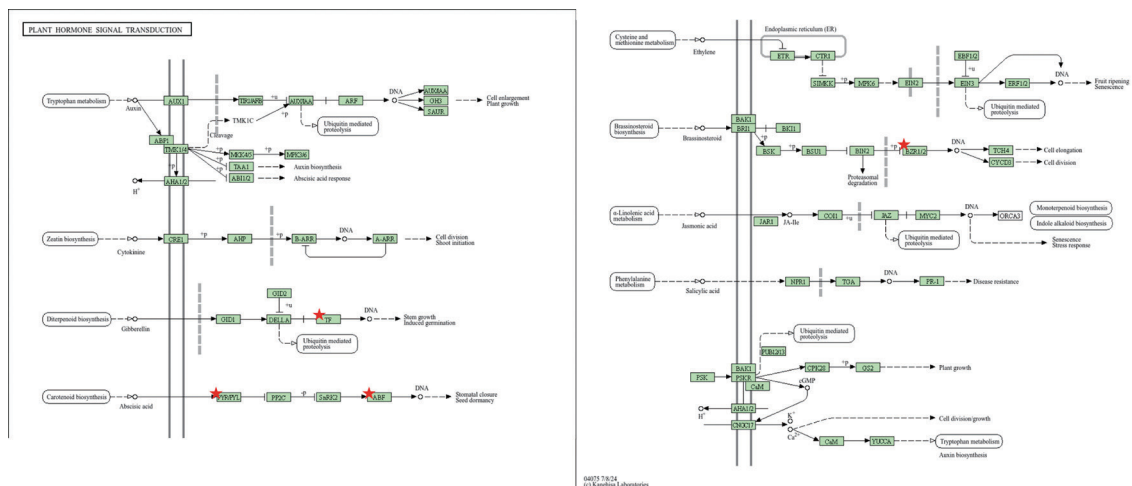
圖七、核心韌性基因的基因功能分類分析。

利用gene ontology (GO) 資料庫分析核心韌性基因的功能性，針對三個主要的GO類別，分別為分子功能 (Molecular Function，左上)、細胞組成 (Cellular Component，左下) 及生物進程 (Biological Process，右)，每個類別以圓餅圖顯示，右方欄目為不同功能類別的比例與原始資料。



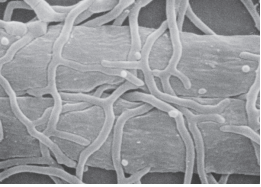
圖八、光合作用天線蛋白系統中核心韌性基因的分布。

利用KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 分析顯示核心韌性基因在光合作用中的天線蛋白質系統中的角色 (以紅色星號表示)，該些基因的功能和光捕捉複合物 (light harvesting chlorophyll-protein complex, LHC) 有關。



圖九、植物荷爾蒙訊號傳遞路徑中核心韌性基因的分布。

利用KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 分析顯示核心韌性基因在植物荷爾蒙訊號傳遞路徑中的角色 (以紅色星號表示)，其中，Tryptophan metabolism (色胺酸代謝) 和生長素 (Auxin) 的生合成有關；Zeaxin biosynthesis (玉米素生合成) 和細胞分裂素(Cytokinin, CK) 的生合成有關；Diterpenoid biosynthesis (二萜類生合成) 和吉貝素 (Gibberellin, GA) 的生合成有關；Carotenoid biosynthesis (類胡蘿蔔素生合成) 和離層酸 (Abscisic acid, ABA) 的生合成有關；Cysteine and methionine metabolism (半胱氨酸和甲硫氨酸代謝) 和乙烯 (Ethylene) 的生合成有關；Brassinosteroid biosynthesis 為油菜固醇 (Brassinosteroid, BRS) 生合成；α-Linolenic acid metabolism (α-次亞麻油酸代謝) 和茉莉酸 (Jasmonic acid, JA) 的生合成有關；而Phenylalanine metabolism (苯丙氨酸代謝) 和水楊酸 (Salicylic acid, SA) 的生合成有關。



轉錄因子)、離層酸 (*AT2G36270* (編碼 PYR/PYL 受體蛋白) 和 *AT4G17870* (編碼 ABF 轉錄因子) 及油菜固醇 (*AT1G19350*, 編碼 BZR1/2 轉錄因子) 的訊號傳遞路徑有關 (該些基因表現情形如圖六紅線標示處), 推論 BM103 可能通過調節多種植物荷爾蒙的平衡來影響植物的生長發育和逆境反應。

### 討 論

本研究探討蕈狀芽孢桿菌 (*B. mycooides*, BM103) 對阿拉伯芥在非生物逆境下的影響, 並透過加權基因共表現網絡分析 (WGCNA) 深入探討其分子機制。研究結果顯示, BM103 不僅能促進阿拉伯芥在正常條件下的生長發育, 而在高溫和乾旱逆境下也具有提升植株韌性的能力, 特別是在種子發育的能力上, 另外在轉錄基因體的研究中, 本研究結果也顯示 BM103 具有調節阿拉伯芥轉錄基因體表現的能力, 在後續的分析中也發現數個可能與植物韌性相關的核心基因, 未來該些基因或許可應用於探索具有提升作物逆境韌性能力的微生物或新穎材料上。

種子處理 BM103 後能顯著促進阿拉伯芥的種子發育, 特別是在莖基部與根毛的發育上, 同時本研究的幼苗生長結果中也進一步證實 BM103 的效果不僅只在根系發育上, 地上部的生長參數中也顯示 BM103 能夠提升葉片的數量。目前有許多針對芽孢桿菌屬的根圈微生物來提升植物逆境韌性能力的研究, 如: 由竹子根系分離的 *B. mycooides* A3 菌株具有改變根系結構 (側根數和根毛數) 的能力, 並且能夠增強植物對非生物逆境 (高溫和乾旱) 的適應能力 (Kurniawan & Chuang, 2022); *B. subtilis* 處理能顯著增加阿拉伯芥在乾旱條件下的生物量 (Woo *et al.*, 2020)。本研究中的 BM103 同樣也具有類似的特性, 也因此推論 BM103 可以提升植物對高溫或乾旱逆

境的韌性。

為更進一步了解 BM103 在提升植物逆境韌性能力的作用機制, 本研究首次利用加權基因共表現網絡分析 (WGCNA) 探討 BM103 對阿拉伯芥轉錄體在逆境下的影響。最終分類出 7 個基因表現模組, 其中 4 個基因模組與阿拉伯芥的根部發育性狀高度相關 (MEblack 和根毛平均長度、MEbrown 和根毛密度與根長、MEpink 和根長與下胚軸及根毛密度、MEsalmon 和莖基部), 而阿拉伯芥種子根部發育的性狀與逆境韌性具相關性, 也因此這 4 個基因模組可能與提升阿拉伯芥逆境韌性具高度關聯; 這種系統性的分析方法可以協助了解 BM103 如何調控植物生長和逆境反應, 藉著網絡相關的分析更能夠全面的理解微生物是如何調節植物的各種反應, 在本研究中也利用 WGCNA 獲取我們所想知道的分子機制以及與韌性相關的生物標記。利用 WGCNA 可以協助獲取重要的基因調控網絡並且找出重要的調控機制, 比較 *Chorispora bungeana* (高山離子芥, 為一種耐寒植物) 和阿拉伯芥轉錄基因體的耐冷機制的研究中, 利用 WGCNA 分析找出低溫逆境中植物的澱粉轉換是重要的關鍵 (Zhao *et al.*, 2023)。而在我們的研究中, 已利用此分析平台找出微生物調控植物逆境韌性相關的基因模組, 未來將可以進一步探討相關的作用機制。

通過整合 WGCNA 和轉錄因子富集分析, 本研究最終選出 45 個核心韌性基因。這些基因與多個重要的生物進程相關, 包括光合作用和植物荷爾蒙訊號。在這之中, 部分核心韌性基因與光系統 II 的光捕捉複合物 (LHCII) 的功能有關, 顯示 BM103 可能可以調節光合作用效率來增強植物的環境適應能力, 同時在基因功能性分析中也發現, 約有 15 % 的基因與葉綠體相關, 顯示微生物提升植物逆境韌性與光合作用具高度相關。

在芥菜重金屬逆境的研究裡，使用常見的有益微生物 *P. putida* 和 *P. fluorescens* 對芥菜光合作用系統具有顯著的保護效果 (Bhardwaj *et al.*, 2024)；處理內生菌的阿拉伯芥在鹽分逆境下具有提升葉綠素螢光的能力 (Fan *et al.*, 2020)。以上成果都與本研究結果相似，顯示微生物在提升植物逆境韌性能力時，提升光合作用的效力或許為相當重要的關鍵因子。

在植物荷爾蒙訊號傳遞路徑中，核心韌性基因主要與吉貝素 (Gibberellin, GA)、離層酸 (Abscisic acid, ABA) 及油菜固醇 (Brassinosteroid, BRS) 的訊號傳遞路徑有關。吉貝素可以促進植物的細胞生長與分裂，而離層酸則是會抑制吉貝素的作用，本研究結果顯示吉貝素相關基因 *AT2G43010* 和離層酸相關基因 *AT4G17870* 在轉錄基因體的表現上，於不同生長條件下互為相反的調節，但另一個與離層酸相關基因 *AT2G36270* 則是在各種生長條件下卻因處理 BM103 而降低表現，*AT2G36270* 編碼的蛋白為轉錄因子 ABI5 (ABA-insensitive 5)，前人研究曾報導突變株 *ABI5* 可提升阿拉伯芥對高鹽和高硝酸鹽逆境的韌性 (Le *et al.*, 2023)，因此推測 BM103 可以抑制阿拉伯芥 *ABI5* 的表現，並且提高阿拉伯芥的逆境韌性。油菜固醇具有促進植物生長與成熟的作用，會與細胞分裂素和吉貝素加成擴大影響並促進生長，在本研究中的油菜固醇相關基因 *AT1G19350* 在正常生長與高溫逆境皆有提高表現的現象，*AT1G19350* 編碼的蛋白為轉錄因子 BES1 (BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1)，BES1 可以調控油菜固醇對阿拉伯芥根系結構的影響 (Al-Mamun *et al.*, 2024)，而在本研究中得知 *BES1* 表現量的提高可能與提升阿拉伯芥對高溫逆境之韌性。另外，本研究結果也發現不同荷爾蒙路徑在對不同逆境下的反應也會有所不同，顯示微生物對植物韌性調節的複雜

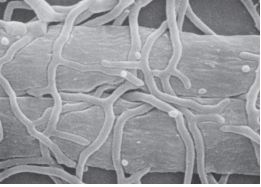
性。

本研究目的為完整探討有益微生物對植物逆境韌性的影響，然而在研究中仍存在一些侷限。首先，本研究僅針對單一菌株 BM103 進行分析，這可能無法全面代表其他同屬或相似的有益微生物所造成的效果。每種微生物都有其獨特的基因組成和代謝特性，因此它們與植物的交互作用可能存在差異。不同的有益微生物可透過不同的機制來促進植物生長和提高逆境韌性 (Etesami & Maheshwari, 2018)。因此，增加分析的菌種數量是提升本研究的準確性和適用性的重要方向之一。

其次，雖然轉錄體分析為我們提供了豐富的資訊，但這些基因表現變化是否確實轉化為功能性的蛋白質，以及它們如何具體影響植物的生理過程，還需要更多的研究來驗證。然而本研究的目標為開發新型的植物保護策略，也因此利用研究所得之 45 個核心韌性基因或可成為重要的生物標記。基於這些韌性基因可開發快速篩選平台，以便更有效率地辨識與判別具有提升植物韌性潛力的微生物或新穎材料，期望能夠加速開發這些有益微生物與新穎材料的流程。

## 誌謝

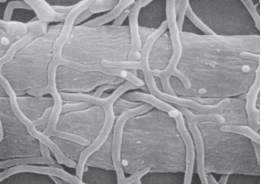
本研究承蒙農業部臺中區農業改良場「微生物提升作物耐逆境能力之平臺測試」專案計畫二「微生物誘導作物相關耐逆境調控基因之篩選平臺測試工作」與國科會計畫 (NSTC-112-2313-B-005-008-) 的經費贊助，特此致謝。同時，感謝國立中興大學植物病理學系黃振文教授慷慨提供蕈狀芽孢桿菌 BM103 菌株，對本研究的順利開展至關重要。另外，亦感謝研究室全體同仁在研究過程中的協助與支持，以及所有在學術討論中給予寶貴意見的專家學者們。



## 參考文獻

1. 江嘉容。2011。椽果炭疽病的生物防治菌鑑定與其防病之雛形醱酵營養配方設計。國立中興大學植物病理學系碩士論文。76頁。
2. 高郁秀。2013。萵苣黑斑病菌之鑑定及其微生物防治試驗。國立中興大學植物病理學系碩士論文。84頁。
3. 陳冠霖。2017。臺灣草莓萎凋病之病原菌鑑定與其生物防治試驗。國立中興大學植物病理學系碩士論文。67頁。
4. 彭玉湘、黃振文。2019。蕈狀芽孢桿菌植物保護製劑。出自「環境友善之植醫保健秘籍」，頁45-54。五南圖書出版股份有限公司。
5. 黃振文。2019。保護植物健康的益生菌－蕈狀芽孢桿菌。臺灣研究亮點：生命科學(網頁)。 <https://trh.gase.most.ntnu.edu.tw/tw/article/content/203>。
6. 農業部。2023。112年2-3月乾旱農業災情報告(農業部全球資訊網)。 [https://www.moa.gov.tw/theme\\_data.php?theme=news&sub\\_theme=agri&id=8991](https://www.moa.gov.tw/theme_data.php?theme=news&sub_theme=agri&id=8991)。
7. Abdel Latef, A. A. H., Chaoxing, H. 2014. Does inoculation with *Glomus mosseae* improve salt tolerance in pepper plants? *J. Plant Growth Regul.* 33, 644-653. doi:10.1007/s00344-014-9414-4
8. Al-Mamun, M. H., Cazzonelli, C. I., Krishna, P. 2024. BZR1 and BES1 transcription factors mediate brassinosteroid control over root system architecture in response to nitrogen availability. *Front. Plant Sci.* 15, 1387321. doi:10.3389/fpls.2024.1387321
9. Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., Sherlock, G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25, 25-29. doi:10.1038/75556
10. Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S. H., Strem, M. D., Melnick, R. L., Bailey, B. A. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *J. Exp. Bot.* 60, 3279-3295. doi:10.1093/jxb/erp165
11. Barnawal, D., Bharti, N., Maji, D., Chanotiya, C. S., Kalra, A. 2012. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. *Plant Physiol. Biochem.* 58, 227-235. doi:10.1016/j.plaphy.2012.07.008
12. Bhardwaj, T., Kour, J., Chouhan, R., Devi, K., Singh, H., Gandhi, S. G., Ohri, P., Bhardwaj, R., Alsahli, A. A., Ahmad, P. 2024. Integrated transcriptomic and physiological studies unveil the melatonin and PGPR induced protection to photosynthetic attributes in *Brassica juncea* L. under cadmium toxicity. *J. Hazard Mater.* 476, 134875. doi:10.1016/j.jhazmat.2024.134875
13. Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170

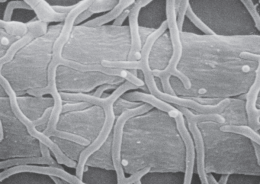
14. Chang, T. H. 2022. Arabidopsis seeds priming. doi:10.17504/protocols.io.kqdg394z1g25/v1
15. Coppola, M., Diretto, G., Digilio, M. C., Woo, S. L., Giuliano, G., Molisso, D., Pennacchio, F., Lorito, M., Rao, R. 2019. Transcriptome and metabolome reprogramming in tomato plants by *Trichoderma harzianum* strain T22 primes and enhances defense responses against aphids. *Front. Physiol.* 10, 745. doi:10.3389/fphys.2019.00745
16. Drogue, B., Sanguin, H., Chamam, A., Mozar, M., Llauro, C., Panaud, O., Prigent-Combaret, C., Picault, N., Wisniewski-Dyé, F. 2014. Plant root transcriptome profiling reveals a strain-dependent response during *Azospirillum*-rice cooperation. *Front. Plant Sci.* 5, 607. doi:10.3389/fpls.2014.00607
17. Etesami, H., Maheshwari, D. K. 2018. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156, 225-246. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.03.013
18. Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., Käller, M. 2016. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32, 3047-3048. doi:10.1093/bioinformatics/btw354
19. Fan, D., Subramanian, S., Smith, D. L. 2020. Plant endophytes promote growth and alleviate salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* 10, 12740. doi:10.1038/s41598-020-69713-5
20. Gu, Z. 2022. Complex heatmap visualization. *iMeta* 1:e43. doi:10.1002/imt2.43
21. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). 2023. Climate Change 2022 – Impacts, Adaptation and Vulnerability: Working Group II Contribution to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, 1st ed. Cambridge University Press. doi:10.1017/9781009325844
22. Jochum, M. D., McWilliams, K. L., Borrego, E. J., Kolomiets, M. V., Niu, G., Pierson, E. A., Jo, Y. K. 2019. Bioprospecting plant growth-promoting rhizobacteria that mitigate drought stress in grasses. *Front. Microbiol.* 10, 2106. doi:10.3389/fmicb.2019.02106
23. Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Nakaya, A. 2002. The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acid Res.* 30, 42-46. doi:10.1093/nar/30.1.42
24. Kim, D., Langmead, B., Salzberg, S. L. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods* 12, 357-360. doi:10.1038/nmeth.3317
25. Kurniawan, A., Chuang, H. 2022. Rhizobacterial *Bacillus mycoides* functions in stimulating the antioxidant defence system and multiple phytohormone signalling pathways to regulate plant growth and stress tolerance. *J. Appl. Microbiol.* 132, 1260-1274. doi:10.1111/jam.15252
26. Langfelder, P., Horvath, S. 2008. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinform.* 9, 559. doi:10.1186/1471-2105-9-559
27. Le, Q. T., Truong, H. A., Nguyen, D. T., Yang, S., Xiong, L., Lee, H. 2023. Enhanced growth performance of abi5 plants under high salt and nitrate is



- associated with reduced nitric oxide levels. *J. Plant Physiol.* 286, 154000. doi:10.1016/j.jplph.2023.154000
28. Liu, S., Hao, H., Lu, X., Zhao, X., Wang, Y., Zhang, Y., Xie, Z., Wang, R. 2017. Transcriptome profiling of genes involved in induced systemic salt tolerance conferred by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* 7:10795. doi:10.1038/s41598-017-11308-8
29. Love, M. I., Huber, W., Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
30. Nadeem, S. M., Zahir, Z. A., Naveed, M., Arshad, M. 2009. Rhizobacteria containing ACC-deaminase confer salt tolerance in maize grown on salt-affected fields. *Can. J. Microbiol.* 55, 1302-1309. doi:10.1139/W09-092
31. Palaniyandi, S. A., Damodharan, K., Yang, S. H., Suh, J. W. 2014. *Streptomyces* sp. strain PGPA39 alleviates salt stress and promotes growth of 'Micro Tom' tomato plants. *J. Appl. Microbiol.* 117, 766-773. doi:10.1111/jam.12563
32. R Core Team. 2021. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
33. Rauf, M., Awais, M., Ud-Din, A., Ali, K., Gul, H., Rahman, M. M., Hamayun, M., Arif, M. 2021. Molecular mechanisms of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase producing *Trichoderma asperellum* MAP1 in enhancing wheat tolerance to waterlogging stress. *Front. Plant Sci.* 11, 614971. doi:10.3389/fpls.2020.614971
34. Rubin, J. D., Stanley, J. T., Sigauke, R. F., Levandowski, C. B., Maas, Z. L., Westfall, J., Taatjes, D. J., Dowell, R. D. 2021. Transcription factor enrichment analysis (TFEA) quantifies the activity of multiple transcription factors from a single experiment. *Commun. Biol.* 4, 1-15. doi:10.1038/s42003-021-02153-7
35. Sansinenea, E. 2019. *Bacillus* spp.: as plant Growth-promoting bacteria, In: Secondary Metabolites of Plant Growth Promoting Rhizomicroorganisms: Discovery and Applications. eds. Singh H. B., Keswani C., Reddy M. S., E. Sansinenea, and C. García-Estrada, pp. 225-237 Singapore: Springer. doi:10.1007/978-981-13-5862-3\_11
36. Saravanakumar, D., Samiyappan, R. 2007. ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1283-1292. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03179.x
37. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
38. Shah, A., Nazari, M., Antar, M., Msimbira, L. A., Naamala, J., Lyu, D., Rabileh, M., Zajonc, J., Smith, D. L. 2021. PGPR in agriculture: a sustainable approach to increasing climate



- change resilience. *Front. Sustain. Food S* 5, 667546. doi:10.3389/fsufs.2021.667546
39. Shim, S., Seo, P. J. 2020. EAT-UpTF: Enrichment analysis tool for upstream transcription factors of a group of plant genes. *Front. Genet.* 11, 566569. doi:10.3389/fgene.2020.566569
40. Silva-Correia, J., Freitas, S., Tavares, R. M., Lino-Neto, T., Azevedo, H. 2014. Phenotypic analysis of the *Arabidopsis* heat stress response during germination and early seedling development. *Plant Methods* 10, 7. doi:10.1186/1746-4811-10-7
41. Straffelini, E., Tarolli, P. 2023. Climate change-induced aridity is affecting agriculture in Northeast Italy. *Agric. Syst.* 208, 103647. doi:10.1016/j.agsy.2023.103647
42. Sun, Y., Huang, B., Cheng, P., Li, C., Chen, Y., Li, Y., Zheng, L., Xing, J., Dong, Z., Yu, G. 2022. Endophytic *Bacillus subtilis* TR21 improves banana plant resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and promotes root growth by upregulating the jasmonate and brassinosteroid biosynthesis pathways. *Phytopathology* 112, 219-231. doi:10.1094/PHYTO-04-21-0159-R
43. Tian, F., Yang, D. C., Meng, Y. Q., Jin, J., Gao, G. 2020. PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. *Nucleic Acid Res.* 48:D1104–D1113. doi:10.1093/nar/gkz1020
44. Veiga, R. S. L., Faccio, A., Genre, A., Pieterse, C. M. J., Bonfante, P., van der Heijden, M. G. A. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi reduce growth and infect roots of the non-host plant *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 36, 1926-1937. doi:10.1111/pce.12102
45. Wickham, H. 2016. ggplot2, Use R! Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-24277-4
46. Woo, O. G., Kim, H., Kim, J. S., Keum, H. L., Lee, K. C., Sul, W. J., Lee, J. H. 2020. *Bacillus subtilis* strain GOT9 confers enhanced tolerance to drought and salt stresses in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica campestris*. *Plant Physiol. Biochem.* 148, 359-367. doi:10.1016/j.plaphy.2020.01.032
47. Zandalinas, S. I., Fritschi, F. B., Mittler, R. 2021. Global warming, climate change, and environmental pollution: recipe for a multifactorial stress combination disaster. *Trends Plant Sci., Special Issue: Feeding the World: The Future of Plant Breeding* 26, 588-599. doi:10.1016/j.tplants.2021.02.011
48. Zhao, S., Ou, X., Zhang, Y., Wei, Y., Yue, X., Zhao, Z. 2023. Over-activation of cold tolerance in *Arabidopsis* causes carbohydrate shortage compared with *Chorispora bungeana*. *J. Plant Physiol.* 289, 154083. doi:10.1016/j.jplph.2023.154083



# Impact of *Bacillus mycooides* BM103 on *Arabidopsis thaliana* Resilience Transcriptome Using Weighted Gene Co-expression Network Analysis

Tao-Ho Chang<sup>1</sup>, Pi-Fang Linda Chang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Assistant Professor, Program in Plant Health Care, Academy of Circular Economy, National Chung Hsing University, Nantou, Taiwan, ROC.

<sup>2</sup> Professor, Department of Plant Pathology/Program in Plant Health Care, Academy of Circular Economy, National Chung Hsing University, Taichung Taiwan, ROC.

\* Corresponding author, e-mail: pfchang@nchu.edu.tw

## ABSTRACT

In the context of global climate change, it is essential to prioritize enhancing crop resilience to abiotic stresses in agricultural research. This study employed weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) to examine the transcriptomic effects of *Bacillus mycooides* BM103 on the model plant *Arabidopsis thaliana* under various stress conditions. The research delved into the impact of BM103 on root and seedling development in *Arabidopsis* under different stress factors, such as high temperature and drought. The results demonstrated that the treatment with BM103 significantly improved root development traits under stresses, indicating its efficacy in enhancing *Arabidopsis* resilience. In addition, 18 groups of *Arabidopsis*-BM103-Stress (including high temperature and drought) transcriptome data were analyzed to understand the effect of BM103 on *Arabidopsis* resilience. Our study identified seven gene expression modules using WGCNA, with four of them showing a high correlation with *Arabidopsis* root development phenotypes. Subsequent transcription factor enrichment analysis (TFEA) pinpointed several transcription factors related to these modules, identifying 45 highly correlated resilience genes. Gene ontology (GO) and KEGG pathway analyses of these genes revealed their involvement in processes, such as photosynthesis, stress signal responses, hormone signal transduction, and protein post-modification. Our findings indicated that BM103 can enhance *Arabidopsis* resilience, and the transcriptome results suggested that this enhancement involves multiple factors rather than a single one. In the future, analyses of plant resilience enhancement should consider multiple resilience gene expressions as biomarkers for an accurate efficacy assessment.

**Keywords:** Abiotic stress, Gene ontology analysis, KEGG pathway analysis, Transcription factor enrichment analysis