

Redes multicapa como herramienta de análisis de la microbiota

Víctor Lázaro Vidal¹, Zyanya Mayoral Peña², Etzel Garrido², Roberto Álvarez Martínez¹

Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales, Laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva.

¹ Laboratorio de Biología Cuantitativa y Sistemas Complejos

² Laboratorio de Evolución Teórica y Aplicada

Datos de contacto: Víctor Lázaro Vidal lav_victor@outlook.com,

Roberto Álvarez Martínez roberto.alvarez@uaq.edu.mx

Resumen

El todo es más que la suma de sus partes es una frase que expresa la esencia de los sistemas complejos, que son el producto de la interacción entre sus componentes. La teoría de redes ha sido una herramienta muy útil para estudiar este tipo de sistemas, de los cuales podemos encontrar abundantes ejemplos en distintas disciplinas, y la biología no es la excepción. Redes de regulación transcripcional, ecosistemas, la comunicación entre neuronas o la regulación endocrina son algunos ejemplos. Sin embargo, las redes no suelen ser sistemas aislados y también pueden ser parte de sistemas más grandes a los que se pueden conectar con otras redes a su vez. Recientemente, el concepto de redes multicapa ha adquirido importancia como una herramienta útil en el estudio de los sistemas complejos (Bianconi, 2018). En el presente trabajo analizamos datos de secuenciación del gen 16S que contienen la abundancia de ASV (*Amplicon Sequence Variant*) bacterianos asociados al escarabajo *Lema daturaphila* y la planta de la que este se alimenta, la solanácea *Datura inoxia*. Construimos a partir de estos, redes de coabundancia que posteriormente fueron analizadas bajo el enfoque de las redes múltiples.

Palabras clave: Redes multicapa, microbiota, redes temporales, redes multiplex, sistemas complejos, abundancias bacterianas.

Abstract

The whole is more than the sum of its parts is a phrase that expresses the essence of complex systems, which are the product of the interaction between their components. Network theory has been a very useful tool to study this type of systems, of which we can find abundant examples in different disciplines, and biology is no exception. Transcriptional regulatory networks, ecosystems, communication between neurons or endocrine regulation are some examples. However, networks are not usually isolated systems and can also be part of larger systems that can be connected to other networks in turn. Recently, the concept of multilayer networks has gained importance as a useful tool in the study of complex systems (Bianconi, 2018). In the present work, we analyzed 16S gene sequencing data containing bacterial ASV (*Amplicon Sequence Variant*) abundance associated with the beetle *Lema daturaphila* and the plant on which it feeds, the solanaceous plant *Datura inoxia*. We constructed from these, coabundance networks that were subsequently analyzed under the multiple networks approach.

Key words: multilayer networks, microbiota, temporal networks, multiplex networks, complex systems, bacterial abundances.

Introducción

Las redes son objetos matemáticos muy útiles en el estudio de sistemas complejos, es decir, en aquellos que están conformados por una serie de componentes que interactúan entre sí. Las redes que representan sistemas biológicos a menudo presentan particularidades en su arquitectura, como sucede, por ejemplo, en cascadas de señalización celular. Estas cuentan con redes robustas, pues unos pocos elementos mantienen la mayoría de las conexiones, haciendo que la red sea poco susceptible a perder funcionalidad ante ataques aleatorios a su estructura (Zheng et al., 2019). Esta característica es particularmente importante, ya que, si hablamos de sistemas de regulación génica dirigidos a mantener el funcionamiento de una célula, será más probable que un ataque aleatorio o no dirigido afecte a un componente no esencial de la red, a que interfiera con un elemento que sí resulte ser de vital importancia (Aleta & Moreno, 2019).

Sin embargo, las redes no suelen ser sistemas aislados y, al igual que sus componentes, las redes interactúan entre sí, con lo que generan nuevos fenómenos emergentes a distintos niveles. El enfoque de estudiar no solo las interacciones dentro de una red individual sino también las que ocurren con otras redes es lo que conocemos como redes multicapa (Zheng et al., 2019). A pesar de que este concepto surgió en el ámbito de las ciencias sociales, este enfoque ha tomado fuerza en distintas ramas del conocimiento, incluyendo a las ciencias biológicas (Bianconi, 2018).

Las redes multicapa pueden ser utilizadas para analizar la forma en la cual distintos sistemas interactúan o la forma en la que estos evolucionan en el tiempo (Bianconi, 2018). Uno de estos enfoques son las redes temporales, donde cada capa corresponde a un estado de la red en una fracción determinada de tiempo, por lo que permite visualizar cómo cambia la estructura de dicha red con respecto al tiempo (Zuzek et al., 2015). También tenemos el

caso de sistemas que pueden interactuar a distintos niveles, como los mecanismos de regulación de una célula, en la que distintas proteínas pueden interactuar directamente con el ADN o ARNs y bloquear el procesamiento de algunos transcritos. Esto significa que cada una de las capas de la multired puede interactuar con cualquiera de los nodos en las otras capas (Bianconi, 2018). Finalmente, podemos destacar el caso de las redes multiplex, que representan a conjuntos de nodos que interactúan de formas distintas bajo diferentes condiciones, como puede ser la regulación génica de un tejido en pacientes sanos con respecto a pacientes con cáncer (Aleta & Moreno, 2019). Por su puesto, la microbiota también ha podido ser analizada bajo este enfoque, pues permite estudiar la arquitectura de la red a través del tiempo o bajo dos condiciones distintas. Un ejemplo son las interacciones entre insecto, planta y microbiota, donde ésta última media la relación de ciertos insectos con las plantas de las que se alimentan.

Las plantas, como cualquier organismo multicelular, se encuentran constantemente en contacto con poblaciones bacterianas, con algunas de las cuales han desarrollado relaciones simbióticas. En las raíces de las plantas, se han identificado comunidades de bacterias (rizobacterias) promotoras del crecimiento de las plantas o PGPB, por sus siglas en inglés. Estas actúan mediante diversos mecanismos que incluyen favorecer la biodisponibilidad de minerales solubles a las raíces, inhibir la proliferación de bacterias patógenas, la secreción de ciertas enzimas y la regulación de fitohormonas. A menudo estas bacterias actúan en conjunto con comunidades de hongos conocidos como micorrizas, suministrando agua y soporte a la planta, que a cambio provee de azúcares derivados de la fotosíntesis (Zytynska, 2021). Se ha documentado que algunas bacterias son capaces de ofrecer resistencia contra ciertas plagas, tal es el caso de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas putida* y *Acidovorax radialis*, que se han asociado a una reducción en las poblaciones de

áfidos. Este efecto lo logran potenciando la producción de compuestos fenólicos volátiles y fitohormonas como el ácido jasmónico y el ácido salicílico en las hojas (Haney et al., 2018). Podemos destacar también que el contacto con las lombrices de tierra se ha asociado a una mejora en la integración de las raíces con la microbiota, debido a que enriquecen y transportan poblaciones de rizobacterias y la biodisponibilidad de algunos nutrientes. Esta relación recurrente entre plantas con insectos con los que poseen un contacto frecuente implica también el intercambio de parte de la microbiota de ambos (Arora & Malik, 2021). El papel que la microbiota juega en esta relación es aún motivo de investigación, por lo que herramientas como las redes multicapa pueden ayudarnos a entender mejor cómo sucede esta dependencia.

En este trabajo analizamos y contrastamos los bacteriomas de dos interactuantes, el insecto *Lema daturaphila* y su planta huésped *Datura innoxia*, utilizando el enfoque de las redes multicapa. Con esto, se pretende identificar nodos relevantes en la arquitectura de la red, analizar la distribución de los grandes grupos taxonómicos, identificar comunidades bacterianas altamente interconectadas y, finalmente, emplear dicha información para identificar si existe o no una posible relación entre la importancia de los nodos y su funcionalidad biológica para los huéspedes.

Metodología

Se analizó un conjunto de datos de secuenciación, obtenidos en el laboratorio de Evolución Teórica y Aplicada de la UAQ, de la microbiota del escarabajo *L. daturaphila* y la planta de la que este se alimenta, la solanácea *D. innoxia*. El insecto *Lema daturaphila* es un escarabajo de la familia *Chrysomelidae*, caracterizado por su color amarillo anaranjado brillante. Sus élitros están marcados con líneas de color marrón oscuro, una a cada lado y otra a lo

largo de la sutura entre las alas (Goldberg, 2020). En general, el género *Lema* es considerado plaga de varias especies de solanáceas, como el jitomate, la papa y algunas ocasiones en el tomatillo (Kogan et al., 1970).

Como datos de entrada para construir las redes, se empleó una tabla de abundancias absolutas de los ASV y una tabla de taxones, que contenía la clasificación de los ASV. Los datos fueron previamente obtenidos mediante la amplificación de genes 16S-rRNA bacterianos a partir de muestras de la microbiota del escarabajo (huevos, intestino y excremento) y de la solanácea (endófitos, epifitos y semillas); previamente se colapsaron las tablas a nivel género y se eliminaron todos los ASV que carecían de una clasificación a dicho nivel taxonómico.

Para la realización de este trabajo, se utilizó la versión 4.1.0 (2021-05-18) del lenguaje de programación R. Se emplearon los paquetes *igraph*, *phyloseq*, *SpiecEasi*, *minet* y *muxViz* de dicho lenguaje. Algunos de los paquetes están disponibles en CRAN y otros fueron descargados de repositorios de GitHub o del proyecto para análisis de datos genómicos Bioconductor (Csardi & Nepusz, 2006; McMurdie & Holmes, 2013; Kurtz et al., 2021; Meyer et al., 2008; De Domenico, 2015).

Se utilizaron tres algoritmos distintos para inferir redes de coabundancia a partir de los datos obtenidos: *SpiecEasi*, *Aracne* y *SparCC* [12, 13]. El algoritmo *SparCC* del paquete *SpiecEasi* estimó las conexiones entre nodos a partir de la covarianza de los datos. Por su parte, el algoritmo *Aracne* del paquete *minet* calcula las correlaciones de todos los tripletes posibles entre nodos y elimina de cada conjunto el que posea una conexión más débil. El algoritmo *SPIEC-EASI* del *SpiecEasi* estimó la independencia condicional entre nodos mediante el método de vecindad (MB) y el de covarianza inversa (Glasso) (Kurtz et al., 2021).

Previamente se aislaron los datos correspondientes a cada una de las capas de las redes. En el primer caso, se separaron los datos muestrales que corresponden al escarabajo *L. daturaphila* y a la solanácea *D. inoxia*. Se infirieron redes de coabundancia para cada uno de los datos aislados y, posteriormente, se ajustó el tamaño de los nodos como función de la abundancia relativa de cada nodo. También se crearon funciones, en R, que nos permitieran asociar cada nodo al *phylum* al que pertenecen. Después, se analizó la topología de las redes obtenidas mediante un análisis de centralidad, el agrupamiento de los nodos y la distribución de las conexiones.

Se ensamblaron las redes multicapa mediante los paquetes muxViz y multinet. Para el caso de la red escarabajo-solanácea, se consideró el enfoque de una red multiplex, debido a que se buscaba identificar las similitudes y discrepancias entre la microbiota del insecto y la de su fuente de alimento. Además, se comparó la importancia de los nodos entre las capas de las multirredes mediante distintas medidas de centralidad, así como también se compararon los agrupamientos identificados en cada una de las capas. También, se analizó la abundancia de los *phyla* en las muestras tomadas de distintas secciones del insecto (huevos, intestino y excremento) y de la planta (endófitos, epifitos y semillas). Finalmente, se realizó una prueba de t-Student a los nodos más abundantes con el fin de identificar aquellos que difirieran significativamente entre capas.

Resultados

El análisis de la distribución de las conectividades de las redes revela, tal y como se había planteado en la hipótesis, que se trataba de una distribución de cola larga debido a que la mayor parte de las conexiones se concentraban en unos pocos nodos. Ninguna de las redes poseía una distribución unimodal, en particular para la distribución normal ($P < 0.05$). De los tres algoritmos empleados en la inferencia de redes, solo Aracne y SparCC fueron utilizados en la construcción de las redes multicapa, con lo que se

descartó el uso de SPIEC-EASI para posteriores análisis. Este último está basado en la independencia condicional de los nodos, que es mucho más selectivo que los otros dos algoritmos, por lo que arrojó redes inconexas.

Las redes multicapa construidas con SparCC y Aracne de escarabajo-solanácea, en ambos casos, revelaron a Proteobacteria como el *phylum* con mayor abundancia y conectividad en ambas capas (Figura 1). Del mismo modo, la abundancia relativa de este *phylum* en las muestras de todos los tejidos examinados fue dominante.

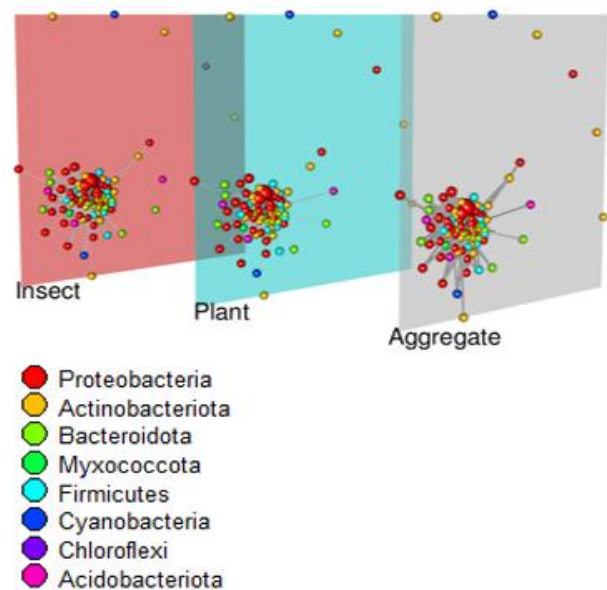


Figura 1. Red multiplex (SparCC) de escarabajo-solanácea, incluyendo la capa *aggregate*, que representa la suma de las conexiones de todas las capas anteriores. El tamaño de los nodos está en función de su abundancia relativa, cuyo color está asociado al *phylum* al que pertenecen. Fuente: Elaboración propia.

En las muestras extraídas del escarabajo, se encontró una gran abundancia de las gammaproteobacterias *Serratia* y *Pseudomonas*, pero una abundancia muy baja para el resto de ASV presentes. Por su parte, la microbiota de la solanácea mostró una mayor diversidad de ASV con abundancias altas; dentro de los que podemos destacar gammaproteobacterias como *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Siccibacter*,

Janthinobacterium y *Massilia*. En particular, las muestras de excremento e intestino del insecto mostraron una diversidad de *phyla* muy baja ante la abundancia dominante de Proteobacteria. Lo mismo sucede con las muestras endófitas extraídas de la planta; aquellas con mayor diversidad fueron las extraídas de los huevos del insecto y las muestras de epífitas de la solanácea, que también mostraron una presencia importante de Actinobacteria y Bacteroidetes, y en menor medida también de Firmicutes (Figura 2).

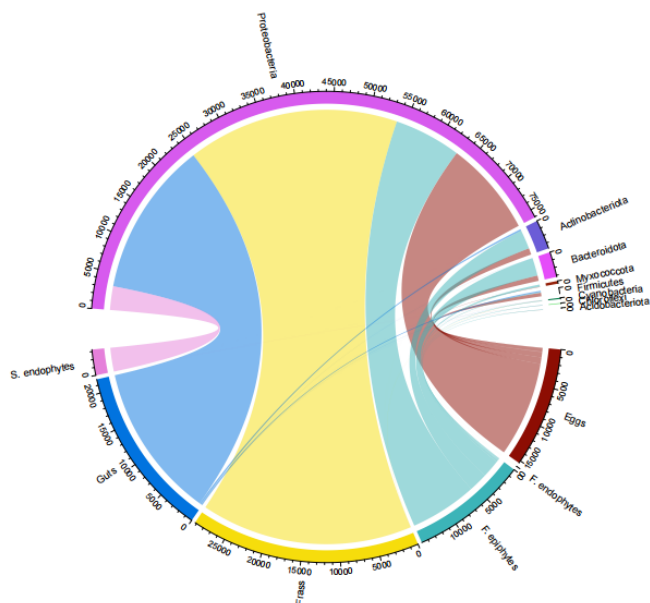


Figura 2. Se analizó la distribución de los *phylum* en las muestras de los distintos tejidos, de donde se muestra una presencia dominante de Proteobacteria en todas las muestras, seguido en menor medida por Actinobacteria y Bacteroidetes. Fuente: Elaboración propia.

El análisis de centralidades por conectividad (*degree*) reveló que, a pesar de la variación de las abundancias entre ambos organismos, las Proteobacterias conservan un alto grado de centralidad entre capas; esto sugiere que podrían tener una importancia a nivel funcional en la interacción planta-insecto (Figura 3). Dentro de este grupo podemos destacar a *Siccibacter* y *Pantoea* en la microbiota del escarabajo, mismas que también mostraron previamente una abundancia relativa alta. El género *Salmonella* también mostró un *degree* alto

en la red SparCC, aunque no se encontrara dentro de los OTUs con mayor abundancia relativa.

En el caso de la solanácea, la diversidad de especies con un *degree* elevado fue mucho mayor. Destacan alfaproteobacterias como *Sphingomonas*, *Skermanella*, *Methylobacterium* y *Microvirga*, además de gammaproteobacterias como *Janthinobacterium* y *Massilia*. En menor proporción se encontraron también bacterias ajenas al *phylum* Proteobacteria como *Actinoplanes*, *Hymenobacter* y *Cystobacter*, pertenecientes a Actinobacteria, Bacteroidetes y Myxococcota, respectivamente.

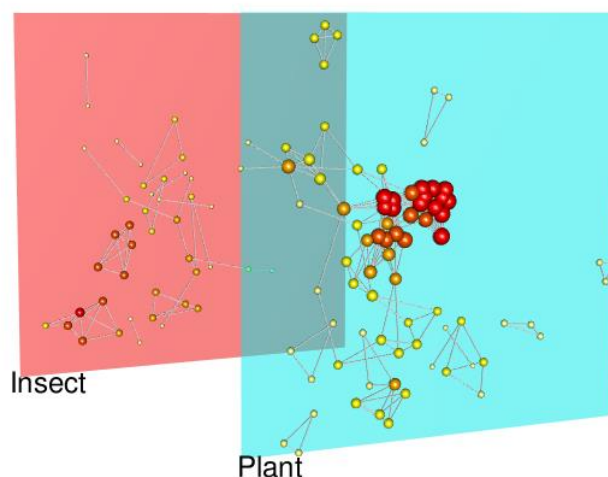


Figura 3. Red multiplex (ARACNe) de la centralidad por *degree* entre las capas. Nodos con tonos más próximos al rojo indican un mayor número de conexiones. Fuente: Elaboración propia.

El análisis de centralidad por cercanía mostró valores altos para casi todos los nodos debido a la alta interconectividad de los agrupamientos. Del mismo modo, no se encontró consenso al respecto de la centralidad por *betweenness* entre los dos algoritmos.

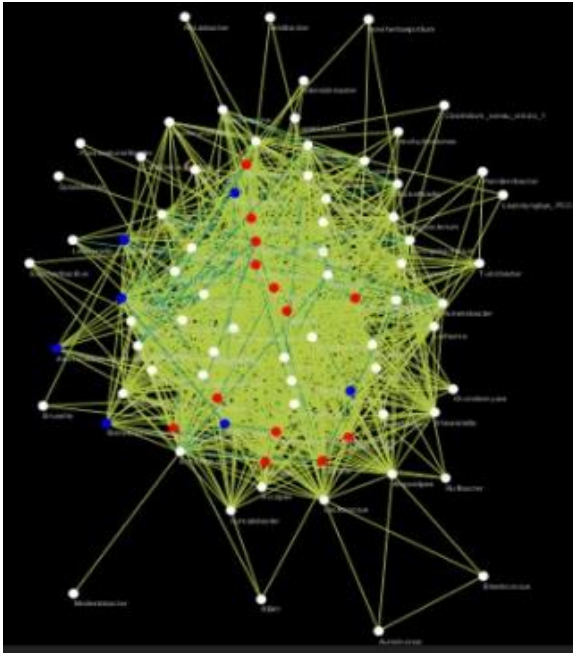


Figura 4. Gráfico de la variación de los nodos entre las capas de la red bipartita. Los nodos marcados en rojo son aquellos que poseen diferencias significativas en las abundancias entre capas, mientras que los azules son aquellos que no poseen diferencias significativas entre ambas redes. Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la abundancia de los géneros *Kosakonia*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Azomonas*, *Rhizobium*, *Achromobacter* y *Enterobacter*, todos pertenecientes al phylum Proteobacteria. Por el contrario, las proteobacterias *Serratia*, *Siccibacter*, *Escherichia*, *Shigella*, *Pantoea*, *Janthinobacterium*, *Methylobacterium* y *Salmonella*, además de Bacillus y de Firmicutes, presentaron una mayor abundancia en los tejidos del escarabajo. Sin embargo, las proteobacterias *Sphingomonas*, *Massilia*, *Rubellimicrobium* y *Skermanella*, junto a *Hymenobacter* de Bacteroidetes tenían una abundancia mayor en los tejidos vegetales (Figura 4).

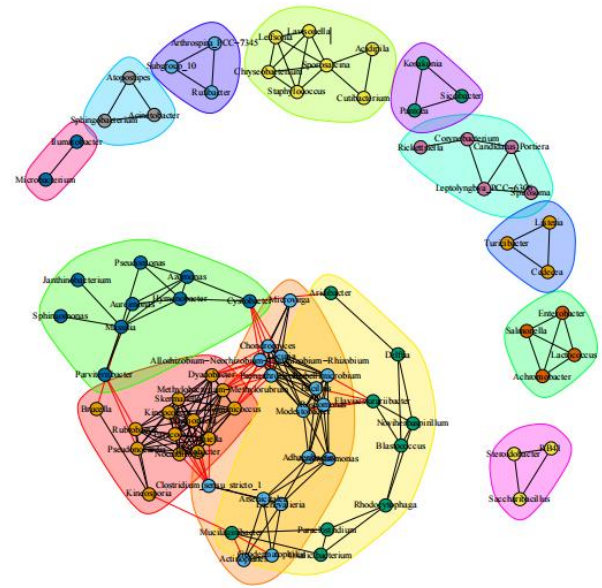


Figura 5. Agrupamiento de los nodos de una de las capas (solanácea) de la multired ARACNe escarabajo-solanácea. Los agrupamientos corresponden a regiones de la red ampliamente interconectadas en la capa de la solanácea, mismas que representan potenciales comunidades bacterianas identificadas mediante el método *Louvain*. Fuente: Elaboración propia.

El análisis de agrupamiento reveló la presencia de conjuntos de nodos interconectados en ambas capas (Figura 5). Tanto en la red inferida en SparCC como en la red ARACNe, géneros como *Siccibacter*, *Pantoea*, *Hymenobacter*, *Paracoccus*, *Microbacterium*, *Marmoricola*, *Streptococcus*, *Paraclostridium*, *Corynebacterium*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Sphingobacterium*, *Leifsonia* y *Duganella* se hallaron agrupados dentro de las capas del escarabajo. A pesar de que no hubiese consenso en los resultados arrojados por ambos algoritmos, la mayor parte de los nodos agrupados pertenecían a Proteobacteria y Actinobacteria.

En el caso de las capas de la solanácea, podemos destacar el caso de los géneros *Skermanella*, *Methylobacterium*, *Marmoricola*, *Brucella*, *Gaiella*, *Rubrobacter*, *Rhizobacter*, *Actinoplanes*, *Rubellimicrobium*, *Paenarthrobacter*, *Bacillus*, *Geodermatophilus* y *Microvirga*. Al igual que en el caso anterior, la mayor parte de los nodos

encontrados en los agrupamientos o *clusters*, pertenecen a Proteobacteria y Actinobacteria. Sin embargo, al igual que en el escarabajo, no se encontró un consenso claro en cuanto a la pertenencia de los géneros a los distintos agrupamientos, si bien su composición a nivel de *phylum* parece ser similar.

Discusión y conclusión

Aplicar las redes multicapa en el estudio de la microbiota permite identificar patrones que nos ayuden a comprender las características de las comunidades bacterianas, sin restringirse a las limitaciones que plantean las redes simples. Basado en lo anterior, se puede hacer un análisis comparativo entre las distintas capas.

Todos los análisis revelaron una amplia presencia del *phylum* Proteobacteria, un clado que, al ser muy ubicuo, es difícil de asociar a una función concreta en la relación escarabajo-solanácea. Se conoce que los organismos pertenecientes a este *phylum* se hubican a lo largo de un espectro muy amplio que incluye a especies comensales, patógenas, simbioses y bacterias de vida libre. Sin embargo, su preponderancia en ambas capas con respecto a otros *phyla* sugiere que podría tener un papel destacado en la relación entre ambos organismos interactores.

Dentro del *phylum* Proteobacteria, cabe señalar a la clase Alfaproteobacteria, algunas de las cuales están asociadas a los tejidos vegetales y se desempeñan como bacterias fijadoras de nitrógeno. Algunas de las alfaproteobacterias identificadas en las muestras de la planta, tales como *Skermanella* y *Microvirga*, se encuentran en una gran variedad de hábitats, especialmente en el suelo (Martínez-Diz et al., 2019). Lo anterior en primera instancia nos llevaría a plantear la hipótesis de que se trata de bacterias de vida libre; sin embargo, el hecho de que estas se concentran casi exclusivamente en las muestras de epífitas sugiere una relación simbiótica. En

particular, en el género *Methylobacterium* podemos encontrar simbiontes endófitas como *Methylobacterium symbioticum* y simbiontes epífitas como *Methylobacterium extorquens* (Visakorpi et al., 2021); aunque en las muestras analizadas en este trabajo estas especies solo se encontraron en las muestras de epífitas. Lo anterior sugiere que la alta abundancia relativa de alfaproteobacterias en las muestras podría estar relacionada con una asociación de tipo mutualista o comensal, como bacterias fijadoras de nitrógeno, con los tejidos superficiales de la solanácea.

Las alfaproteobacterias mencionadas anteriormente se hallaron agrupadas en un clúster junto a otras bacterias como *Hymenobacter*, *Pseudomonas*, *Janthinobacterium* y *Massilia*. Además, todos estos géneros sólo se hallaron en las muestras de epífitas, lo que sugiere que forman una comunidad bacteriana cuyos miembros podrían tener funciones biológicas comunes. Sin embargo, la escasa diversidad de bacterias detectadas en las muestras de semillas y endófitas, también sugiere que la superficie de la planta podría simplemente ser un sitio más propicio para la proliferación de este tipo de bacterias comparado con el ambiente que proporcionan los otros dos tipos de tejidos. Debido a ello, se requiere de un análisis mucho más exhaustivo que involucre agrupar los nodos por su función biológica para verificar si los agrupamientos realmente corresponden a comunidades relacionadas por su actividad biológica.

En las muestras del insecto, por el contrario, se detectó que ciertas bacterias particularmente abundantes en heces e intestinos, como *Serratia*, *Pseudomonas*, *Siccibacter*, *Pantoea* y *Salmonella*, también fueron muy abundantes en las muestras de huevos. Este resultado podría explicarse debido a que las larvas suelen cubrirse de excremento como mecanismo protector contra los depredadores (Visakorpi et al., 2021). Este fenómeno también podría explicar por qué se encontraron estas mismas bacterias en la superficie de la planta a pesar de estar

fuertemente asociadas al intestino del escarabajo. Algunas de estas bacterias podrían estar involucradas en la digestión, pero también en la protección contra patógenos; esto sucede, por ejemplo, con *Serratia symbiotica* y su asociación con los áfidos, lo que le otorga, a este último, protección contra parásitos (Renoz et al., 2019). Esta hipótesis se ve sustentada por el hecho de que *Serratia* junto a *Pseudomonas* son los géneros más abundantes en las muestras y están ampliamente distribuidas en todos los tejidos analizados del insecto.

Además, el hecho de que la mayor parte de los agrupamientos encontrados en ambas capas tuviesen una composición similar a nivel de *phylum*, destacando la presencia de proteobacterias y actinobacterias, sugiere la existencia de comunidades bacterianas que podrían estar jugando un rol sobresaliente en la interacción del bacterioma planta-insecto. Tales resultados también indican que los géneros constituyentes de las comunidades bacterianas podrían ser filogenéticamente cercanos; además de la posibilidad de que compartan características a nivel funcional, para lo cual se requiere de un análisis más exhaustivo.

En conclusión, el análisis mediante redes multicapa identificó conjuntos de bacterias que podrían, dados los datos arrojados por los análisis, tener una función biológica importante en la regulación de la propia red y algunos incluso podrían actuar como simbioses de sus organismos huésped. Sin embargo, se requiere compaginar esta información con una base de datos de modo que podamos categorizar y etiquetar los nodos e identificar si las funciones comunes asociadas a los ASV corresponden con los agrupamientos hallados en este estudio.

Información suplementaria

Los datos y el código empleados en el presente artículo están disponibles en el repositorio

<https://github.com/Nertekkad/BeetleNightshade> de GitHub.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto FOFI-UAQ (FNB-2018-21) otorgado a RAM y el proyecto PRODEP-SEP (FNB-2021-1) otorgado a EG. También agradecemos la beca de posgrado otorgada por CONACyT a ZMP.

Referencias

- Aleta, A., & Moreno, Y. (2019). Multilayer networks in a nutshell. *Annual Review of Condensed Matter Physics*, 10, 45-62.
- Arora, R., & Malik, G. (2021). Microbe-Plant-Insect Interactions: A Comparative Dissection of Interactome. In *Plant-Pest Interactions: From Molecular Mechanisms to Chemical Ecology*. 365-398. Springer, Singapore.
- Bianconi, G. (2018). Multilayer networks: structure and function. Oxford University Press.
- Csardi, G., & Nepusz, T. (2006). The igraph software package for complex network research. *InterJournal, complex systems*, 1695(5), 1-9.
- De Domenico, M., Porter, M. A., & Arenas, A. (2015). MuxViz: a tool for multilayer analysis and visualization of networks. *Journal of Complex Networks*, 3(2), 159-176.
- del Pilar Martínez-Diz, M., Andrés-Sodupe, M., Bujanda, R., Díaz-Losada, E., Eichmeier, A., & Gramaje, D. (2019). Soil-plant compartments affect fungal microbiome diversity and composition in grapevine. *Fungal Ecology*, 41, 234-244.
- Fausto, C., Mininni, A. N., Sofo, A., Crecchio, C., Scagliola, M., Dichio, B., & Xiloyannis, C. (2018). Olive orchard microbiome: characterisation of bacterial communities in soil-plant compartments and their comparison between sustainable and conventional soil management systems. *Plant Ecology & Diversity*, 11(5-6), 597-610.
- Goldberg, J. K. (2020). Towards Understanding the Mechanisms Maintaining a Stable Trichome Dimorphism in the Sacred Datura Plant (*Datura wrightii*). Doctoral dissertation, Indiana University.
- Haney, C. H., Wiesmann, C. L., Shapiro, L. R., Melnyk, R. A., O'Sullivan, L. R., Khorasani, S., ... & Ausubel, F. M. (2018). Rhizosphere-associated *Pseudomonas* induce systemic resistance to herbivores at the cost of susceptibility to bacterial pathogens. *Molecular Ecology*, 27(8), 1833-1847.

Kogan, M., & Goeden, R. D. (1970). The host-plant range of *Lema trilineata daturaphila* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the entomological Society of America*, 63(4), 1175-1180.

Kurtz, Z., Mueller, C., Miraldi, E., & Bonneau, R. (2019). SpiecEasi: Sparse inverse covariance for ecological statistical inference. *R package version*, 1(6).

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS one*, 8(4), e61217.

Meyer, P. E., Lafitte, F., & Bontempi, G. (2008). minet: AR/Bioconductor package for inferring large transcriptional networks using mutual information. *BMC bioinformatics*, 9(1), 1-10.

Renoz, F., Pons, I., Vanderpoorten, A., Bataille, G., Noël, C., Foray, V., & Hance, T. (2019). Evidence for gut associated *Serratia symbiotica* in wild aphids and ants provides new perspectives on the evolution of bacterial mutualism in insects. *Microbial ecology*, 78(1), 159-169.

Visakorpi, K., Gripenberg, S., Malhi, Y., & Riutta, T. (2021). Does insect herbivory suppress ecosystem productivity? Evidence from a temperate woodland. *bioRxiv*.

Zheng, W., Wang, D., & Zou, X. (2019). Control of multilayer biological networks and applied to target identification of complex diseases. *BMC Bioinformatics*, 20(1), 1-12.

Zuzek, L. A., Stanley, H. E., & Braunstein, L. A. (2015). Epidemic model with isolation in multilayer networks. *Scientific Reports*, 5(1), 1-7.

Zytynska, S. E. (2021). Embracing the complexity of plant–microbe–insect interactions under a changing climate for sustainable agriculture. *Current opinion in insect science*, 44, 89-94.