

## 研究报告

## 功能作图(functional mapping)分析大肠杆菌和金黄色葡萄球菌之间的竞争互作

尹丽新, 李彩凤, 何晓青, 邬荣领, 金一\*

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

尹丽新, 李彩凤, 何晓青, 邬荣领, 金一. 功能作图(functional mapping)分析大肠杆菌和金黄色葡萄球菌之间的竞争互作[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3784-3799.

YIN Lixin, LI Caifeng, HE Xiaoqing, WU Rongling, JIN Yi. Functional mapping for competitive interactions between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3784-3799.

**摘要:**【背景】功能作图(functional mapping)模型是基于统计方法的分析生物体动态复杂性状发育的全基因组作图方法,旨在定位性状发育过程中的数量性状位点(quantitative trait loci, QTL),将功能作图应用于微生物研究有助于解析复杂的互作过程。【目的】利用功能作图定位两种微生物在动态生长发育过程中发挥显著作用的 QTL,通过基因功能注释找到影响微生物表型生长的基因。【方法】将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌各 100 个菌株单独培养和一一配对共同培养,将取得的各菌株生长丰度表型数据和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)数据进行关联分析,找到同一物种在不同培养条件下对生长起作用的显著 QTL。【结果】通过功能作图分析,在大肠杆菌中定位到 217 个 QTL,金黄色葡萄球菌中定位到 152 个 QTL;通过功能聚类 and 基因注释分析发现, QTL 所在候选基因中金黄色葡萄球菌 *scdA*、*sdrC*、*sdrD*、*ftsA* 和大肠杆菌 *phr*、*nagC*、*eptA*、*ppsA*、*priA*、*flim* 基因对微生物的生长发挥了较大作用。【结论】本文借助功能作图定位了大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在竞争互作中的关键基因,研究成果不仅为功能作图在微生物研究中的应用奠定了基础,更为解析微生物复杂的相互作用机制提供了新的思路。

**关键词:** 大肠杆菌; 金黄色葡萄球菌; 竞争互作; 功能作图; 显著数量性状位点

资助项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2021ZY64)

This work was supported by the Central Universities Fundamental Research Project (2021ZY64).

\*Corresponding author. E-mail: yijin@bjfu.edu.cn

Received: 2022-12-24; Accepted: 2023-03-09; Published online: 2023-04-17

## Functional mapping for competitive interactions between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

YIN Lixin, LI Caifeng, HE Xiaoqing, WU Rongling, JIN Yi\*

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

**Abstract:** [Background] Functional mapping is a genome-wide mapping method that uses statistics to analyze the development of dynamic and complex traits in organisms, with the aim of locating quantitative trait loci (QTL) during the development of traits. The application of functional mapping to microbiological studies can unravel complex interactions. [Objective] To locate significant QTLs in the growth and development of two microorganisms by functional mapping, and to identify the key genes affecting the phenotypic growth of the microorganisms functional annotation. [Methods] One hundred strains of *Escherichia coli* and 100 strains of *Staphylococcus aureus* were cultured separately or paired together for co-culture. The phenotypic data and SNP data obtained from each strain were used for correlation analysis to locate the significant QTL of the same species under different culture conditions. [Results] The functional mapping identified 217 QTL in *E. coli* and 152 QTL in *S. aureus*. The functional clustering and gene annotation analysis showed that *scdA*, *sdrC*, *sdrD*, and *ftsA* in *S. aureus* and *phr*, *nagC*, *eptA*, *ppsA*, *priA*, and *flim* in *E. coli* might play a role in the microbial growth. [Conclusion] We identified the key genes involved in the competitive interactions between *E. coli* and *S. aureus* by employing functional mapping. Our results not only provide fundamental data for the application of functional mapping in microbial research but also offer a new idea for deciphering the complex mechanisms of microbial interactions.

**Keywords:** *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; competitive interaction; functional mapping; significant quantitative trait loci

生物与生物以及生物与环境之间存在着极其复杂的相互作用关系,尤其是在微生物环境中<sup>[1-2]</sup>。微生物生态环境中大量菌株之间存在着竞争互作<sup>[3]</sup>,自身产生了复杂的生物学过程来应对环境的变化。生物的复杂性状由基因和生活的环境共同控制<sup>[4]</sup>。在微生物生长过程中,性状呈现出了动态变化,如菌的大小及丰度性状都是以时间为自变量而发生变化,这就使研究微生物的表型性状变成了一个难题。

近年来,由于测序技术快速发展,通过测序

能得到很多的基因数据<sup>[5]</sup>。许多基因组测序研究已经观察到同一微生物组中存在密切相关的细菌物种或基因型,但很少有人考虑生物相互作用如何驱动微生物组的多样性模式,微生物物种之间的相互作用经常被认为是微生物组多样性的潜在驱动因素<sup>[6]</sup>。细菌的相互作用在生态系统中起着至关重要的作用<sup>[7]</sup>,以前的研究表明细菌相互作用中表型的变化与复杂的系统有关,不能通过分析单个细菌菌株来预测<sup>[1]</sup>。尽管高通量测序技术提供了越来越多的遗传数据,但为种群、群

落或生态系统中的种间相互作用构建精确的基因型-表型图谱仍十分困难<sup>[8]</sup>。

近年来,全基因组关联研究(genome wide association study, GWAS)越来越多地作为鉴定与特定表型或性状相关的遗传标记工具应用于微生物的复杂性状分析<sup>[9]</sup>,但是用于微生物的GWAS发展相对缓慢<sup>[10]</sup>。由于大多数GWAS方法的研究都基于单个时间点测量的静态表型数据<sup>[11]</sup>,而物种的表型发育是随时间发展变化的,是一个持续的动态过程;GWAS只能用于识别与特定时间点表型相关的数量性状位点(quantitative trait locus, QTL),这种方法忽略了重复表型测量之间的依赖关系,未考虑动态的表型发育信息<sup>[12-13]</sup>。因此在单一时间点评估表型的GWAS不能利用表型表达的全部信息。

基于GWAS的局限性,研究人员将一个功能作图的理论延伸到现有的GWAS方法中,建立了一个新的模型——功能性GWAS(functional GWAS, fGWAS)<sup>[14-15]</sup>。fGWAS是利用随时间变化而累积的表型来识别基因和发育模式之间的动态关联,其核心理论功能作图(functional mapping)是由Ma等<sup>[16]</sup>提出用于研究动态遗传机制的统计分析方法,在遗传作图框架内整合了不同性状或变量的数学关系,将动态的性状表示为一个含有多个参数的函数。将拟合生长曲线的函数融入QTL作图方面取得了巨大的进展,从而可以对动态QTL进行表征和作图<sup>[17-19]</sup>。利用生长曲线拟合、构建协方差矩阵、参数估计和似然比检验统计量等来确定生物生长过程中发挥显著作用的QTL。Ye等<sup>[20]</sup>的研究中在功能作图的基础上改变了生长函数和协方差矩阵,进而更好地阐明了动态发育的遗传结构。

本研究选用的两种微生物是大肠杆菌和金

黄色葡萄球菌,这两种细菌广泛存在于自然界中,并且有比较全面的基因组数据,繁殖周期短,易于培养,可以为深入探究微生物相互作用的复杂遗传机制提供基础。本课题组利用功能作图将在不同时间点的菌株丰度变化和重测序结果SNP数据进行了关联分析,使用了一阶结构前依赖[first-order structured antedependence, SAD(1)]<sup>[20]</sup>模型代替功能作图最初使用的一阶自回归模型[first-order autoregressive, AR(1)]来构建协方差矩阵,相较于AR(1),SAD(1)不依赖于平稳性假设。我们使用功能作图来分析不同培养环境中菌株丰度变化和影响生长的QTL位点,从而定位到候选基因,通过基因的功能信息可以了解微生物相互作用的机制,为研究微生物竞争互作提供一种新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

研究对象是100株大肠杆菌和100株金黄色葡萄球菌。其中编号为1-45的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的详细信息已经记录在之前发表的文章<sup>[12]</sup>中,编号为46-100的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的菌株来源于某医院。所有菌株都保存在-80℃冰箱中,用于后续的培养试验。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组提取试剂盒、荧光定量试剂盒,天根生化科技有限公司;溶菌酶、溶葡萄球菌素, Sigma公司;脑心浸出液肉汤培养基<sup>[21]</sup>, OXOID公司。荧光定量PCR仪, stratagene公司;离心机, Thermo Fisher公司。

#### 1.1.3 培养基

脑心浸出液肉汤培养基(g/L):牛脑浸粉 12.5,牛心浸粉 5.0,蛋白胨 10.0,葡萄糖 2.0,氯化钠 5.0,磷酸氢二钠 2.5, pH 7.4±0.2。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细菌培养

将得到的 100 对菌株分别进行单独培养和共同培养, 菌株预培养的详细步骤参考文献[12], 将 100 株大肠杆菌和 100 株金黄色葡萄球菌进行了随机一一配对, 在共同培养中接种了配对的 2 个菌株, 并在单独培养中接种该对的每个菌株。对于每个菌株, 单一培养和共同培养在培养起始时包含相同数量的微生物丰度, 起始浓度为  $5 \times 10^3$  copies/mL。为了保持相同的生长环境, 两种条件下均采用相同形状大小的三角瓶, 其中含有 25 mL 脑心浸出液肉汤培养基。所有三角瓶在 30 °C、130 r/min 的恒温摇床中培养。在总共 36 h 的培养期内, 培养后每 0.5 h 对瓶中的菌株进行一次取样, 然后在培养 2 h 后每 2 h 取样一次, 在培养 12 h 后每 4 h 取样一次, 在培养 24 h 后每 6 h 取样一次。

使用细菌基因组提取试剂盒提取基因组 DNA<sup>[22]</sup>。为了对两种细菌进行特异性检测, 根据大肠杆菌编码  $\beta$ -D-葡萄糖苷酶的 *uidA* 基因设计引物 uidA-F (5'-CGCTGAAGAGATGCTCG ACT-3') 和 uidA-R (5'-CACGCTTGGGTGGTTTT TGT-3'), 扩增片段的长度为 217 bp; 根据金黄色葡萄球菌编码耐热核酸酶的 *nuc* 基因设计引物 nuc-F (5'-AGATAACGGCGTAAATAGA-3') 和 nuc-R (5'-ACTTGCTTCAGGACCATA-3'), 扩增片段长度为 226 bp。通过 qPCR<sup>[22-23]</sup> 方法测量细菌每个时间点的生长量, 每个菌株的 qPCR 计数在 3 个重复中取平均值。两种微生物的全基因组测序在 Illumina HiSeq 平台上进行, 参考基因组分别为 *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 和 *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* NCTC8325。对两种微生物的每个菌株进行重测序, 通过比对和筛选获得最终的 SNP 数据<sup>[8]</sup>。

### 1.2.2 分析方法—功能作图

功能作图是用生长曲线来描绘生长性状的发育规律, 将基因型与动态表型进行关联分析定位 QTL 的统计分析方法。在本研究中微生物的生长丰度作为一种生长性状, 首先整合在多个时间点记录的表型数据分别构建两种微生物在单独培养和共同培养环境中的表型向量, 其生长轨迹可用逻辑斯蒂(logistic)生长方程拟合。

$$g(t) = \frac{a}{1 + be^{-rt}} \quad (1)$$

式中:  $a$  是性状的渐近生长数值;  $a/(1+b)$  是时间  $t=0$  时  $g(t)$  的初始值;  $r$  是相对生长速率。

如果一个假定的 QTL 基因型具有这些参数的不同组合, 这意味着该 QTL 在控制生长轨迹的差异方面发挥了作用<sup>[16]</sup>。

在功能作图框架中, 每个标记位点的基因型分组下, 多个个体的表型性状服从一个多元正态分布, 其概率密度函数表示为:  $f_j(y_i) =$

$$\frac{1}{(2\pi)^{\frac{T}{2}} |\Sigma|^{\frac{1}{2}}} \exp\left[-\frac{1}{2}(y_i - \mu_j) \Sigma^{-1} (y_i - \mu_j)'\right] \quad (2)$$

式中:  $j$  是标记位点基因型的数量;  $y_i = (y_i(1), y_i(2), \dots, y_i(T))$  是个体  $i$  ( $i=1, \dots, n$ ) 在  $T$  个时间点生长性状的表型向量;  $\mu_j = (\mu_j(1), \mu_j(2), \dots, \mu_j(T))$  是与  $y_i$  相对应的期望均值向量, 可以用方程(1)拟合, 表示为:

$$\mu_j = [\mu_j(t)]_{1 \times T} = \left[ \frac{a_j}{1 + b_j e^{-rt}} \right]_{1 \times T} \quad (3)$$

式中:  $\Sigma$  是不同时间点生长表型的协方差矩阵, 由 SAD(1) 构建  $(T \times T)$  维的协方差矩阵<sup>[20]</sup>。

使用  $\phi$  表示前依赖性的程度(描述一个时间点的残差在多大程度上依赖于之前的时间点),  $\sigma^2(t)$  表示性状在时间  $t$  的方差,  $\sigma(t_1, t_2)$  表示性状在时间  $t_1$  和  $t_2$  之间的协方差:

$$\sigma^2(t) = \frac{1 - \varnothing^{2t}}{1 - \varnothing^2} * v^2 \quad (4)$$

$$\sigma(t_1, t_2) = \varnothing^{t_2 - t_1} \frac{1 - \varnothing^{2t_1}}{1 - \varnothing^2} * v^2, t_2 > t_1 \quad (5)$$

在我们的研究中, 标记位点基因型的数量有两种, 分别表示为  $j_1$  和  $j_2$ 。对于每一个 SNP 标记位点, 结合公式(1)–(5), 可以构建如下似然函数:

$$L(\Omega) = \prod_{i=1}^{n_{j1}} f_{j1}(y_i; \mu_{j1}, \Sigma) \prod_{i=1}^{n_{j2}} f_{j2}(y_i; \mu_{j2}, \Sigma)$$

式中:  $n_j$  是携带基因型  $j$  的个体数;  $\Omega$  是包含了所有的未知参数的集合。我们用以下假设检验来确定是否存在显著的 QTL 影响微生物的生长轨迹, 包括零假设和备择假设:

$H_0: a_{j1} = a_{j2}, b_{j1} = b_{j2}, r_{j1} = r_{j2};$

$H_1$ : 以上等式至少有一个是不成立的。

通过使用 R 语言构建程序, 在上面的假设检验中所有参数都由最大似然估计方法计算得到。通过全基因组水平上零假设和备择假设的计算, 可以得出各标记位点上的对数似然比(loglikelihood ratio, LR):

$$LR = -2\log \left[ \frac{L_0(\Omega)}{L_1(\Omega)} \right]$$

式中:  $L_0(\Omega)$  和  $L_1(\Omega)$  分别表示假设检验  $H_0$  和  $H_1$  下的最大似然估计<sup>[16]</sup>, 通过计算得到所有 SNP 的  $P$  值, 使用 Bonferroni 方法对检验结果进行校正, 确定显著位点的阈值<sup>[24]</sup>。Bonferroni 校正是一种严格的多重检验校正方法, 主要应用于全基因组关联分析, 可以降低由于数据随机效应或检验次数过多等原因造成的假阳性结果。为了控制假阳性的概率, 使用 Bonferroni 校正对阈值进行调整, 它会将设定的显著性水平除以统计检验的次数即 SNP 的数目, 得到一个最终的阈值。应用 Bonferroni 方法通常会为我们

提供最保守的  $P$  值阈值。以上所有计算均使用软件 R4.1.0 来完成。

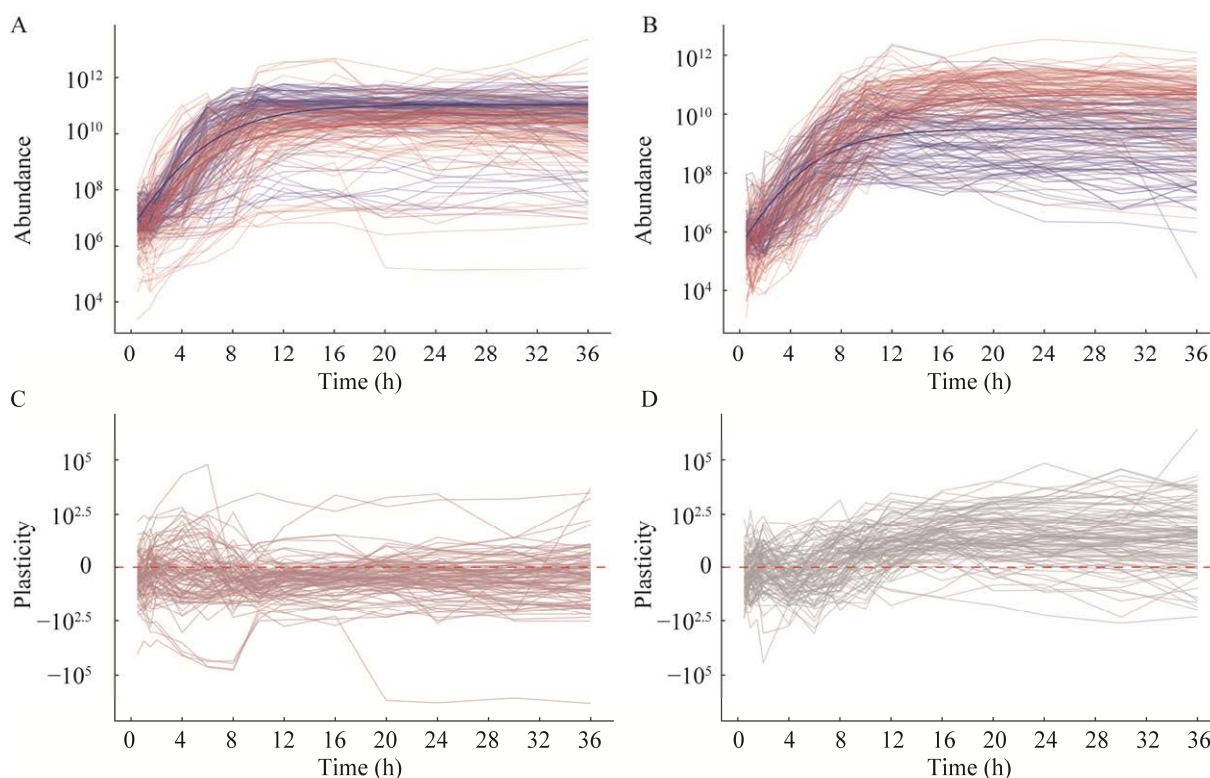
### 1.2.3 功能聚类(functional clustering)和网络分析

使用功能作图估计的每一个 SNP 的生长参数  $a$ 、 $b$  和  $r$  计算 SNP 随时间变化的遗传方差作为遗传效应, 将所有定位得到的显著位点划分为不同的模块。功能聚类也是一个基于似然函数的混合模型<sup>[25]</sup>, 通过使用 EM 算法求解似然函数, 最佳聚类数量由贝叶斯信息准则 (Bayesian information criteria, BIC)<sup>[26]</sup>确定。对核心聚类模块进行网络作图, 通过进化博弈论使用 lASSO<sup>[27]</sup>变量选择和常微分方程将模块内每一个 SNP 的净遗传效应分解为独立效应和依赖效应, 基于每一个 SNP 的遗传效应, 构建模块内部的 SNP 调控网络<sup>[4,28]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 微生物生长变化

本研究比较了大肠杆菌和金黄色葡萄球菌每个物种的 100 株菌在单独培养和共同培养下微生物丰度的生长轨迹(图 1)。通过生长曲线发现两种微生物的不同菌株在不同环境中的生长都有变化, 图 1 中蓝线代表菌株在共同培养环境中的生长, 红线代表菌株在单独培养环境中的生长, 粗线表示通过 logistic 生长方程拟合的平均生长曲线。其中大肠杆菌在不同培养环境中的生长差异相对较小(图 1A), 与金黄色葡萄球菌共同培养时, 大肠杆菌菌株比在单独培养环境下更早开始生长, 并达到更高的生长丰度; 而在不同生长环境中培养的金黄色葡萄球菌的生长丰度差异相对较大(图 1B), 总体单独培养比在共同培养时生长得更好更快, 表现出了微生物随时间及环境变化的表型可塑性(图 1C、1D)。这说明金黄色葡萄球菌在两种菌株的共同培养中受到了抑制作用, 而大肠杆菌受到的影响较小。



**图 1 微生物菌株生长丰度变化和表型可塑性** A: 大肠杆菌菌株丰度生长曲线. B: 金黄色葡萄球菌菌株丰度生长曲线. C: 大肠杆菌的表型可塑性. D: 金黄色葡萄球菌的表型可塑性

Figure 1 Trajectories of microbial growth and its phenotypic plasticity. A: Trajectory of microbial growth for *E. coli*. B: Trajectory of microbial growth for *S. aureus*. C: The phenotypic plasticity of *E. coli*. D: The phenotypic plasticity of *S. aureus*.

## 2.2 两种微生物生长情况的功能作图分析

使用测序技术在两种微生物全基因组范围内确定 SNP 位点, 从 100 株大肠杆菌中得到了 58 397 个 SNP 位点, 从 100 株金黄色葡萄球菌中得到了 12 849 个 SNP 位点。通过使用功能作图模型分析 100 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在两种环境中的菌体数量和与表型相关的 SNP 之间的关系, 曼哈顿图和韦恩图(图 2)显示了两种微生物在不同培养环境中的显著位点数目。在曼哈顿图中红线代表全基因组显著性阈值, 每个点代表一个 SNP 位点, 显著的 SNP 位点称为 QTL。在不同生长环境中, 共有 71 个和 146 个 QTL 分别超过了大肠杆菌单独培养(图 2A)和共同

培养(图 2B)确定的全基因组临界阈值。其中, 单独培养 71 个 QTL 中有 5 个位于非编码区, 共同培养 16 个 QTL 位于非编码区。在两种培养环境下定位到 14 个相同的 QTL, 1 个位于非编码区(图 2C)。

类似地, 在金黄色葡萄球菌的单独培养中, 共有 99 个显著的 QTL (图 2D), 其中有 17 个 QTL 位于非编码区; 在共同培养中共确定了 53 个显著的 QTL 与其生长有关(图 2E), 有 12 个位于非编码区。在两种生长环境中未定位到相同的 QTL (图 2F)。在两种微生物的不同环境中检测到的显著 QTL 仅有少数几个相同甚至无相同的 QTL, 推测大肠杆菌和金黄色葡萄球菌在共同培养环境中共同生长的同时也产生了竞争关系。



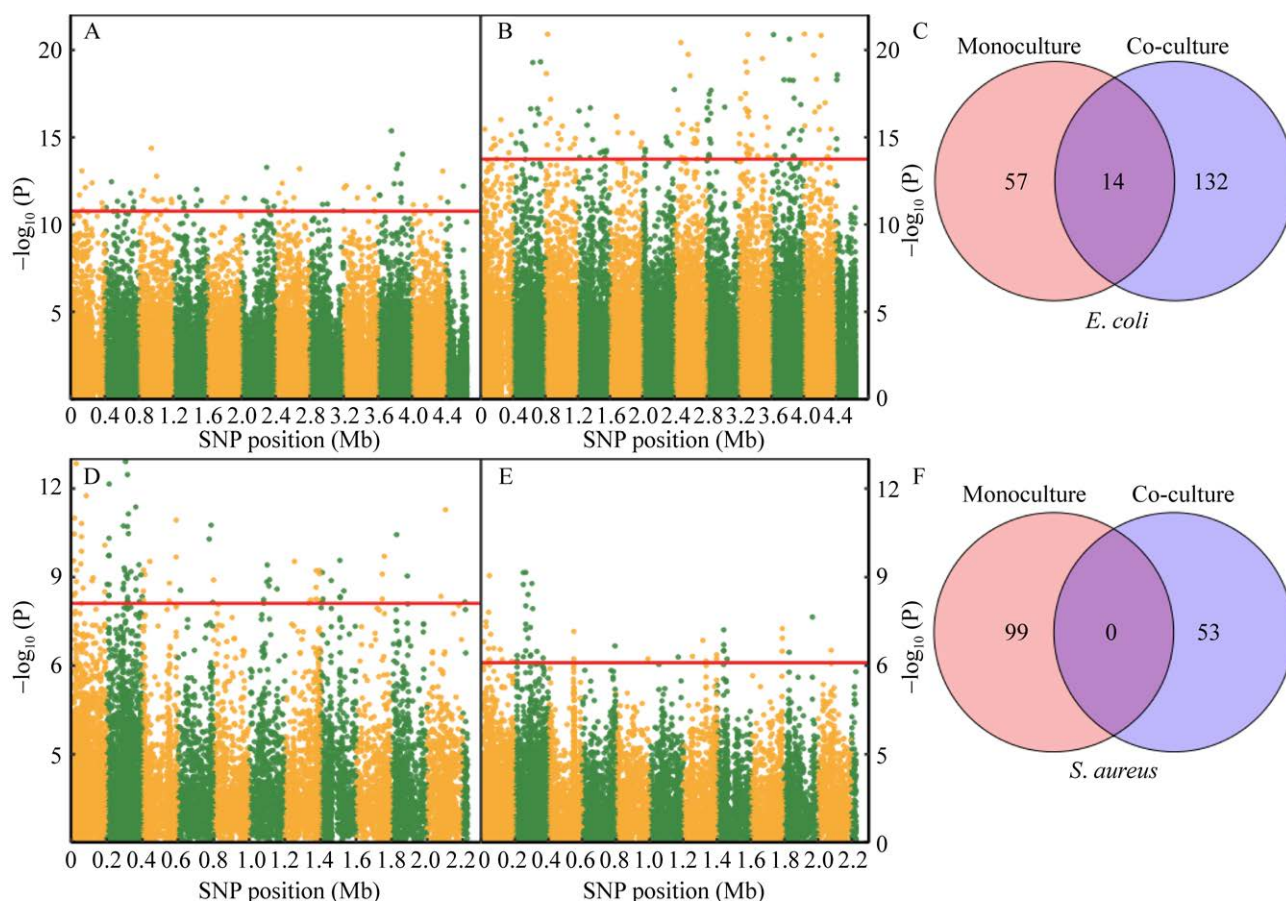


图2 微生物显著位点的曼哈顿图和韦恩图 A: 单独培养大肠杆菌曼哈顿图. B: 共同培养大肠杆菌曼哈顿图. C: 大肠杆菌 QTL 韦恩图. D: 单独培养金黄色葡萄球菌曼哈顿图. E: 共同培养金黄色葡萄球菌曼哈顿图. F: 金黄色葡萄球菌 QTL 韦恩图

Figure 2 Manhattan plots of functional mapping results and Venn diagram of significant loci. A: Manhattan plot of *E. coli* in monoculture. B: Manhattan plot of *E. coli* in co-culture. C: Venn diagram of QTL of *E. coli*. D: Manhattan plot of *S. aureus* in monoculture. E: Manhattan plot of *S. aureus* in co-culture. F: Venn diagram of QTL of *S. aureus*.

### 2.3 显著 QTL 遗传效应的功能聚类和网络分析

为了探究遗传因素对复杂性状的影响, 本研究使用功能作图估计得到的生长参数  $a$ 、 $b$  和  $r$  计算 SNP 的遗传效应, 将所有定位得到的显著位点划分为不同的模块, 根据 QTL 的遗传效应构建模块内部的调控网络。对所有的 QTL 遗传效应聚类(图 3)发现, 大肠杆菌遗传效应在单独培养和共同培养环境中分别被分为 5 类和

2 类, 金黄色葡萄球菌遗传效应分别被分为 5 类和 4 类。同一模块内 QTL 遗传效应的变化趋势基本一致, 经过对比两种微生物遗传效应的变化趋势, 发现它们生长后期遗传效应均趋于平稳。相较于大肠杆菌来说, 金黄色葡萄球菌的遗传效应随时间变化的波动较大, 单独培养环境中模块 1、模块 4 和模块 5 在生长前期呈现下降趋势, 模块 2、模块 3 在前期经过小幅度上升之后下降; 共同培养模块 1 和模块 4 在生

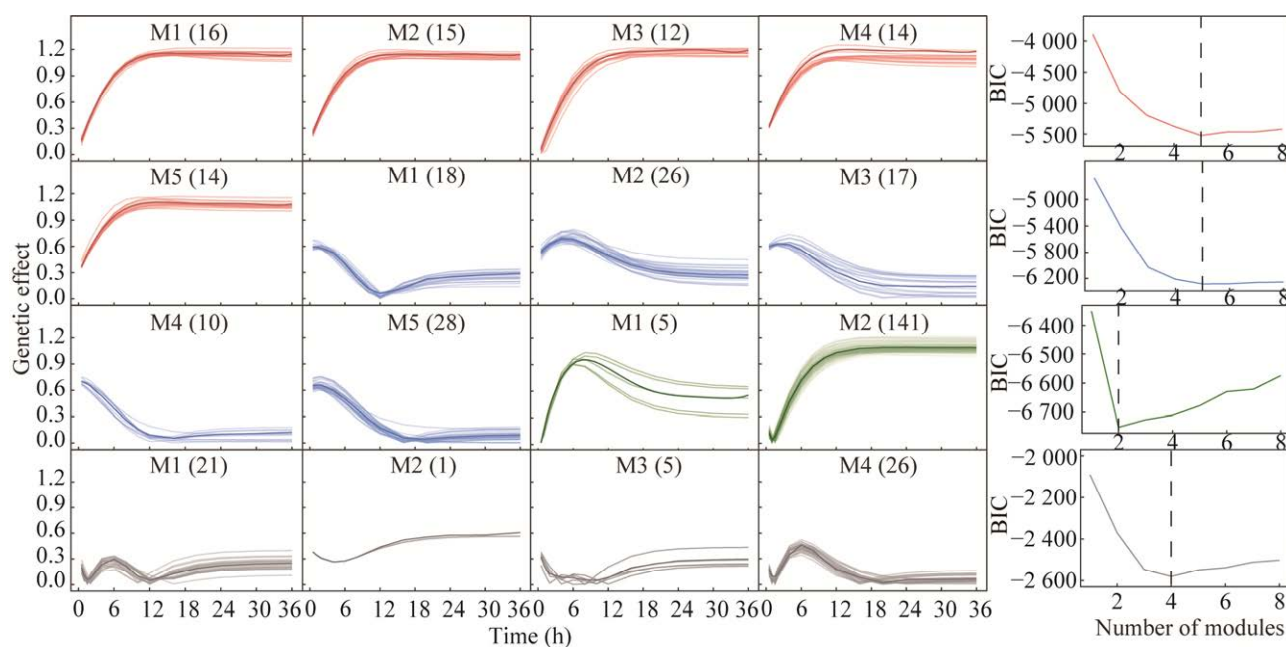
长前期呈现了先下降后上升再下降的波动趋势。通过聚类可以将遗传效应相似的 QTL 聚到一起, 有利于分析 QTL 的功能。

通过 lASSO 变量选择分析模块间和模块内 QTL 的调控关系, 绘制了每种生长条件下关键模块内的 QTL 调控网络(图 4)。在单独培养金黄色葡萄球菌模块 1 中链接其他 QTL 最多的是 QTL1376080, 对 7 个 QTL 发出了下调作用, 接受来自 4 个 QTL 的调控, QTL1376026 发出的调控作用均较强。共同培养中模块 2 只有一个关键 QTL251034; 模块 4 内传出链接最多的是 QTL1170423, QTL44435 发出了最多的上调作用, 传入链接最多的是 QTL794797, QTL550312

对其他 QTL 发出了较强的下调作用。在单独培养大肠杆菌中模块 3 中 QTL740317 和 QTL859232 发出了最多的调控, QTL701127 对 QTL1327974 发出了唯一的下调作用, 部分 QTL 仅接受调控而不发出调控; 共同培养模块 1 内接受最多调控的是 QTL2020923, 每一个 QTL 都接受和发出了调控。

## 2.4 部分显著 QTL 所在候选基因的功能注释

根据上述分析, 本研究对影响两种微生物生长的重要 QTL 筛选、功能注释和 QTL 所在候选基因的 KEGG 通路进行了富集分析(图 5), 发现大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的基因最富集的都是



**图 3 微生物 QTL 遗传效应功能聚类图和最佳聚类模块数量** 红线和蓝线分别表示单独培养环境中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌遗传效应; 绿线和灰线分别表示共同培养环境中大肠杆菌和金黄色葡萄球菌遗传效应; 细线表示每一个 QTL 的遗传效应, 粗线表示勒让德多项式拟合的均值; BIC 和遗传效应有相对应的颜色

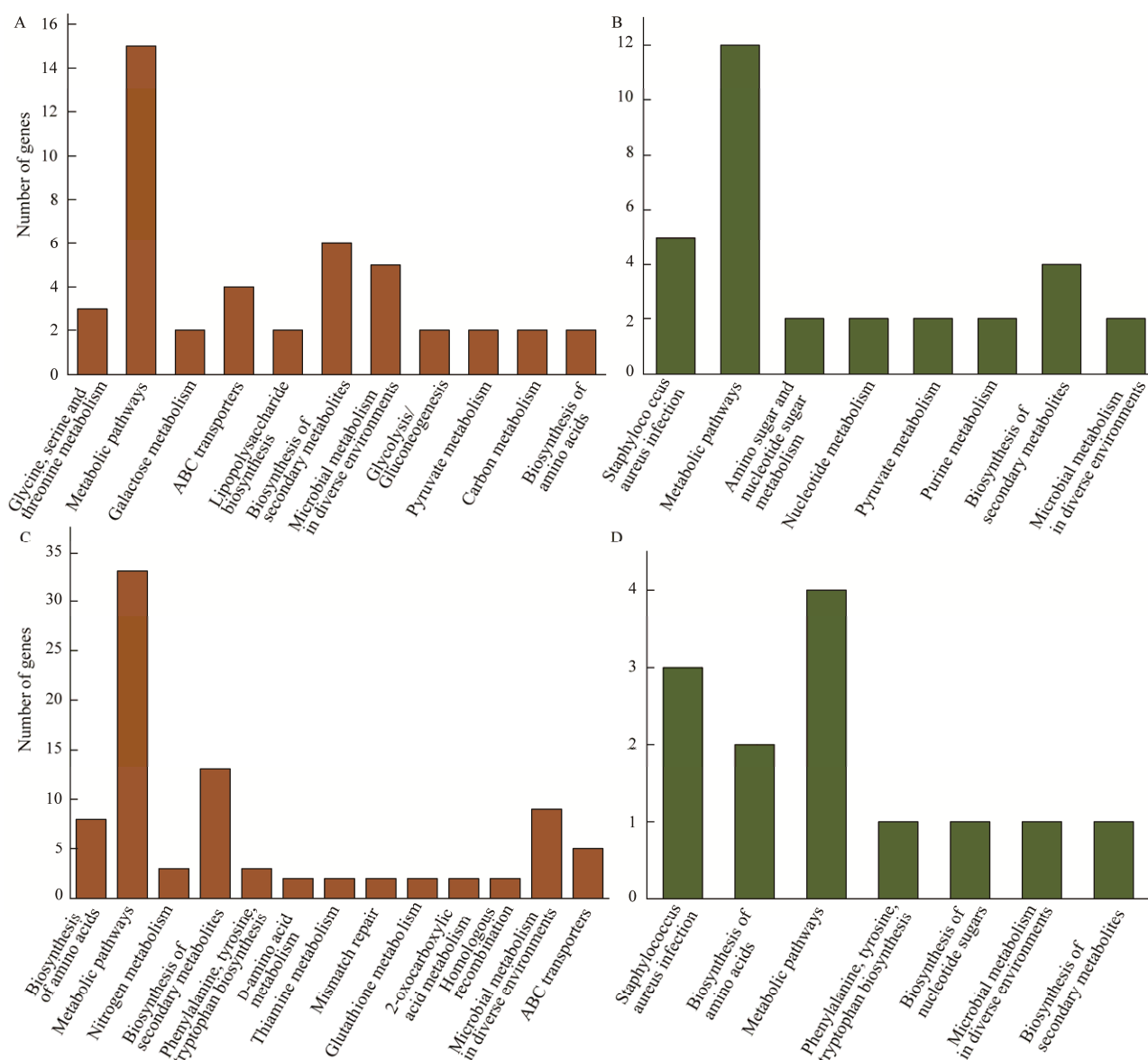
Figure 3 Functional clustering plot for genetic effect curves and optimal number of clustering modules. Red lines and blue lines denote the genetic effects of *E. coli* and *S. aureus* in monoculture, respectively; Green lines and grey lines denote the genetic effects of *E. coli* and *S. aureus* in co-culture, respectively; Thin line denotes the genetic effect of each QTL, thick line denotes the mean fitted by the legendre polynomial; BIC and genetic effect have corresponding colors.





是鞭毛运动开关复合体的 3 个组成部分之一<sup>[30]</sup>。QTL2036902 位于基因, 该基因 *hprS* 编码的传感器组氨酸激酶, 是大肠杆菌的氧化应激传感器<sup>[31]</sup>。除上述分析的模块之外, 还在其他模块发现了一些重要 QTL 并对其候选基因进行了功能注释(表 1)。

在金黄色葡萄球菌中, 两种生长环境中检测到的显著 QTL 包括 28 个非同义突变和 95 个同义突变, 共 152 个 QTL 定位于 81 个候选基因, 12 个基因可能与其生长密切相关(表 2)。其中在单独培养模块 1 中发出调控最多的枢纽 QTL1376080



**图 5 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌基因 KEGG 富集分析** A: 单独培养大肠杆菌基因 KEGG 富集. B: 单独培养金黄色葡萄球菌基因 KEGG 富集. C: 共同培养大肠杆菌基因 KEGG 富集. D: 共同培养金黄色葡萄球菌基因 KEGG 富集

Figure 5 Gene KEGG enrichment analysis of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. A: KEGG enrichment of *E. coli* in monoculture. B: KEGG enrichment of *S. aureus* in monoculture. C: KEGG enrichment of *E. coli* in co-culture. D: KEGG enrichment of *S. aureus* in co-culture.

表 1 大肠杆菌关键 QTL 候选基因注释

Table 1 Annotation of genes for key QTL of *Escherichia coli*

Gene ID	Position	Mutation	Gene	Functional annotation	Clustering module
Monoculture					
b0708	740 317	V<->I	<i>phr</i>	Deoxyribodipyrimidine photolyase	M3
b0822	859 232	T<->K	<i>ybiV</i>	Sugar phosphatase YbiV	M3
b0676	701 127	G<->G	<i>nagC</i>	DNA-binding transcriptional dual regulator NagC	M3
b4114	4 335 018	K<->K	<i>eptA</i>	Phosphoethanolamine transferase	M4
b1702	1 785 589	G<->G	<i>ppsA</i>	Phosphoenolpyruvate synthetase	M1
b2268	2 382 114	V<->V	<i>rbn</i>	Ribonuclease BN	M2
Co-culture					
b1968	2 036 902	L<->L	<i>hprS</i>	Sensor histidine kinase	M1
b1945	2 020 923	N<->K	<i>fliM</i>	Flagellar motor switch protein	M1
b0330	347 967	A<->A	<i>prpR</i>	Propionate catabolism operon regulatory protein	M1
b3935	4 126 424	L<->L	<i>priA</i>	Primosomal protein N'	M2
b3486	3 627 022	T<->T	<i>rbbA</i>	Ribosome-associated ATPase	M2

&lt;-&gt;: 氨基酸的突变

&lt;-&gt;: Amino acid mutation.

表 2 金黄色葡萄球菌基因功能注释

Table 2 Annotation of genes of *Staphylococcus aureus*

Gene ID	Position	Mutation	Gene	Functional annotation	Clustering module
Monoculture					
SAOUHSC_00118	123 529	Q<->R	<i>capE</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap5E	M4
SAOUHSC_00287	301 667	T<->T	/	ABC transporter ATP-binding protein	M2
SAOUHSC_00375	383 182	D<->D	<i>guaA</i>	GMP synthase	M3
SAOUHSC_00544	550 426	S<->S	<i>sdrC</i>	Fibrinogen-binding protein SdrC	M1
SAOUHSC_00545	552 238	V<->V	<i>sdrD</i>	Fibrinogen-binding protein SdrD	M5
SAOUHSC_00803	786 362	N<->H	<i>rnr</i>	Ribonuclease R	M5
SAOUHSC_01149	1 101 515	D<->D	<i>ftsA</i>	Cell division protein	M1
Co-culture					
SAOUHSC_00069	73 951	G<->G	<i>spa</i>	Protein A	M4
SAOUHSC_00119	125 462	Y<->Y	<i>capF</i>	Capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap8F	M1
SAOUHSC_00192	213 297	Y<->Y	<i>coa</i>	Staphylocoagulase	M4
SAOUHSC_00229	251 034	E<->E	<i>scdA</i>	Cell wall biosynthesis protein ScdA	M2
SAOUHSC_00544	550 312	S<->S	<i>sdrC</i>	Fibrinogen-binding protein SdrC	M4
SAOUHSC_01392	1 335 749	V<->V	/	ABC transporter ATP-binding protein	M3

/: 未找到该基因名称

/: The gene name was not found.

位于非编码区, 参与调控其他 QTL 发挥作用。发出正调控作用的 QTL1511094 位于编码假定蛋白的基因。QTL550426 和共同培养模块 4 中 QTL550312 都位于基因 *sdrC*, 该基因编码的纤维蛋白原结合蛋白 SdrC, 是一种细胞表面相关的钙结合蛋白, 调节黏附和细菌致病机制<sup>[32]</sup>。在共同培养模块 2 中 QTL251034 位于 *scdA* 基因, 编码细胞壁生物合成蛋白 ScdA, 在细胞分裂中起

重要作用<sup>[33]</sup>。模块 4 大多数 QTL 位于编码假定蛋白的基因, 其中 QTL73951 位于 *spa* 基因, 编码免疫球蛋白 G 结合蛋白 A, 锚定在金黄色葡萄球菌的细胞壁包膜上, 保护细菌免受吞噬细胞清除<sup>[34]</sup>。

在功能作图模型计算中, 检测到的许多重要 QTL 都分布在基因组区域或者非编码区参与物种的代谢和调节, 非编码区的 QTL 虽然定位不到候选基因, 不参与蛋白质的编码, 但在一定条

件下可以调控生物生长过程中基因的表达, 基因的表达可能会影响不同微生物在同一生长环境中的互作形式, 从而影响它们在不同环境中的生长情况。通过 KEGG 富集分析(图 5)发现, 两种微生物的重要基因除了都参与主要的代谢通路、氨基酸核苷酸等生物合成代谢通路外, 还参与了不同环境中微生物的代谢途径, 金黄色葡萄球菌的基因还参与感染通路。

### 3 讨论

#### 3.1 功能作图模型和微生物动态复杂性状分析

微生物互作在自然界普遍存在, 一个物种与其他物种相互作用的模式不仅影响生态群落的结构<sup>[35]</sup>, 还可以推动生物的进化<sup>[23]</sup>, 因此阐明这些相互作用的机制尤为重要。许多研究者利用 GWAS 来揭示微生物复杂性状的遗传机制<sup>[36-37]</sup>, 但传统方法只能识别与特定时间点的表型相关 QTL, 功能作图则可以检测与性状的整个发育过程相关的 QTL<sup>[38]</sup>。本研究通过功能作图模型发现了在不同环境中影响大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长的重要 QTL, 该模型使用生长曲线方程整合了多个时间点上连续测量的表型数据, 已经广泛应用于动植物、林业和微生物等领域<sup>[11,39-41]</sup>。早期的研究表明该模型在定位影响生物生长表型的 QTL 方面是可靠的。例如, Yang 等<sup>[39]</sup>使用功能作图模型找到了在含有万古霉素的培养基中生长的金黄色葡萄球菌的表型可塑性 QTL, 获得了调节金黄色葡萄球菌抗生素压力的基因。

目前用于 QTL 定位的方法有很多, 近年来定位与生物动态复杂性状相关 QTL 的统计模型方法取得了很大进展。功能作图模型就是最重要的方法之一, 它考虑了表型形成的生物学机制和动态过程, 将生长方程整合到统计模型中, 以自

上而下的方式直接通过生长性状的观测数据估计生长曲线差异, 定位与性状的整个发育过程相关的 QTL<sup>[11,16]</sup>。还有一种以自下而上的方式建立的统计模型, 使用与 QTL 有关的生长参数重建生物生长发育轨迹, 识别与特定生长参数有关的 QTL, 对于表征生长轨迹的关键发育特征更为有效<sup>[42]</sup>。在本课题组前期的研究中, Liang 等<sup>[2]</sup>使用第 2 种方法研究了 45 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的相互作用, 分别使用参数  $\lambda$  (迟缓期)、R (对数生长期)和 A (稳定期)来描述细菌生长曲线的 3 个连续阶段, 然后基于生长参数进行关联分析, 获得不同生长参数下的曼哈顿图。该研究发现了影响细菌相互作用的 QTL, 并阐明了有多个基因共同作用来影响细菌间的相互作用<sup>[2]</sup>。自上而下和自下而上的方法具有互补性<sup>[42]</sup>, 但是功能作图以自上而下的方式使用观测的表型信息, 对于描述生物的整体生长轨迹更有优势, 已被证明是研究动态复杂性状遗传机制的有力工具<sup>[11,38-41]</sup>。本研究结合生长曲线将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长丰度与基因型相关联, 借助功能作图自上而下直接从表型入手, 发掘了更多的显著 QTL, 获得了与细菌适应环境压力有关的基因。

#### 3.2 微生物相互作用的 QTL 定位和基因功能注释

目前微生物的相互作用是微生物研究的重要组成部分, 解析在互作过程中发挥显著作用的基因是一项重要的研究内容<sup>[23]</sup>。通过定位影响微生物互作的 QTL, 有助于找到影响种间相互作用的基因, 从而揭示在微生物互作过程中发挥关键作用基因的调控机制。本课题组前期的研究中还使用了一些不同的方法来研究大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的相互作用, 陈南等<sup>[43]</sup>和 He 等<sup>[12]</sup>使用静态 GWAS 方法将这两种细菌的生长表型数据和基因型相结合, 发现了 *rpoB*、*rpoC*、*murE*、*yjjw* 和 *rpoS* 等基因对大肠杆菌的

生长产生了影响。Jiang 等<sup>[8]</sup>和张佐然等<sup>[23]</sup>应用系统作图(systems mapping)模型研究了 45 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的互作遗传机制,发现了大肠杆菌的 *murE*、*relA*、*yjjw* 和 *nhaR* 等基因以及金黄色葡萄球菌 *ggt*、*ebp* 和 *SAOUHSC\_00316* 等基因对菌株互作产生了影响。在此基础上,本研究进一步扩大样本量,通过功能作图找到了影响大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长互作的重要 QTL,并定位到了这些 QTL 所在的候选基因。在这些候选基因中,金黄色葡萄球菌的 *scdA*、*sdrD* 和 *SAOUHSC\_00316*,以及大肠杆菌的 *rpnA*、*gutQ* 和 *tmcA* 等基因在之前的研究中已被报道<sup>[2,8,12]</sup>;同时,我们还定位到了之前的研究未分析到的基因,包括大肠杆菌的 *phr*、*nagC*、*priA*、*rbn*、*ppsA*、*eptA* 和 *flim* 基因及金黄色葡萄球菌的 *sdrC*、*guaA*、*coa* 和 *ftsA* 等基因。

通过基因功能注释,发现部分基因功能已有相关文献报道。大肠杆菌 *nagC* (QTL701127)编码一种转录调节因子 NagC,功能是协调氨基糖、氨基葡萄糖和 N-乙酰葡糖胺的生物合成及其分解代谢,特异性调节 N-乙酰葡糖胺和葡萄糖的转运和利用<sup>[29]</sup>。*flm* (QTL2020923)编码大肠杆菌鞭毛运动开关蛋白 FliM, FliM 是鞭毛运动开关复合体的 3 个组成部分之一,可在鞭毛组装、旋转和顺时针/逆时针方向控制中起作用,细菌可以通过调节鞭毛的旋转来引导它们游向有利的刺激物<sup>[30]</sup>。*phr* (QTL740317)编码 DNA 光解酶,通过光诱导的电子转移机制修复被紫外线损伤的 DNA 中的环丁烷嘧啶二聚体<sup>[44]</sup>。大肠杆菌 *eptA* (QTL4335018)编码磷酸乙醇胺转移酶,若无 EptA,致病菌对多粘菌素和宿主免疫系统的清除变得更加敏感,因此 EptA 可能是药物开发的有效靶标,以对抗细菌对多粘菌素的耐药性<sup>[45]</sup>。*ppsA* (QTL1785589)编码磷酸烯醇丙酮酸合成

酶,是最常见的代谢基因之一,表达水平会影响大肠杆菌的生长<sup>[46]</sup>。*priA* (QTL4126424)基因编码的蛋白具有解旋酶活性,在大肠杆菌中参与重新启动断裂的复制叉,依赖于 PriA 的复制重启机制是细菌复制重启的主要途径<sup>[47]</sup>。金黄色葡萄球菌基因 *sdrC* (QTL550426, QTL550312)编码与细胞表面相关的钙结合蛋白,可以通过介导与细胞外基质组分的相互作用促进细菌黏附; SdrC 蛋白可以作为黏附素,通过分子间相互作用形成独特的二聚体,有助于金黄色葡萄球菌的致病性<sup>[32]</sup>。在金黄色葡萄球菌的表型可塑性试验中,也定位到 *sdrC* 基因发挥作用<sup>[39]</sup>。*ftsA* (QTL1101515)基因编码细胞分裂蛋白, Yan 等<sup>[48]</sup>通过酵母双杂交试验发现了金黄色葡萄球菌 FtsA 和 FtsZ 蛋白之间的相互作用,证明了 FtsA 在细菌细胞分裂中发挥关键作用。*sdrD* (QTL552238)基因编码的含丝氨酸-天冬氨酸重复序列的蛋白 SdrD,促进细菌对宿主细胞的黏附;有研究表明金黄色葡萄球菌 SdrD 与 desmoglein 1 (Dsg1)蛋白之间的相互作用对黏附宿主细胞很重要<sup>[49]</sup>。*scdA* (QTL251034)基因编码细胞壁生物合成蛋白,参与细胞壁合成、周转等生命活动<sup>[50]</sup>,在金黄色葡萄球菌细胞分裂中起重要作用<sup>[33]</sup>。已有文献报道证明金黄色葡萄球菌的 *scdA* 基因在共同培养环境下显著提高了表达量,以维持自身在培养体系中的稳定性<sup>[50]</sup>。通过 QTL 调控网络、基因功能注释和富集分析发现,许多基因在代谢、繁殖以及调控中发挥作用,这些基因的功能都可能在一定程度上影响微生物的生长,从而影响微生物在不同环境中的生长表型变化以及相互作用方式<sup>[23]</sup>。

## 4 结论

本研究通过在实验室进行短期微生物互作培养,定位到了不同环境中影响微生物竞争互作



的 QTL。借助功能作图揭示了大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的竞争互作关系, 发现了大肠杆菌 *phr*、*nagC*、*eptA*、*ppsA*、*priA*、*flim* 和金黄色葡萄球菌 *scdA*、*sdrC*、*sdrD*、*ftsA* 等与生长有关的重要基因。本研究证明了功能作图在研究物种竞争与互作方面的优势和分析动态复杂性状的能力, 为生物种间互作研究提供了不同的策略方法。

## REFERENCES

- [1] MADSEN JS, SØRENSEN SJ, BURMØLLE M. Bacterial social interactions and the emergence of community-intrinsic properties[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 42: 104-109.
- [2] LIANG YJ, LI BB, ZHANG Q, ZHANG SL, HE XQ, JIANG LB, JIN Y. Interaction analyses based on growth parameters of GWAS between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 34.
- [3] WIDDER S, ALLEN RJ, PFEIFFER T, CURTIS TP, WIUF C, SLOAN WT, CORDERO OX, BROWN SP, MOMENI B, SHOU WY, KETTLE H, FLINT HJ, HAAS AF, LAROCHE B, KREFT JU, RAINEY PB, FREILICH S, SCHUSTER S, MILFERSTEDT K, van der MEER JR, et al. Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(11): 2557-2568.
- [4] WANG HJ, YE MX, FU YR, DONG A, ZHANG MM, FENG L, ZHU XL, BO WH, JIANG LB, GRIFFIN CH, LIANG D, WU RL. Modeling genome-wide by environment interactions through omnigenic interactome networks[J]. *Cell Reports*, 2021, 35(6): 109114.
- [5] DAVEY JW, HOHENLOHE PA, ETTER PD, BOONE JQ, CATCHEN JM, BLAXTER ML. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12(7): 499-510.
- [6] KASTMAN EK, KAMELAMELA N, NORVILLE JW, COSETTA CM, DUTTON RJ, WOLFE BE. Biotic interactions shape the ecological distributions of *Staphylococcus* species[J]. *mBio*, 2016, 7(5): e01157-16.
- [7] RIVETT DW, BELL T. Abundance determines the functional role of bacterial phylotypes in complex communities[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3(7): 767-772.
- [8] JIANG LB, HE XQ, JIN Y, YE MX, SANG MM, CHEN N, ZHU J, ZHANG ZR, LI JT, WU RL. A mapping framework of competition-cooperation QTLs that drive community dynamics[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 3010.
- [9] READ TD, MASSEY RC. Characterizing the genetic basis of bacterial phenotypes using genome-wide association studies: a new direction for bacteriology[J]. *Genome Medicine*, 2014, 6(11): 109.
- [10] BUCHANAN CJ, WEBB AL, MUTSCHALL SK, KRUCZKIEWICZ P, BARKER DOR, HETMAN BM, GANNON VPJ, ABBOTT DW, THOMAS JE, INGLIS GD, TABOADA EN. A genome-wide association study to identify diagnostic markers for human pathogenic *Campylobacter jejuni* strains[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1224.
- [11] WU RL, LIN M. Functional mapping—how to map and study the genetic architecture of dynamic complex traits[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7(3): 229-237.
- [12] HE XQ, JIN Y, YE MX, CHEN N, ZHU J, WANG JQ, JIANG LB, WU RL. Bacterial genetic architecture of ecological interactions in Co-culture by GWAS-taking *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as an example[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2332.
- [13] WANG Z, WANG NT, WU RL, WANG ZH. fGWAS: an R package for genome-wide association analysis with longitudinal phenotypes[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2018, 45(7): 411-413.
- [14] DAS K, LI JH, WANG Z, TONG CF, FU GF, LI Y, XU M, AHN K, MAUGER D, LI RZ, WU RL. A dynamic model for genome-wide association studies[J]. *Human Genetics*, 2011, 129(6): 629-639.
- [15] HUANG C, THOMPSON P, WANG YL, YU Y, ZHANG JW, KONG DH, COLEN RR, KNICKMEYER RC, ZHU HT. FGWAS: Functional genome wide association analysis[J]. *NeuroImage*, 2017, 159: 107-121.
- [16] MA CX, CASELLA G, WU RL. Functional mapping of quantitative trait loci underlying the character process: a theoretical framework[J]. *Genetics*, 2002, 161(4): 1751-1762.
- [17] LI Q, HUANG ZW, XU M, WANG CG, GAI JY, HUANG YJ, PANG XM, WU RL. Functional mapping of genotype-environment interactions for soybean growth by a semiparametric approach[J]. *Plant Methods*, 2010, 6: 13.

- [18] ZHAO XY, TONG CF, PANG XM, WANG Z, GUO YQ, DU F, WU RL. Functional mapping of ontogeny in flowering plants[J]. Briefings in Bioinformatics, 2012, 13(3): 317-328.
- [19] GAN JW, CAO YG, JIANG LB, WU RL. Mapping covariation quantitative trait loci that control organ growth and whole-plant biomass[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 719.
- [20] YE MX, JIANG LB, MAO K, WANG YQ, WANG Z, WU RL. Functional mapping of seasonal transition in perennial plants[J]. Briefings in Bioinformatics, 2015, 16(3): 526-535.
- [21] MACFADDIN JF. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria[M]. Baltimore (Md.): Williams and Wilkins, 1985.
- [22] 梁雅静. 动态 GWAS 研究三种细菌互作遗传机制及基因功能验证[D]. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2020.
- LIANG YJ. Dynamic GWAS study on genetic mechanism of three bacterial interactions and gene function verification[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing Forestry University, 2020 (in Chinese).
- [23] 张佐然, 李金婷, 梁雅静, 张琦, 金一, 何晓青. 利用系统作图(Systems mapping)研究大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的互作遗传机制[J]. 微生物学通报, 2019, 46(2): 292-300.
- ZHANG ZR, LI JT, LIANG YJ, ZHANG Q, JIN Y, HE XQ. Analysis of interaction mode between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by systems mapping[J]. Microbiology China, 2019, 46(2): 292-300 (in Chinese).
- [24] 潘东东, 李正帮, 张维, 李启寨. 全基因组关联研究综述[J]. 应用概率统计, 2014, 30(1): 84-103.
- PAN DD, LI ZB, ZHANG W, LI QZ. The review of genome-wide association studies[J]. Chinese Journal of Applied Probability and Statistics, 2014, 30(1): 84-103 (in Chinese).
- [25] KIM BR, MCMURRY T, ZHAO W, WU RL, BERG A. Wavelet-based functional clustering for patterns of high-dimensional dynamic gene expression[J]. Journal of Computational Biology, 2010, 17(8): 1067-1080.
- [26] WU RL, JIANG LB. Recovering dynamic networks in big static datasets[J]. Physics Reports, 2021, 912: 1-57.
- [27] JIANG LB, LIU JY, ZHU XL, YE MX, SUN LD, LACAZE X, WU RL. 2HiGWAS: a unifying high-dimensional platform to infer the global genetic architecture of trait development[J]. Briefings in Bioinformatics, 2015, 16(6): 905-911.
- [28] DONG A, FENG L, YANG DC, WU S, ZHAO JS, WANG J, WU RL. FunGraph: a statistical protocol to reconstruct omnigenic multilayer interactome networks for complex traits[J]. STAR Protocols, 2021, 2(4): 100985.
- [29] PLUMBRIDGE J. DNA binding sites for the Mlc and NagC proteins: regulation of nagE, encoding the N-acetylglucosamine-specific transporter in *Escherichia coli*[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(2): 506-514.
- [30] SARKAR MK, PAUL K, BLAIR DF. Subunit organization and reversal-associated movements in the flagellar switch of *Escherichia coli*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(1): 675-684.
- [31] YAMAJI K, TANIGUCHI R, URANO H, OGASAWARA H. Roles of methionine and cysteine residues of the *Escherichia coli* sensor kinase HprS in reactive chlorine species sensing[J]. FEBS Letters, 2023, 597(4): 573-584.
- [32] WANG JC, ZHANG M, WANG MZ, ZANG JY, ZHANG X, HANG TR. Structural insights into the intermolecular interaction of the adhesin SdrC in the pathogenicity of *Staphylococcus aureus*[J]. Acta Crystallographica Section F, Structural Biology Communications, 2021, 77(Pt 2): 47-53.
- [33] BRUNSHILL EW, DE JONGE BLM, BAYLES KW. The *Staphylococcus aureus* *scdA* gene: a novel locus that affects cell division and morphogenesis[J]. Microbiology (Reading, England), 1997, 143 (Pt 9): 2877-2882.
- [34] BECKER S, FRANKEL MB, SCHNEEWIND O, MISSIAKAS D. Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(4): 1574-1579.
- [35] BASCOMPTE J. Structure and dynamics of ecological networks[J]. Science, 2010, 329(5993): 765-766.
- [36] COLLINS C, DIDELOT X. A phylogenetic method to perform genome-wide association studies in microbes that accounts for population structure and recombination[J]. PLoS Computational Biology, 2018, 14(2): e1005958.
- [37] RONG MD, ZHENG XY, YE MX, BAI J, XIE XM, JIN Y, HE XQ. Phenotypic plasticity of *Staphylococcus aureus* in liquid medium containing vancomycin[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 809.
- [38] Li ZT, SILLANPAA MJ. Dynamic quantitative trait locus analysis of plant phenomic data[J]. Trends in Plant Science, 2015, 20(12): 822-833.
- [39] YANG DC, ZHENG XY, JIANG LB, YE MX, HE XQ, JIN Y, WU RL. Functional mapping of phenotypic

- plasticity of *Staphylococcus aureus* under vancomycin pressure[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 696730.
- [40] JIANG LB, CLAVIJO JA, SUN LD, ZHU XL, BHAKTA MS, GEZAN SA, CARVALHO M, VALLEJOS CE, WU RL. Plastic expression of heterochrony quantitative trait loci (hQTLs) for leaf growth in the common bean (*Phaseolus vulgaris*)[J]. *The New Phytologist*, 2015, 207(3): 872-882.
- [41] ZHAO W, ZHU J, GALLO-MEAGHER M, WU RL. A unified statistical model for functional mapping of environment-dependent genetic expression and genotype×environment interactions for ontogenetic development[J]. *Genetics*, 2004, 168(3): 1751-1762.
- [42] WEI K, WANG J, SANG MM, ZHANG SL, ZHOU HC, JIANG LB, CLAVIJO MICHELANGELO JA, VALLEJOS CE, WU RL. An ecophysiological based mapping model identifies a major pleiotropic QTL for leaf growth trajectories of *Phaseolus vulgaris*[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2018, 95(5): 775-784.
- [43] 陈南, 朱璟, 叶梅霞, 金一, 何晓青, 邬荣领. GWAS 研究大肠杆菌和金黄色葡萄球菌种间互作进化机制[J]. *微生物学报*, 2017, 57(4): 526-538.
- CHEN N, ZHU J, YE MX, JIN Y, HE XQ, WU RL. Interactions between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* determined by genome-wide association analysis[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(4): 526-538 (in Chinese).
- [44] XU L, MU WM, DING YW, LUO ZF, HAN QK, BI FY, WANG YZ, SONG QH. Active site of *Escherichia coli* DNA photolyase: Asn378 is crucial both for stabilizing the neutral flavin radical cofactor and for DNA repair[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(33): 8736-8743.
- [45] SAMANTHA A, VRIELINK A. Lipid A phosphoethanolamine transferase: regulation, structure and immune response[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(18): 5184-5196.
- [46] CONRAD TM, JOYCE AR, APPLEBEE MK, BARRETT CL, XIE B, GAO Y, PALSSON BØ. Whole-genome resequencing of *Escherichia coli* K-12 MG1655 undergoing short-term laboratory evolution in lactate minimal media reveals flexible selection of adaptive mutations[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(10): R118.
- [47] LEROUX M, JANI N, SANDLER SJ. A *priA* mutant expressed in two pieces has almost full activity in *Escherichia coli* K-12[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(17): e00267-17.
- [48] YAN K, PEARCE KH, PAYNE DJ. A conserved residue at the extreme C-terminus of FtsZ is critical for the FtsA-FtsZ interaction in *Staphylococcus aureus*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 270(2): 387-392.
- [49] ASKARIAN F, AJAYI C, HANSEN AM, van SORGE NM, PETERSEN I, DIEP DB, SOLLID JUE, JOHANNESSEN M. The interaction between *Staphylococcus aureus* SdrD and desmoglein 1 is important for adhesion to host cells[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 22134.
- [50] 朱璟, 王峥鉴, 张佐然, 李金婷, 梁雅静, 金一, 何晓青. 不同培养条件下金黄色葡萄球菌表型可塑性研究[J]. *微生物学杂志*, 2019, 39(4): 10-16.
- ZHU J, WANG ZJ, ZHANG ZR, LI JT, LIANG YJ, JIN Y, HE XQ. Phenotypic plasticity of *Staphylococcus aureus* under different culture conditions[J]. *Journal of Microbiology*, 2019, 39(4): 10-16 (in Chinese).