DOI: 10.20103/j.stxb.202207111977

王浩臣,蔡雨皓,谭静怡,王梓源,谭惠文,李凯航,程可心,杨艳,金一,何晓青.拟南芥与叶际微生物组的互作遗传机制——基于网络作图理论. 生态学报,2023,43(19):8011-8024.

Wang H C, Cai Y H, Tan J Y, Wang Z Y, Tan H W, Li K H, Cheng K X, Yang Y, Jin Y, He X Q.Genetic mechanism of interaction between *Arabidopsis thaliana* and the phyllosphere microbiome by network mapping. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(19):8011-8024.

拟南芥与叶际微生物组的互作遗传机制

—基于网络作图理论

王浩臣,蔡雨皓,谭静怡,王梓源,谭惠文,李凯航,程可心,杨 艳,金 一, 何晓青*

北京林业大学生物科学与技术学院,北京 100083

摘要:叶际微生物组对植物的生长发育至关重要,但植物与其定殖微生物组相互作用机制尚不明确。目前植物与微生物互作研究多集中于根际微生物组,对叶际微生物组的研究较少,且这些研究未能从微生物互作的角度探究植物与微生物的相互作用机理。基于网络作图理论,将拟南芥基因组 SNP(Single Nucleotide Polymorphisms)分子标记数据与微生物组网络特征值相关联,挖掘影响叶际微生物组网络结构的枢纽基因,以探究拟南芥塑造叶际微生物组网络结构的遗传机制。通过对 188 株拟南芥及其叶际微生物组数据的分析,识别出四种关系下的中心节点微生物,筛选到 622 个显著 SNP 位点。进一步构建了贝叶斯遗传网络,获得 26 个枢纽基因,这些基因可能参与了植物抗病、激素分泌和生长发育相关的分子途径。本研究从全基因组角度探究植物调控自身微生物组的遗传机制,揭示植物与微生物组如何互作促进植物健康,将为精准分子育种提供理论基础和遗传资源,并为合成菌群用于创制新型菌剂提供数据支持,具有重要的科学意义和应用价值。 关键词:拟南芥:叶际微生物组;互作机制;全基因组关联分析;网络作图

大键词:拟闱介;叮际阀生物组;互作机制;至基固组大块分析;网络作图

Genetic mechanism of interaction between *Arabidopsis thaliana* and the phyllosphere microbiome by network mapping

WANG Haochen, CAI Yuhao, TAN Jingyi, WANG Ziyuan, TAN Huiwen, LI Kaihang, CHENG Kexin, YANG Yan, JIN Yi, HE Xiaoqing*

College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: The phyllosphere microbiome is critical for plant growth and development, but the mechanism by which plants interact with their colonizing microbiome remains elusive. At present, most studies on the interaction between plants and microorganisms focus on the rhizosphere microbiome rather than those of phyllosphere. Moreover, these studies failed to disentangle the mechanism of plant-microbe interactions from the perspective of microbial interaction. In this study, based on the network mapping theory, we correlated the *Arabidopsis thaliana* genome SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) molecular marker data with the microbiome network indices, mined the pivot genes that affected the phyllosphere microbiome network structure to explore the genetic mechanisms how *A. thaliana* shaped the network structure of phyllosphere microbiome. We analyzed 188 *A.thaliana* and their phyllosphere microbiome data, identified the hub microbes under four relationships, and screened 622 significant SNP loci. By Bayesian genetic network, 26 hub genes were

收稿日期:2022-07-11; 网络出版日期:2023-05-15

基金项目:国家自然科学基金(31971398);北京林业大学大学生创新计划(S202110022045,S202210022047,X202210022062)

^{*} 通讯作者 Corresponding author.E-mail: lenahe@ bjfu.edu.cn

excavated, which involved in molecular pathways related to plant disease resistance, hormone secretion, and growth and development. This study explored the genetic mechanism of plant regulation of its own microbiome from a genome-wide perspective and revealed how plants and microbiome interacted to promote plant health. It will provide theoretical basis and genetic resources for precision molecular breeding, and support the use of synthetic communities to create new bacterial agents, containing important scientific significance and application value.

Key Words: Arabidopsis thaliana; phyllosphere microbiome; interaction mechanism; genome-wide association study; network mapping

与人类肠道中的微生物组类似,植物微生物组对植物的生长和健康发挥重要作用,被看作是植物的第二 基因组或延伸基因组^[1]。在植物地上与地下部分均共生着大量的微生物,其对植物的性状具有重要调控作 用^[2-3]。与宿主植物关系密切的微生物组编码了比宿主多 10—100 倍的功能基因,赋予植物宿主健康优势, 包括增强养分吸收、促进植物发育、提高耐受逆境和抵抗病原体的能力^[4-5]。植物可以招募有益微生物来增 强对病原体的抵抗力^[6],某些作物可以依靠微生物组的特定成员来进行胁迫保护^[7]和提高产量^[8]。这些与 特定微生物相互作用而产生的表型,对未来改善作物生长状况具有重要参考意义。植物与微生物组的互作及 其机制,是生命科学研究关注的前沿和热点,也是微生物高效利用的关键问题。近年来,植物微生物组研究取 得了巨大进展,但植物-微生物组互作的遗传机制及其在植物优良性状形成中的作用还未阐明。

叶际微生物组是定殖在植物地上部分,包括细菌、真菌、原生生物等在内的复杂微生物群落^[9]。与根际 微生物组组类似,叶际微生物组可以通过分泌植物激素促进植物营养循环,或通过诱导抗性系统来保护植物 免受病原体侵害^[10]。叶际微生物组与宿主植物微生态失衡会导致植物发病或死亡^[11-12]。因此,解析叶际微 生物组与植物的相互作用机制对改善和调节植物的生理状况非常关键^[13]。然而,与根际微生物组的研究相 比,叶际微生物组与植物互作机制尚不清晰^[14]。已有研究表明,植物基因可以调控其叶际微生物组网 络^[10,15]。在一项茶树的研究中发现,植物可以通过不同发育阶段特定基因的表达代谢物来驱动叶际微生物 群落的组装^[6]。这些由基因调控微生物群落结构的改变,有利于植物应对病害等不良环境^[2]。但是,植物与 叶际微生物组相互作用遗传机制及其对植物的重要功能仍需要进一步探究^[16-17]。

随着高通量测序的发展,对微生物组和植物基因的大规模数据量处理成为可能^[18-19]。已有学者应用传统 GWAS(Genome-wide association study)方法来研究植物基因型与微生物组之间的关系,但这些关联分析中使用的表型数据并未考虑微生物组内的复杂互作关系,尚未阐明植物基因如何参与组装和影响整个微生物组网络,还未揭示微生物组如何与植物协同互作以促进植物表型性状的形成^[20-21]。本研究团队整合行为生态学与基因作图理论,利用数学模型将微生物的竞争与合作系统分解为攻击(aggression)、利他(altruism)、拮抗(antagonism)和互利共生(mutualism)网络,将网络嵌入到基因定位的框架,构建了网络作图模型(network mapping),并能量化微生物组的互作网络^[22-23]。在之前的研究中,He 等和 Jiang 等已分别将网络特征值作为拓展表型,将网络作图分别应用于植物与根系微生物组以及人体与肠道微生物组的关联分析研究之中,揭示了宿主与微生物组的互作遗传机制^[22, 24]。

在本研究中,我们采用网络作图方法,对拟南芥与叶际微生物组的相互作用进行深入探究。通过分析 188 株不同基因型拟南芥和其叶际微生物组的数据^[25],基于网络作图,我们拟量化叶际微生物组的网络特征,识别叶际微生物组中的中心节点微生物(hub microbes),并将网络特征值与拟南芥基因型数据进行关联, 挖掘拟南芥参与组装自身叶际微生物组的候选基因,探究植物与叶际微生物组之间的互作遗传机制。

1 研究方法

1.1 材料数据来源

Regalado 等对拟南芥的叶际微生物组进行了扩增子测序^[25]。这项研究中包括了 188 株不同基因型拟南

芥材料的叶际细菌和真菌 OTU 丰度数据以及拟南芥重测序获得的 SNP 数据。利用 plink 对 SNP 缺失率高于 2%的个体、最小等位基因频率(MAF)小于 5%的 SNP 位点进行过滤,并进行哈迪-温伯格检验,最后筛选到共 97379 个 SNP 分子标记进行下一步分析。

1.2 构建叶际微生物组共现网络

1.2.1 互作关系的数学描述

我们利用如下微生物行为网络模型构建微生物互作网络^[24]。该模型对微生物的攻击、利他、拮抗和互利 共生进行了数学描述,即:

$$Z_{\rm ag} = \frac{x_u}{x_v} \qquad Z_{\rm al} = 1 - \frac{x_v}{x_u} \qquad Z_{\rm an} = \frac{1}{(x_u x_v)(x_u - x_v)} \qquad Z_{\rm mu} = \frac{x_u x_v}{x_u - x_v}$$

式中, Z_{ag} 、 Z_{al} 、 Z_{an} 、 Z_{mu} 分别表示在叶际微生物群组中两种微生物之间攻击、利他、拮抗和互利共生的相互作用。 x_u 和 x_v 分别代表u和v两种微生物的相对丰度($x_u > x_v, u \neq v$)。选择了相对丰度最高的 200 个细菌 OTU 和 200 个真菌 OTU,并将其相对丰度代入四种公式,计算两种微生物之间的互作强度大小。

1.2.2 叶际微生物组共现网络的构建

微生物之间相互作用关系被量化为相互作用矩阵。对矩阵进行均一化,以控制[0,1]内的交互关系值范围。此外,对攻击、利他、拮抗、互利共生网络的阈值进行过滤,阈值为0.99,以获得微生物相互作用的稀疏矩阵。在每个网络中,保留了高于阈值的相互作用数值,并利用 Gephi(https://gephi.org/)可视化微生物行为互作网络。

1.3 计算网络拓扑特征值和筛选中心节点微生物

分别对攻击、利他、拮抗和互利共生四种关系构建了网络,并利用 R 语言"igraph"包计算了每个网络的 6 种网络拓扑特征值用以描述共现网络特征,包括连通性(Connectivity,Con)、接近中心度(Closeness,C(u))、中 介中心度(Betweenness,B(u))、Eccentricity(E(u))、Eigenvector(G(u))和 PageRank(P(u))^[24]。每一个网络的网络拓扑特征值通过 R 软件"pheatmap"程序包(https://CRAN.R\project.org/package = pheatmap)进行可 视化。

中心节点微生物是在微生物网络中高度连接的、对群落结构和功能中起重要作用且不因丰度和时空变化 而改变的物种^[26]。中心节点微生物在微生物组中高度相连,它们负责微生物组的结构并维持群落的动态。 在四种共现网络图中,一个节点代表一种微生物(OTU)。在微生物共现网络中,度中心性(Degree centrality) 和接近中心性两个网络特征值数值高的 OTU 被确定为中心节点微生物^[1]。

1.4 基于网络作图的关联分析

为了进一步探究拟南芥基因对叶际微生物组的影响,将上述计算得到的6种网络拓扑特征值作为表型数据,拟南芥的 SNP 数据作为基因型数据,利用以下线性回归模型分别将拟南芥的6种表型数据与基因型数据进 行关联分析,其中,y_i代表第*i* 株拟南芥的表型数据,*u* 代表所有拟南芥表型数据的均值,*x_i*代表第*i* 个拟南芥基因 型的指示变量,每个 SNP 可能为 AA(编码为2)、Aa(编码为1)和 aa(编码为0)三种基因型,β 代表回归系数,*e_i* 代表随机误差值。通过该模型我们可以评估单个 SNP 对于拟南芥叶际微生物组共现网络特征的影响。

$$y_i = \mu + \sum_{j=1}^2 x_j \beta + e_i$$

为了排除群体结构(Q)和亲缘关系(K)对全基因组关联分析结果的影响,减少假阳性的出现,通过引入一般线性模型(GLM)和混合线性模型(MLM)来矫正 Q 和 K 的影响。Q 矩阵和 K 矩阵分别用 Admixture 和 EMMAX 获得^[27]。用不考虑 Q 和 K 的 LM、GLM 和 MLM 三种模型分别计算出 SNP 位点对应的 P 值,利用 P 值在 R 中计算三个模型的膨胀系数,选择膨胀系数绝对值最接近 1 的模型来进行关联分析。利用 plink 筛选显著 SNP 两侧约 10kb 窗口内的候选 SNP,保留 R²>0.8 的 SNP 位点作为候补 SNP 位点。

1.5 基于贝叶斯的 QTL 网络构建

本研究在关联分析获得的显著分子标记基础上结合贝叶斯网络分析重新构建基因上位性互作网络,定位

影响叶际微生物组共现网络的枢纽基因。在显著 SNP 位点上,计算每种基因型对应的网络特征值的平均值, 并将平均值重新赋予每个拟南芥个体作为新的表型数据,利用 R 软件"bnlearn"程序包计算 QTL 与 QTL 之间 的相互作用,挖掘枢纽 QTL。

1.6 基因注释

我们将枢纽 QTL 上传 NCBI(https://www.ncbi.nlm.nih.gov) 定位得到其所在基因,利用 TAIR(https://www.arabidopsis.org) 对定位的基因进行功能注释。

2 结果与分析

2.1 构建叶际微生物组共现网络

在拟南芥叶际微生物组攻击、利他、拮抗、互利共生四种共现网络,编号 1—200 为细菌,201—400 为真菌,每一个节点代表一种 OTU。在每个共现网络中,我们以 degree 和 C(u)作为筛选中心节点微生物的标准,且由于四种共现网络复杂程度不一,筛选的阈值会变化^[28]。结果表明(表1),在互利共生网络中有 5 种微生物属于中心节点微生物(degree>7,closeness>0.3),均为细菌,其中 2 种为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*),2 种为土地杆菌属(*Pedobacter*),1 种为 *Streptophyta*;在拮抗网络中有 5 种微生物属于中心节点微生物(degree>250,closeness>0.7),均为细菌,分别属于 *Bacillariophyta*,鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*),*Streptophyta*,土地杆菌属(*Pedobacter*)和马赛菌属(*Massilia*);在攻击网络中有 5 种微生物属于中心节点微生物(degree>150, closeness >0.55),包括 3 种细菌和 2 种真菌,其中 3 种细菌分为 *GpI*,鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*);在利他网络中有 5 种微生物属于中心节点微生物(degree>8,closeness>0.25),包括 3 种细菌分为 *GpI*,鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*), 和细菌和 2 种真菌,其中 3 种细菌分为 *GpI*,鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*), 和细菌和 2 种真微生物完全重合,与互利共生和拮抗网络中有 1 个共同重合,而互利共生、利他和攻击网络中有 3 个共同重合的中心节点微生物(图 1)。

Table 1 Hub microbes in four microbial co-occurrence networks							
编号	类别	网络类型	门	纲	目	科	属
Number	Type	Network type	Phylum	Class	Order	Family	Genus
1	细菌	攻击	蓝细菌门 (Cyanobacteria)	蓝细菌纲 (Cyanobacteria)	NA	Family_I	GpI
201	真菌	攻击	NA	NA	NA	NA	NA
2	细菌	攻击	变形菌门 (Proteobacteria)	γ-变形菌纲 (Gammaproteobacteria)	假单胞菌目 (Pseudomonadales)	假单胞菌科 (Pseudomonadaceae)	假单胞菌属 (Pseudomonas)
202	真菌	攻击	NA	NA	NA	NA	NA
3	细菌	攻击	变形菌门 (Proteobacteria)	α-变形菌纲 (Alphaproteobacteria)	鞘氨醇单胞菌目 (Sphingomonadales)	鞘氨醇单胞菌科 (Sphingomonadaceae)	鞘氨醇单胞菌属 (Sphingomonas)
1	细菌	利他	蓝细菌门 (Cyanobacteria)	蓝细菌纲 (Cyanobacteria)	NA	Family_I	GpI
3	细菌	利他	变形菌门 (Proteobacteria)	α-变形菌纲 (Alphaproteobacteria)	鞘氨醇单胞菌目 (Sphingomonadales)	鞘氨醇单胞菌科 (Sphingomonadaceae)	鞘氨醇单胞菌属 (Sphingomonas)
201	真菌	利他	NA	NA	NA	NA	NA
2	细菌	利他	变形菌门 (Proteobacteria)	γ-变形菌纲 (Gammaproteobacteria)	假单胞菌目 (Pseudomonadales)	假单胞菌科 (Pseudomonadaceae)	假单胞菌属 (Pseudomonas)
202	真菌	利他	NA	NA	NA	NA	NA
40	细菌	拮抗	蓝细菌门 (Cyanobacteria)	NA	NA	NA	NA

19 期

编号 Number	类别 Type	网络类型 Network type	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Cenus
Number	Type	Network type	1 Hytum	Class	Oluei	Family	Genus
14	细菌	拮抗	变形菌门 (Proteobacteria)	α-变形菌纲 (Alphaproteobacteria)	鞘氨醇单胞菌目 (Sphingomonadales)	鞘氨醇单胞菌科 (Sphingomonadaceae)	鞘氨醇单胞菌属 (Sphingomonas)
7	细菌	拮抗	蓝细菌门 (Cyanobacteria)	NA	NA	NA	NA
11	细菌	拮抗	拟杆菌门 (Bacteroidetes)	鞘脂杆菌纲 (Sphingobacteriia)	鞘脂杆菌目 (Sphingobacteriales)	鞘脂杆菌科 (Sphingobacteriaceae)	土地杆菌属 (Pedobacter)
39	细菌	拮抗	变形菌门 (Proteobacteria)	β-变形菌纲 (Betaproteobacteria)	伯克氏菌目 (Burkholderiales)	草酸杆菌科 (Oxalobacteraceae)	马赛菌属 (Massilia)
3	细菌	互利共生	变形菌门 (Proteobacteria)	α-变形菌纲 (Alphaproteobacteria)	鞘氨醇单胞菌目 (Sphingomonadales)	鞘氨醇单胞菌科 (Sphingomonadaceae)	鞘氨醇单胞菌属 (Sphingomonas)
7	细菌	互利共生	蓝细菌门 (Cyanobacteria)	NA	NA	NA	NA
11	细菌	互利共生	拟杆菌门 (Bacteroidetes)	鞘脂杆菌纲 (Sphingobacteriia)	鞘脂杆菌目 (Sphingobacteriales)	鞘脂杆菌科 (Sphingobacteriaceae)	土地杆菌属 (Pedobacter)
14	细菌	互利共生	变形菌门 (Proteobacteria)	α-变形菌纲 (Alphaproteobacteria)	鞘氨醇单胞菌目 (Sphingomonadales)	鞘氨醇单胞菌科 (Sphingomonadaceae)	鞘氨醇单胞菌属 (Sphingomonas)
23	细菌	互利共生	拟杆菌门 (Bacteroidetes)	鞘脂杆菌纲 (Sphingobacteriia)	鞘脂杆菌目 (Sphingobacteriales)	鞘脂杆菌科 (Sphingobacteriaceae)	土地杆菌属 (Pedobacter)

NA,缺失信息

2.2 筛选影响叶际微生物组共现网络的显著 SNP 位点

在相同的网络中,不同个体间的网络拓扑特征值具有显著的差异,同样,在相同的拓扑特征下,不同的共现网络类型之间的结果也有明显差异。根据 LM、GLM 和 MLM 模型 *p* 值分布的 QQ 图(图 3)及三种模型的基因组膨胀因子 λ 筛选模型后,利用上述网络特征值作为表型数据与拟南芥的基因型数据进行关联分析,共定位到 309 个显著 SNP 位点(图 4)。利用 plink 筛选了显著性 SNP 与候补 SNP 位点后,共定位到 622 个 SNP 位点,其中 248 个显著性 SNP 位点负责调控攻击互作关系,303 个显著性 SNP 位点负责调控利他互作关系,6 个显著性 SNP 位点负责调控攻击互作关系,65 个显著性 SNP 位点负责调控互利共生关系,这表明与互利共生和拮抗共现网络相比,拟南芥可能更多的遗传变异控制了叶际微生物的攻击和利他共现网络(图 2)。 2.3 挖掘影响叶际微生物共现网络的枢纽基因

为了进一步定位调控拟南芥叶际微生物互作行为的基因,对 622 个显著性 SNP 位点进行贝叶斯网络分析,构建不同共现网络中不同网络拓扑特征值的 SNP-SNP 互作网络。最后共定位出 26 个枢纽基因(表 2), 攻击互作网络中包含 15 个,利他互作网络中包含 5 个,互利共生互作网络中包含 6 个。通过基因注释,我们

收击互作网络中包含 15 个,利他互作网络中包含 5 个,互利共生互作网络中包含 6 个。通过基因注释,我们 发现,在攻击互作网络中,*AT1G59780* 基因编码含 NB-ARC 结构域的抗病蛋白,抵御植物疾病^[29-30]。NB-ARC 结构域作为植物抗性蛋白或 R 蛋白的分子开关,与核苷酸结合后可以激活 R 蛋白功能^[31]。*AT1G33890* 基因 和 *AT1G33900* 基因编码无毒诱导基因(A2G1)家族蛋白,在抵抗假单胞菌的感染中发挥关键作用^[32]。 *AT1G51860* 编码亮氨酸重复蛋白激酶家族蛋白,可能会提高植物耐盐性并增加植物对病原体的抗性^[33]。在 互利共生互作网络中,*AT5G35450* 基因是一种核苷酸结合富含亮氨酸重复(NLR)基因,是一类重要的植物抗 病基因^[34]。NLR 受体能够激活植物效应蛋白触发免疫(ETI),应对病原体感染^[35]。*AT5G47950* 基因可能编 码 BAHD 酰基转移酶(BIA2),通过酯化作用使油菜素内酯(BR)失活,平衡植物内 BR 含量,协助植物应对生 物与非生物胁迫^[36]。此外,基因 *AT1G55430*,*AT1G51860*,*AT3G26240*,*AT1G69150*,*AT1G59780* 和 *AT4G14930* 在基于多组学注释拟南芥基因功能时被识别出可能对植物的生长发育具有重要作用^[37](图4)。

3 讨论

叶际微生物组的组装和进化过程对植物健康和生态功能起到至关重要的作用,植物可通过多种代谢途径



Fig.1 Hub microbes identification

http://www.ecologica.cn



图 2 拟南芥叶际微生物共现网络 6 种网络拓扑特征值

Fig.2 The six network property values of each A. thaliana phyllophere co-occurrence network

Con, 连通性; C(u), 接近中心度; B(u), 中介中心度; E(u), Eccentricity; G(u), Eigenvector; P(u), PageRank

对叶际微生物进行调控^[38-39]。然而,目前对高等植物中叶际微生物组组装的遗传机制有待进一步探究^[13]。 在本项目研究中,通过数学模型构建叶际微生物的互作关系网络,识别了叶际微生物行为互作网络的中心节 点微生物,同时定位了拟南芥对叶际微生物互作网络具有调控作用的候选基因,可对拟南芥与叶际微生物组 相互作用遗传机制进行深入探究。

关注到,鞘氨醇单胞菌属存在于每种互作网络的中心节点微生物之中(表1),其可能对拟南芥叶际微生物互作网络起着重要作用。Innerebner等发现接种鞘氨醇单胞菌的植株内病原菌的含量比未接种的显著减少^[40]。鞘氨醇单胞菌亦可协助植物抵抗病原体和干旱,促进植物进一步生长,并作为关键物种存在于微生物群落之中^[41-42]。假单胞菌属可以对植物的适应性产生重大影响,例如致病性丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)引起植物病害,而非致病性假单胞菌分泌环状脂肽等抗微生物肽直接或间接抑制病原体的生长^[43-44]。Xu等发现茶树中鞘氨醇单胞菌和假单胞菌在叶际微生物中维持着一个微生物核心类群,该类群能

显著减弱病原体中一组毒性基因的表达^[14]。马赛菌属中的 *Massilia* sp. WC5 在根系中被发现可以分解土壤 中多环芳烃菲类^[45], *Massilia chloroacetimidivorans* sp. nov.分解氯乙酰胺类除草剂^[46], 协助植物应对化学胁 迫^[47]。土地杆菌能够在草莓、马铃薯、油菜等作物中定制, 作为生物肥料^[48], 例如对草莓施加 *Pedobacter* sp. CC1 可以增加其产量^[49]。在复杂的微生物互作群落中, 中心节点微生物可能参与调控和微生物网络结构。



http://www.ecologica.cn



LM,线性模型;GLM,一般线性模型;MLM,混合线性模型;QQ图,分位数-分位数图

http://www.ecologica.cn



图 4 叶际微生物组网络拓扑特征值与拟南芥 SNP 关联环形曼哈顿图

Fig.4 Circle Manhattan plot of genome-wide association analysis results of phyllosphere microbiome network property values and A. *thaliana* SNPs

Chr1: 染色体 1, Chr2: 染色体 2, Chr3: 染色体 3, Chr4: 染色体 4, Chr5: 染色体 5, SNP: 单核苷酸多态性 Single nucleotide polymorphism

因此,对其进行筛选、鉴定和分类将有助于解析微生物-微生物互作机制,从而设计出优于单菌株接种的复合 微生物菌剂,应用于农业、牧业等生产中,促进植物的生长健康^[50]。

许多研究表明,植物基因对于叶际微生物组稳定的维持作用非常关键,相关基因失调会导致叶际微生物 群落的失衡^[9,51-52]。我们通过网络作图和贝叶斯网络筛选到包括 AT1C33890、AT1C59780 和 AT5C47950 在 内的影响植物抗病等抗性的枢纽基因,同时也发现它们影响多种类型的微生物互作网络。某些抗性基因的表 达变化改变了植物微生物生长微环境,促使更多益生菌定殖于植物的表面或组织内^[15]。益生菌分泌抗菌等 物质与植物共同抑制病原体的生长,其也会分泌植物激素类似物促进植物的生长^[43]。可见,叶际微生物组与 植物的健康密不可分,我们对植物基因型如何影响叶际微生物组之间关系对合理定殖植物微生物改善植物健 康进而实现可持续农业发展至关重要^[53-54]。

网络作图基于微生物互作网络进行全基因组关联分析,帮助我们描述相关SNP或基因如何直接或间接







Table 2 The hub	genes of A.	thaliana	identified h	ov network mapping

基因名称 Gene name	基因功能 Gene function	基因名称 Gene name	基因功能 Gene function
AT1G55430	富含半胱氨酸/组氨酸的 C1 结构域家族蛋白	AT3G42057	转座因子基因
AT5G35450	抗病蛋白(CC-NBS-LRR 类)家族	AT1G36520	转座因子基因
AT5G27160	转座因子基因	AT4G08076	转座因子基因
AT5G35046	转座因子基因	AT5G00550	新转录区
AT2G06105	天冬氨酸蛋白酶 gag 多蛋白类	AT3G43153	cAMP 依赖性蛋白激酶抑制剂样蛋白
AT3G26240	富含半胱氨酸/组氨酸的 C1 结构域家族蛋白	AT4G05360	锌指(CCHC型)家族蛋白
AT2G07789	转座因子基因	AT5G35643	转座因子基因
AT4G05550	转座子基因	AT1G59780	NB-ARC 结构域抗病蛋白
AT1G51860	富含亮氨酸重复蛋白激酶家族蛋白	AT1G25886	转座因子
AT5G38920	多核苷酸转移酶,核糖核酸酶 H 样超家族蛋白	AT2G10660	转座因子
AT4G14930	存活蛋白 SurE 样磷酸酶/核苷酸酶	AT5G47950	BIA2 是一种假定的 HXXXD 型 BAHD 酰基转移酶, 可能通过调节生物活性 BR 库在 BR 稳态中发挥 作用
AT1G69150	富含半胱氨酸/组氨酸的 C1 结构域家族蛋白	AT1G33890	与耐热性变化相关(IAN2-6)
AT1G32890	转座因子基因	AT1G33900	与耐热性变化相关(IAN2-6)

影响微生物网络^[55]。进一步利用网络作图对植物微生物和基因组测序结果进行分析,可以识别出更多对植物与微生物互作具有关键作用的基因。在不久的将来,我们通过调节某些植物基因以调整微生物群落平衡, 实现对作物性状的改变和农业的可持续发展。

4 结论

利用网络作图的研究方法,量化了拟南芥叶际微生物组攻击、利他、拮抗和互利共生相互作用,构建微生物共现网络,以筛选出影响微互作网络的中心节点微生物,并计算网络拓扑特征值进行关联分析以构建贝叶斯网络,定位出对拟南芥叶际微生物组具有重要作用的基因,将有利于加深对植物招募其微生物组遗传机制的认识。拟南芥中的抗病、抗逆和激素分泌等功能基因对其叶际微生物组互作行为具有显著调控作用。在不同微生物共现网络中,中心节点微生物通过不同的互作行为对整个网络起到中心控制作用,因此,在深入探究植物与微生物互作机制时,有必要将微生物互作纳入考虑。将筛选到了核心微生物制成新型菌剂用在植物上,并且根据筛选到的显著基因筛选优良品种用在分子育种上也会是未来重要的研究方向。

参考文献(References):

- [1] Xiong C, Zhu Y G, Wang J T, Singh B, Han L L, Shen J P, Li P P, Wang G B, Wu C F, Ge A H, Zhang L M, He J Z. Host selection shapes crop microbiome assembly and network complexity. The New Phytologist, 2021, 229(2): 1091-1104.
- [2] Li P D, Zhu Z R, Zhang Y Z, Xu J P, Wang H K, Wang Z Y, Li H Y. The phyllosphere microbiome shifts toward combating melanose pathogen. Microbiome, 2022, 10(1): 56.
- [3] Zamioudis C, Pieterse C M J. Modulation of host immunity by beneficial microbes. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2012, 25(2): 139-150.
- [4] Wang Z H, Song Y. Toward understanding the genetic bases underlying plant-mediated "cry for help" to the microbiota. iMeta, 2022, 1(1): e8.
- [5] Perreault R, Laforest-Lapointe I. Plant-microbe interactions in the phyllosphere: facing challenges of the anthropocene. The ISME Journal, 2022, 16(2): 339-345.
- [6] Xu P, Fan X Y, Mao Y X, Cheng H Y, Xu A N, Lai W Y, Lv T X, Hu Y, Nie Y X, Zheng X X, Meng Q, Wang Y F, Cernava T, Wang M C. Temporal metabolite responsiveness of microbiota in the tea plant phyllosphere promotes continuous suppression of fungal pathogens. Journal of Advanced Research, 2022, 39: 49-60.
- [7] 孙雨,常晶晶,田春杰.根际微生物组中细菌趋化系统的生态功能.生态学报,2021,41(24):9963-9969.
- [8] Oyserman B O, Flores S S, Griffioen T, Pan X Y, van der Wijk E, Pronk L, Lokhorst W, Nurfikari A, Paulson J N, Movassagh M, Stopnisek N, Kupczok A, Cordovez V, Carrión V J, Ligterink W, Snoek B L, Medema M H, Raaijmakers J M. Disentangling the genetic basis of rhizosphere microbiome assembly in tomato. Nature Communications, 2022, 13(1): 3228.
- [9] Chen T, Nomura K, Wang X L, Sohrabi R, Xu J, Yao L Y, Paasch B C, Ma L, Kremer J, Cheng Y T, Zhang L, Wang N, Wang E T, Xin X F, He sheng yang. A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere. Nature, 2020, 580(7805): 653-657.
- [10] Bodenhausen N, Bortfeld-Miller M, Ackermann M, Vorholt J A. A synthetic community approach reveals plant genotypes affecting the phyllosphere microbiota. PLoS Genetics, 2014, 10(4): e1004283.
- [11] Bashir I, War A F, Rafiq I, Reshi Z A, Rashid I, Shouche Y S. Phyllosphere microbiome: diversity and functions. Microbiological Research, 2022, 254: 126888.
- [12] 陈伟立,李娟,朱红惠,陈杰忠,姚青.根际微生物调控植物根系构型研究进展.生态学报,2016,36(17):5285-5297.
- [13] Tan X F, Xie H T, Yu J W, Wang Y F, Xu J M, Xu P, Ma B. Host genetic determinants drive compartment-specific assembly of tea plant microbiomes. Plant Biotechnology Journal, 2022, 20(11): 2174-2186.
- [14] Xu P, Stirling E, Xie H T, Li W B, Lv X F, Matsumoto H, Cheng H Y, Xu A N, Lai W Y, Wang Y F, Zheng Z T, Wang M C, Liu X M, Ma B, Xu J M. Continental scale deciphering of microbiome networks untangles the phyllosphere homeostasis in tea plant. Journal of Advanced Research, 2022.
- [15] Gong T Y, Xin X F. Phyllosphere microbiota: community dynamics and its interaction with plant hosts. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(2): 297-304.
- [16] Gupta R, Elkabetz D, Leibman-Markus M, Sayas T, Schneider A, Jami E, Kleiman M, Bar M. Cytokinin drives assembly of the phyllosphere microbiome and promotes disease resistance through structural and chemical cues. The ISME Journal, 2022, 16(1): 122-137.

- [17] Hawkes C V, Kjøller R, Raaijmakers J M, Riber L, Christensen S, Rasmussen S, Christensen J H, Dahl A B, Westergaard J C, Nielsen M, Brown-Guedira G, Hestbjerg Hansen L. Extension of plant phenotypes by the foliar microbiome. Annual Review of Plant Biology, 2021, 72: 823-846.
- [18] Beilsmith K, Thoen M P M, Brachi B, Gloss A D, Khan M H, Bergelson J. Genome-wide association studies on the phyllosphere microbiome: embracing complexity in host-microbe interactions. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2019, 97(1): 164-181.
- [19] 杨宽,王慧玲,叶坤浩,王佩,孟广云,罗成,郭力维.叶际微生物及与植物互作的研究进展.云南农业大学学报:自然科学,2021,36 (1):155-164.
- [20] Deng S W, Caddell D F, Xu G, Dahlen L, Washington L, Yang J L, Coleman-Derr D. Genome wide association study reveals plant loci controlling heritability of the rhizosphere microbiome. The ISME Journal, 2021, 15(11): 3181-3194.
- [21] Horton M W, Bodenhausen N, Beilsmith K, Meng D Z, Muegge B D, Subramanian S, Vetter M M, Vilhjálmsson B J, Nordborg M, Gordon J I, Bergelson J. Genome-wide association study of *Arabidopsis thaliana* leaf microbial community. Nature Communications, 2014, 5: 5320.
- [22] He X Q, Zhang Q, Li B B, Jin Y, Jiang L B, Wu R L. Network mapping of root microbe interactions in Arabidopsis thaliana. Npj Biofilms and Microbiomes, 2021, 7: 72.
- [23] Wu S, Jiang L B, He X Q, Jin Y, Griffin C H, Wu R L. A quantitative decision theory of animal conflict. Heliyon, 2021, 7(7): e07621.
- [24] Jiang L B, Liu X J, He X Q, Jin Y, Cao Y G, Zhan X, Griffin C H, Gragnoli C, Wu R L. A behavioral model for mapping the genetic architecture of gut-microbiota networks. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1820847.
- [25] Regalado J, Lundberg D S, Deusch O, Kersten S, Karasov T, Poersch K, Shirsekar G, Weigel D. Combining whole-genome shotgun sequencing and rRNA gene amplicon analyses to improve detection of microbe - microbe interaction networks in plant leaves. The ISME Journal, 2020, 14 (8): 2116-2130.
- [26] Agler M T, Ruhe J, Kroll S, Morhenn C, Kim S T, Weigel D, Kemen E M. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. PLoS Biology, 2016, 14(1): e1002352.
- [27] Kang H M, Sul J H, Service S K, Zaitlen N A, Kong S Y, Freimer N B, Sabatti C, Eskin E. Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. Nature Genetics, 2010, 42(4): 348-354.
- [28] Li K H, Cheng K X, Wang H C, Zhang Q, Yang Y, Jin Y, He X Q, Wu R L. Disentangling leaf-microbiome interactions in Arabidopsis thaliana by network mapping. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 996121.
- [29] Manzano C, Abraham Z, López-Torrejón G, Del Pozo J C. Identification of ubiquitinated proteins in Arabidopsis. Plant Molecular Biology, 2008, 68(1): 145-158.
- [30] Shin R, Jez J M, Basra A, Zhang B, Schachtman D P. 14-3-3 Proteins fine-tune plant nutrient metabolism. FEBS Letters, 2011, 585(1): 143-147.
- [31] van Ooijen G, Mayr G, Kasiem M M A, Albrecht M, Cornelissen B J C, Takken F L W. Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(6): 1383-1397.
- [32] Lu S, Zhu T Q, Wang Z X, Luo L L, Wang S, Lu M H, Cui Y M, Zou B H, Hua J. Arabidopsis immune-associated nucleotide-binding genes repress heat tolerance at the reproductive stage by inhibiting the unfolded protein response and promoting cell death. Molecular Plant, 2021, 14 (2): 267-284.
- [33] Yuan N, Yuan S R, Li Z G, Zhou M, Wu P P, Hu Q, Mendu V, Wang L J, Luo H. STRESS INDUCED FACTOR 2, a leucine-rich repeat kinase regulates basal plant pathogen defense. Plant Physiology, 2018, 176(4): 3062-3080.
- [34] Kong W W, Xia X, Wang Q Q, Liu L W, Zhang S W, Ding L, Liu A X, La H G. Impact of DNA demethylases on the DNA methylation and transcription of *Arabidopsis NLR* genes. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 460.
- [35] Yuan M H, Jiang Z Y, Bi G Z, Nomura K, Liu M H, Wang Y P, Cai B Y, Zhou J M, He S Y, Xin X F. Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. Nature, 2021, 592(7852): 105-109.
- [36] Zhang Z Q, Xu L P. Arabidopsis BRASSINOSTEROID INACTIVATOR2 is a typical BAHD acyltransferase involved in brassinosteroid homeostasis. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(8): 1925-1941.
- [37] Depuydt T, Vandepoele K. Multi-omics network-based functional annotation of unknown Arabidopsis genes. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2021, 108(4): 1193-1212.
- [38] Shakir S, Zaidi S S E A, de Vries F T, Mansoor S. Plant genetic networks shaping phyllosphere microbial community. Trends in Genetics, 2021, 37(4): 306-316.
- [39] 潘建刚,呼庆,齐鸿雁,张洪勋,庄国强,白志辉.叶际微生物研究进展.生态学报,2011,31(2):583-592.
- [40] Innerebner G, Knief C, Vorholt J A. Protection of Arabidopsis thaliana against leaf-pathogenic Pseudomonas syringae by Sphingomonas strains in a controlled model system. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(10): 3202-3210.

- plant growth promoting rhizobacteria. Genomics, 2020, 112(5): 3648-3657.
 [42] Carlström C I, Field C M, Bortfeld-Miller M, Müller B, Sunagawa S, Vorholt J A. Synthetic microbiota reveal priority effects and keystone strains in the *Arabidopsis* phyllosphere. Nature Ecology & Evolution, 2019, 3(10): 1445-1454.
- [43] Preston G M. Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences, 2004, 359(1446): 907-918.
- [44] Karasov T L, Almario J, Friedemann C, Ding W, Giolai M, Heavens D, Kersten S, Lundberg D S, Neumann M, Regalado J, Neher R A, Kemen E, Weigel D. Arabidopsis thaliana and Pseudomonas pathogens exhibit stable associations over evolutionary timescales. Cell Host & Microbe, 2018, 24(1): 168-179.
- [45] Lou J, Gu H P, Wang H Z, An Q L, Xu J M. Complete genome sequence of *Massilia* sp. WG5, an efficient phenanthrene-degrading bacterium from soil. Journal of Biotechnology, 2016, 218: 49-50.
- [46] Lee H, Kim D U, Park S, Yoon J H, Ka J O. Massilia chloroacetimidivorans sp. nov., a chloroacetamide herbicide-degrading bacterium isolated from soil. Antonie Van Leeuwenhoek, 2017, 110(6): 751-758.
- [47] Li Q Q, Li J B, Jiang L F, Sun Y T, Luo C L, Zhang G. Diversity and structure of phenanthrene degrading bacterial communities associated with fungal bioremediation in petroleum contaminated soil. Journal of Hazardous Materials, 2021, 403: 123895.
- [48] Morais M C, Mucha Â, Ferreira H, Gonçalves B, Bacelar E, Marques G. Comparative study of plant growth-promoting bacteria on the physiology, growth and fruit quality of strawberry. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019, 99(12): 5341-5349.
- [49] Yin C T, Casa Vargas J M, Schlatter D C, Hagerty C H, Hulbert S H, Paulitz T C. Rhizosphere community selection reveals bacteria associated with reduced root disease. Microbiome, 2021, 9(1): 86.
- [50] Durán P, Thiergart T, Garrido-Oter R, Agler M, Kemen E, Schulze-Lefert P, Hacquard S. Microbial interKingdom interactions in roots promote Arabidopsis survival. Cell, 2018, 175(4): 973-983.
- [51] Liu H W, Brettell L E, Singh B. Linking the phyllosphere microbiome to plant health. Trends in Plant Science, 2020, 25(9): 841-844.
- [52] Xu N H, Zhao Q Q, Zhang Z Y, Zhang Q, Wang Y, Qin G Y, Ke M J, Qiu D Y, Peijnenburg W M, Lu T, Qian H F. Phyllosphere microorganisms: sources, drivers, and their interactions with plant hosts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(16): 4860-4870.
- [53] Suman A, Govindasamy V, Ramakrishnan B, Aswini K, SaiPrasad J, Sharma P, Pathak D, Annapurna K. Microbial community and functionbased synthetic bioinoculants: a perspective for sustainable agriculture. Frontiers in Microbiology, 2022, 12: 805498.
- [54] 丁兆军, 白洋. 根系发育和微生物组研究现状及未来发展趋势. 中国科学: 生命科学, 2021, 51(10): 1447-1456.
- [55] 李凯航,王浩臣,程可心,杨艳,金一,何晓青.全基因组关联分析研究植物与微生物组的互作遗传机制.生物技术通报,2023,39(2): 1-11.