

УДК 579.262:57.022

АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ДВУХ БАКТЕРИОБИОНТОВ ЛИШАЙНИКОВ, *Lichenibacterium ramalinae* и *Lichenibacterium minor*: ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ И АДАПТАЦИИ

© 2023 г. Т. А. Панкратов®

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ “Биотехнологии” РАН, Москва, 119071 Россия

®E-mail: tpankratov@gmail.com

Поступила в редакцию 24.03.2022 г.

После доработки 06.07.2022 г.

Принята к публикации 06.07.2022 г.

Успешные инвазия и адаптация бактерий в лишайниковый симбиоз требует вовлечения ряда физиологических механизмов, которые регулируют взаимодействия между бактериобионтами, микобионтами и альгобионтами и обеспечивают оптимизацию роста и развития таллома. Для выявления таких факторов был проведен анализ геномов двух бактериобионтов лишайников *Lichenibacterium ramalinae* и *L. minor*. Традиционные для ризобий гены нодуляции *nod* не обнаружены. Высказано предположение о выполнении сходной функции белком TIGR02302. Обнаружены гены, кодирующие белки, связанные с реализацией программ планктонного и биопленочного фенотипа — флагеллины и пилины. Эти гены имеют высокий уровень сходства с генами бактерий — симбионтов растений. В геномах исследованных бактерий обнаружены генетические детерминанты факторов вирулентности — белков инвазии локуса B, integration host factor (IHF), сенсорных гистидин киназ, белков рецепции и транспорта сидерофоров, монооксигеназы синтеза антибиотиков (Abm). Перечисленные гены имеют сходство с таковыми у организмов, образующих ассоциации разной степени связанности с растениями. Полученные данные позволили укрепить ранее высказанное предположение о приоритетной ассоциации бактерий семейства Lichenibacteriaceae с зелеными водорослями лишайников.

Ключевые слова: *Lichenibacterium*, факторы нодуляции, вирулентность, гистидин киназы, сидерофобы, лишайники

DOI: 10.31857/S1026347023010092, **EDN:** IMPHJF

В эволюции симбиозов важными факторами коадаптации партнеров являются специфические факторы взаимодействия клеток организмов друг с другом. При формировании бактериально-растительных и грибо-бактериальных симбиозов основными факторами коадаптации являются ферменты, белковые комплексы, полисахариды и жирные кислоты, которые определяют морфологические и физиологические изменения в клеточных стенках, плазматической мембране и цитоплазме клеток партнерских организмов. Эти же факторы могут определять вирулентность патогенных микроорганизмов. Особенностью лишайниковых симбиозов является многокомпонентный состав сообщества. Таллом лишайника — это миниатюрная экосистема, в которой мутуализм и паразитизм, а также комменсализм и другие формы сосуществования могут проявляться на различных уровнях взаимодействия участников симбиоза.

Геномные и эколого-таксономические исследования последнего десятилетия позволили об-

наружить в составе лишайниковых симбиозов специфические группы микроорганизмов, адаптированных к обитанию в их талломах. Это в корне изменило представление о лишайниках как о бинарах, сформированных микобионтом и фотобионтом. Лишайники оказались резервуаром грибов и водорослей широкого таксономического и экологического спектра: от примитивных зигомицетовых до совершенных базидиомицетовых грибов; от традиционных водорослей *Asterololus* sp. и *Trebouxia* sp. до представителей различных порядков зеленых водорослей; от мутуалов до паразитов; от стимулирующих рост растений бактерий до микроорганизмов, солибилизирующих нерастворимые в воде минералы.

Бактериобионты лишайников представлены специфичной для конкретного рода или вида лишайника обособленной группой, доминантами в которой являются представители порядков *Hypomicrobiales*, *Rhodospirillales*, *Acidobacteriales* (Hodkinson et al., 2012; Lee et al., 2014; Erlacher et al., 2015), представители филумов Planctomyce-

tes, Verrucomicrobia и, сравнительно недавно, опубликованы данные о присутствии в лишайниках пока некультивируемых бактерий новой филогенетической группы *candidatus "Eremiobacterota"* (Noh *et al.*, 2020, 2021).

Наличие узкого и специфичного для каждого из родов лишайников набора бактериальных компонентов позволяет предположить наличие факторов, отбирающих те или иные группы бактерий в лишайниковый симбиоз. Адаптация бактерий в лишайниковом симбиозе зависит от степени реализации их функциональных возможностей: фиксации атмосферного азота, углекислого газа, участия в защите микробиома лишайника от патогенов и стрессовых факторов среды. Важным аспектом жизнедеятельности является также способность выживать в кислой среде под давлением антибиотиков, синтезируемых микобионтом (лишайниковых кислот).

В этой связи, анализ геномных данных отдельных облигатных бактериобионтов может внести ясность в проблему адаптации бактерий в талломах лишайников и понять механизмы их выживания и успешной реализации генетической программы. В данной работе была поставлена задача проанализировать генетические детерминанты, потенциально определяющие характер инвазии двух облигатных бактериобионтов лишайников, *Lichenibacterium ramalinae* и *L. minor* в таллом лишайника и факторов, способствующих их выживанию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Штаммы RmlP001^T и RmlP026^T рода *Lichenibacterium* выделены ранее (Pankratov *et al.*, 2020) из отмытых от эпифитной микрофлоры гомогенатов лишайника *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach. и охарактеризованы как два новых вида — *L. ramalinae* и *L. minor*. Талломы лишайника были собраны со стволов березы (*Betula pubescens* Ehrh.) на территории Беломорской биологической станции МГУ им. М.В. Ломоносова (66.549970, 33.113218) в 2016 г.

Анализ геномов. Аннотированные в GenBank геномные сборки анализировали с использованием программ Unipro UGENE 38.1 (Okonechnikov *et al.*, 2012) и BIOEDIT v. 7.0.5.3 (Hall, 1999). Выравнивание амнокислотных и нуклеотидных последовательностей проводили с использованием алгоритма MUSCLE в программе MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Филогенетический анализ и построение деревьев осуществляли с использованием программ MEGA X, Unipro UGENE 38.1, сервиса IQ Tree (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) (Trifinopoulos *et al.*, 2016) и FigTree 1.4.4 с использованием конкатенированных аминокислотных последовательностей целевых белков. Для поиска

ортологических генов использовали базу данных COG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog>) (Tatusov *et al.*, 1997).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Белки систем нодуляции. В ходе анализа геномов двух видов *Lichenibacterium* белки, близкие по первичной структуре под белкам бактерий группы 'rhizobia' обнаружены не были. Таким образом, следует исключить вероятность присутствия сходного с ризобияльными бактериями механизма инвазии в хозяйский организм. Несмотря на то, что группы генов *nod* в геномах изученных бактерий отсутствуют, у *L. ramalinae* был обнаружен ген, кодирующий белок TIGR02302 (<https://www.uniprot.org/uniprot/A0A068SVH1>). У мутантов *Azorhizobium caulinodans*, нокаутированных по этому гену, была показана утрата способности к инфицированию хозяйского растения и чрезмерной продукции экзополисахарида (Sato *et al.*, 2016). Этот же белок найден у *Brucella suis*, паразита, вызывающего бруцеллез свиней и *Sinorhizobium meliloti*, мутуалистической бактерии люцерны. Белки этого типа обладают высоким генетическим полиморфизмом, так как даже у одного вида, например *Bartonella quintana* (патоген, вызывающий окопную лихорадку), доля нуклеотидных замен может возрасти до уровня 2.5%. Потенциально, белки этого типа могут рассматриваться как факторы инвазии в лишайниковый таллом. Эволюционный филогенетический анализ белков TIGR02302 у *L. ramalinae* и *L. minor* показал (рис. 1), что у обоих штаммов этот ген формирует отдельный кластер в пределах ветви, в которую входят как выделенные из небиологических субстратов бактерии *Chelatococcus reniformis*, *Alsobacter soli* (Gu *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2018), так и эпифит растений *Methylobacterium haplocladii* (Tani, Sahin, 2013) или клубеньковые симбионты *Methylobacterium nodulans* (Jourand *et al.*, 2004). Учитывая, что среди аннотированных в базе NCBI последовательностей этого гена, большая часть ассоциирована с эпифитными бактериями или бактериями симбионтами растений, мы можем предположить, что бактерии *Lichenibacterium* в лишайниках потенциально могут быть ассоциированы с зелеными водорослями, а не с грибами.

Флагеллины и пилины. Особенностью эндолихенобионтов *L. ramalinae* и *L. minor* является наличие у них клеточного цикла развития. На ранних этапах роста культуры их клетки подвижны за счёт жгутика. Позднее они утрачивают жгутик и переходят к пленочному или колониальному росту. Такие особенности жизненного цикла предполагают наличие белков, участвующих в формировании жгутика и контроле его активности — флагеллинов, а также белков фиксации на твердой поверхности — пилинов. Большая часть генов белков

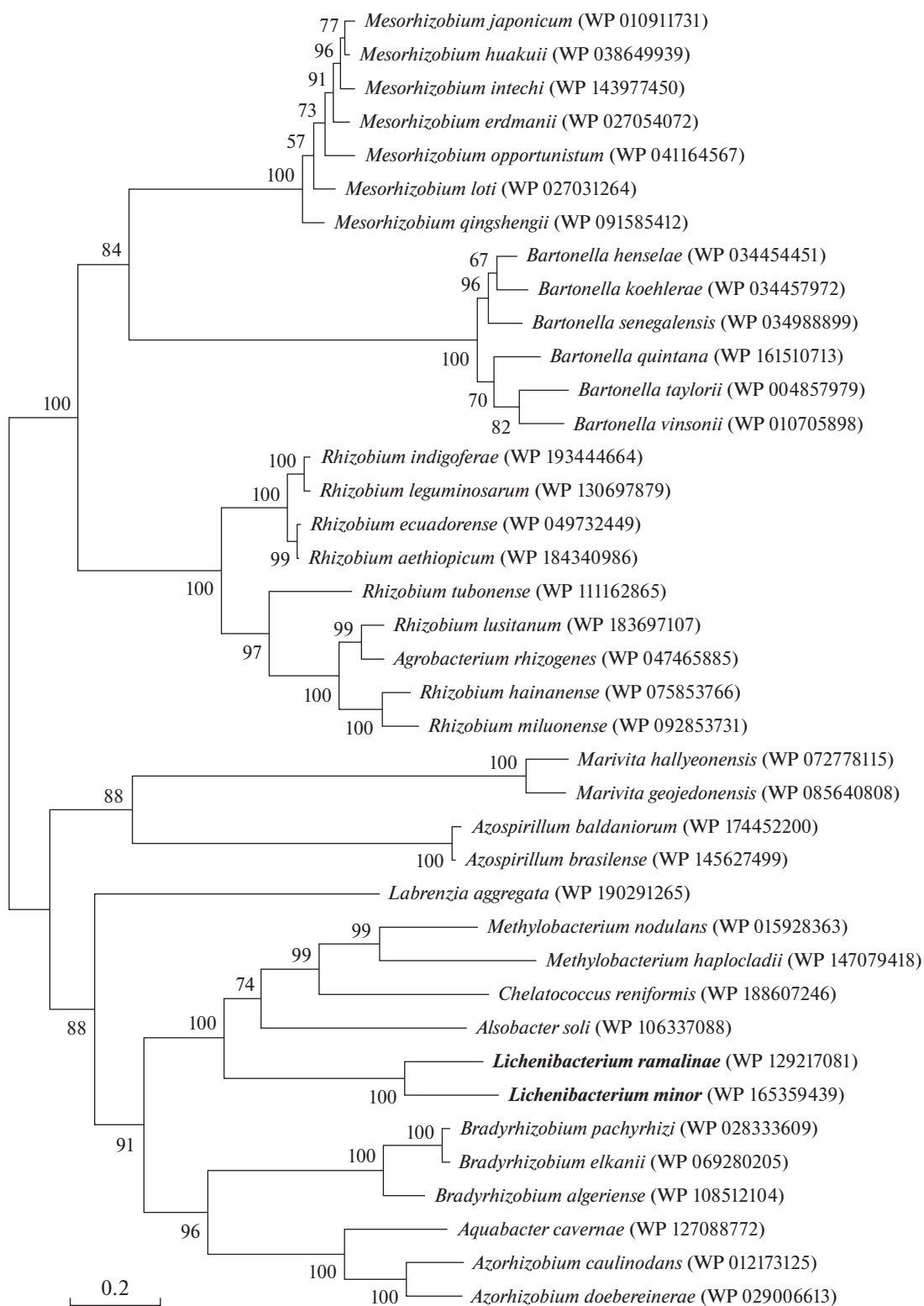


Рис. 1. Эволюционный анализ филогении гена TIGR02302 методом максимального правдоподобия. Эволюционная история была определена с помощью метода максимального правдоподобия и модели Jones *et al.* w/freq. Показано дерево с наибольшим логарифмическим правдоподобием (−36249.81). Процент деревьев, в которых соответствующие таксоны кластеризуются вместе, показан рядом с ветвями. Исходные деревья для эвристического поиска были получены автоматически путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице парных расстояний, оцененных с помощью модели JTT, а затем выбора топологии с наибольшим значением логарифмического правдоподобия. Дерево нарисовано в масштабе, длина ветвей измеряется в количестве замен на сайт. В данном анализе участвовали 39 аминокислотных последовательностей. Всего в окончательном наборе данных было 1052 позиции.

Таблица 1. Значения гомологии основных генов сборки пилинов *L. ramalinae* и *L. minor* в сравнении с филогенетическими соседями по генам, кодирующим компоненты пилинов

Номер аминокислотной последовательности в геноме	Белок	Гомологичные виды	Величина покрытия	Процент идентичности	Номер в базе GenBank
<i>Lichenibacterium minor</i>					
WP_129227699	PAP	<i>Bosea thiooxidans</i> (Skipper <i>et al.</i> , 2019)**	100%	51.41	WP_055728783
WP_129224958	PAP	<i>Methylobacterium pseudosasicola</i> (Madhaiyan, Poonguzhali, 2014)***!!	96%	52.74	WP_092042786
WP_129222914	Flp family type IVb pilin	<i>Rhizomicrobium palustre</i> (Ueki <i>et al.</i> , 2010)*	100%	50.00	WP_167081865
WP_129222940	Flp family type IVb pilin	<i>Limoniibacter endophyticus</i> (Li <i>et al.</i> , 2018)*	98%	66.67	WP_189488722
<i>Lichenibacterium ramalinae</i>					
WP_129217141	Flp family type IVb pilin	<i>Devosia crocina</i> (Verma <i>et al.</i> , 2009)*	100%	62.26	WP_092425185
WP_129217142	Flp family type IVb pilin	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> (Urakami <i>et al.</i> , 1995)*	100%	61.1	WP_015596543
WP_129221696	PAP	<i>Methylobacterium populi</i> (Van Aken <i>et al.</i> , 1995)*	99%	57.03	WP_141950466
WP_129220976	PAP	<i>Methylobacterium pseudosasicola</i> (Madhaiyan, Poonguzhali, 2014)***!!	100%	51.49	WP_092042786
WP_129220479	PAP	<i>Methylobacterium variabile</i> (Gallego <i>et al.</i> , 2005)*	98%	48.35	WP_157080794
WP_129217136	Flp PAP CpaB	<i>Methylobacterium oxalidis</i> (Tani <i>et al.</i> , 2012)!!	100%	50.18	WP_147024217

Примечание. PAP — белок сборки пилей; * — корни растений; ** — патоген человека; *** — стимулируют рост растений; !! — эпифиты; * — свободноживущие

сборки пилей исследованных бактерий имеют низкий уровень гомологии с большинством бактерий в пределах класса *Alphaproteobacteria* и только немногие имеют уровень гомологии более 50% (табл. 1).

Низкий уровень гомологии предполагает наличие новых семейств таких белков, что обусловлено селекцией в лишайниковых симбиозах и изоляцией представителей семейства *Lichenibacteriaceae* как отдельно эволюционирующей ветви порядка *Hyphomicrobiales*. Несмотря на тесную ассоциацию бактерий рода *Lichenibacterium* с лишайниками, их пилины имеют более выраженную гомологию с генами корневых симбионтов растений (Ueki *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2018), эпифитных (Tani *et al.*, 2012; Madhaiyan, Poonguzhali, 2014) и выделенных из небиологических сред (Urakami *et al.*, 1995; Van Aken *et al.*, 1995; Gallego *et al.*, 2005) представителей класса *Alphaproteobacteria*. Единственный охарактеризованный на данный

момент представитель семейства *Lichenihabitantaceae* (кластера LAR1), *Lichenihabitans psoromatis*, изолированный из лишайника (Noh *et al.*, 2019), несмотря на сходство экологических ниш обитания, не имеет пилинов, а гены флагеллинов ограничены *motA* и тремя генами биосинтеза и экспорта (*fliO*, *fliQ*, *fliJ*).

У обоих видов *Lichenibacterium* присутствуют полные опероны, включающие все необходимые гены для сборки мотора и жгутика (*fliEFGIJKNPQR*; *flgABCDEFGHIJ*; *motA*). Недавно у *Caulobacter crescentus* показано наличие зависимости адгезии от активности комплекса белков, отвечающих за активное перемещение (Hug *et al.*, 2017). В частности, мутанты $\Delta fliFG$, $\Delta motA$, $\Delta motB$ и $\Delta fliL$ теряли способность эффективно прикрепляться к поверхности субстрата. Продукты экспрессии этих генов участвовали в механорецепции поверхности и запускали механизм сбрасывания жгутика и перехода к стационарному существова-

нию в виде биопленки на поверхности субстрата. Мутанты, у которых был нокаутирован ген *motA*, не были способны перейти от планктонной стадии к биопленочному фенотипу. Мы предполагаем, что *L. ramalinae* и *L. minor* обладают сходными механизмами формирования биопленочного фенотипа при внедрении клеток этих бактерий в талломы лишайников.

Белки инвазии локуса B (IalB). Эти белки ассоциированы с комплексом инвазии в эритроциты у *Bartonella bacilliformis*, эндопаразита семейства Bartonellaceae (Hyphomicrobiales). Ранее было показано (Coleman, Minnick, 2001), что нокаутированные по гену *ialB* бактерии утрачивали способность к адгезии и последующей инвазии в эритроциты. Гомологи этого белка были также обнаружены в бактериях родов *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*, ассоциированных с корнями растений. Однако анализа их функции у этих бактерий в литературе найти не удалось. Интересно, что в работе Coleman и Minnick (2003) определение количества белка IalB с помощью SDS-PAGE и иммуноблоттинга показало наибольшее количество IalB в кислых условиях или при 20°C, в то время как при 37°C и в основных условиях синтезировалось наименьшее количество этого белка. Известно (Pankratov, 2012), что водные гомогенаты лишайников имеют pH менее 5.0, а оптимальные температуры для роста большинства бактериальных изолятов нетропических лишайников находятся в диапазоне от 15 до 25°C. В настоящее время эти белки обнаружены, согласно базе ортологичных генов COG, главным образом в группах Alphaproteobacteria (109 организмов) и Gammaproteobacteria (19 организмов) и Betaproteobacteria (1 организм). У бактерий *L. ramalinae* и *L. minor* эти белки могут потенциально использоваться для адаптации к кислой среде талломов.

Integration host factor (IHF). Эти белки обычны в прокариотах, так как участвуют в регуляции транскрипции, связывая ДНК и придавая ей специфическую структуру. У обоих видов *Lichenibacterium* они представлены двумя субъединицами, α и β . Несмотря на то, что эти белки не участвуют напрямую, как например белки нодуляции или секреции, в ассоциации с хозяйским организмом, они способны регулировать ряд функций бактериальной клетки, связанной с вирулентностью, а также резистентностью к ряду факторов. Так, например, у *E. coli* IHF активирует экспрессию определенного набора генов, необходимых для выживания при чрезвычайно низких значениях pH (Bi, Zhang, 2014). Stonehouse и et al. (2008) показали, что инактивация *ihfA* и *ihfB*, генов, кодирующих субъединицы IHF, снижает уровни экспрессии двух основных факторов вирулентности *tcpA* и *ctx* и предотвращает выработку пилина *Vibrio cholerae*, регулируемого токсином, и холерного токсина. У *Lichenibacterium* наиболее близкими гомологами по

этим генам оказались *Rhabdaerophilum calidifontis*, а также представители родов *Camelimonas* и *Microvirga* с уровнем гомологии более 74%. Известно, что два вида рода *Camelimonas* выделены из плаценты и молока теплокровных животных, а среди видов рода *Microvirga* три являются симбионтами растений (Kämpfer et al., 2012; Rad et al., 2014; Zhang et al., 2015). *Rhabdaerophilum calidifontis* недавно выделен из осадков горячих источников и описан как представитель нового семейства *Rhabdaerophillaceae* в порядке *Hyphomicrobiales* (Ming et al., 2020).

Другие факторы вирулентности. К факторам вирулентности относят ряд белков, участвующих в рецепции сигналов хозяйского организма, рецепции и транспорте сидерофоров и ферменты синтеза антибиотиков.

Сенсорные гистидин киназы. В геномах обоих штаммов *Lichenibacterium* были найдены гены, кодирующие сенсорные гистидин киназы и гибридные сенсорные гистидин киназы и регуляторы отклика. Эти ферменты регулируют взаимодействие с хозяйским организмом путем контроля передачи сигнала двухкомпонентными системами (TCS) с последующим автофосфорилированием консервативного остатка гистидина в ответ на стимул. Ближайшими гомологами генов гистидин киназ исследуемых бактерий являются гены гистидин киназ родственных бактерий класса *Alphaproteobacteria*, для которых функции этих белков могут быть предсказаны только на основании имеющихся в литературе данных. Наиболее близкими гомологами оказались гистидиновые киназы бактерий, представляющих семейства *Beijerinckiaceae*, *Methylobacteriaceae* и *Lichenihabitantaceae* (рис. 2). Выявлены различия в составе и количестве ортологичных генов, кодирующих гистидин киназы, у *L. ramalinae* и *L. minor*. Так, например, в геноме *L. minor* найдены два ортологичных гена *kdpD*, в то время как у *L. ramalinae* эти гены не найдены (рис. 2г). KdpD в сочетании с KdpABC регулирует калиевый гомеостаз и вирулентность у различных видов бактерий (Dutta et al., 2021). Интересно, что гистидин киназы, содержащие домен HAMP (Histidine kinases, Adenylate cyclases, Methyl accepting proteins and Phosphatases), формируют изолированный кластер семейства *Lichenibacteriaceae* (рис. 2а, 2б), что может быть использовано как дополнительный инструмент в филогеномном анализе бактерий кластера LAR1 и *Hyphomicrobiales*. В целом, в геноме *L. ramalinae* содержится 18 аминокислотных последовательностей различных типов гистидин киназ, а в геноме *L. minor* — 26. Недавние результаты подтверждают участие гистидиновых киназ в бактериальных сенсорных системах, контролирующих концентрацию кислорода и окиси азота в среде роста (Gondim et al., 2022).

Рецепция и транспорт сидерофоров. TonB-зависимые транспортеры (TBDTs) это белки внешней

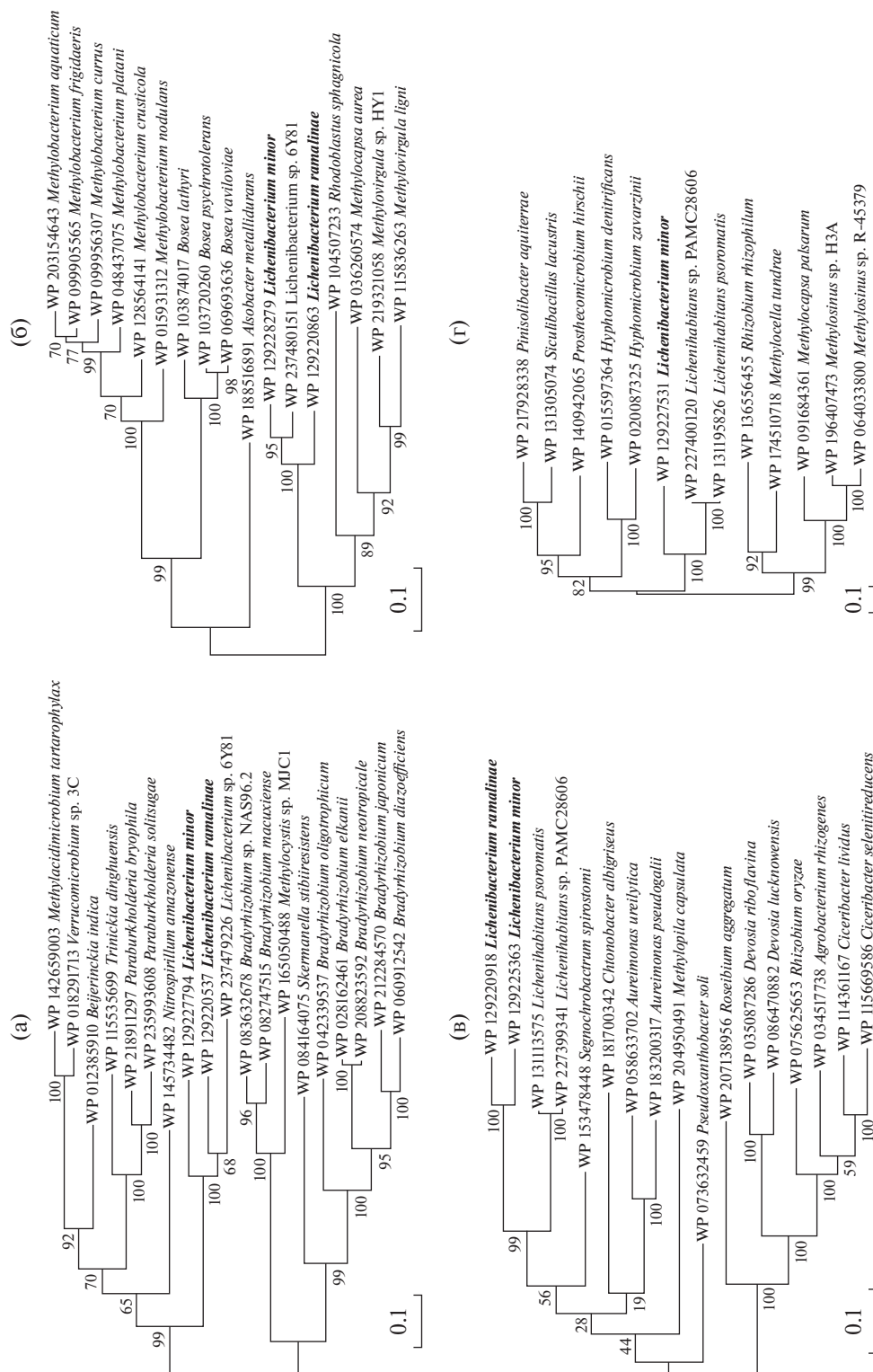


Рис. 2. Эволюционный анализ филологии генов, кодирующих НАМР-содержащие гистидиновые киназы (а, б), гибридные сенсорные киназы (в) и КдрD-содержащие гистидиновые киназы (г) методом максимального правдоподобия. Эволюционная история была определена с помощью метода максимального правдоподобия и модели Jones *et al.* w/freq. Исходные деревья для эвристического поиска были получены автоматически путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице парных расстояний, оцененных с помощью модели JTT, а затем выбора топологии с наибольшим значением логарифмического правдоподобия.

Таблица 2. Значения гомологии генов монооксигеназы синтеза антибиотиков *L. ramalinae* и *L. minor* в сравнении с филогенетически родственными бактериями

Номер аминокислотной последовательности в геноме	Гомологичные виды	Величина покрытия, %	Процент идентичности	Номер гомолога в базе GenBank
<i>Lichenibacterium ramalinae</i>				
WP_129217131	<i>Lichenibacterium</i> sp. 6Y81	99	92.66	WP_237477013
	<i>Lichenibacterium minor</i>	99	90.83	WP_129224161
	<i>Aureimonas altamirensis</i>	99	68.81	WP_232413559
	<i>Aureimonas ureilytica</i>	99	67.89	WP_058635188
	<i>Amorphus coralli</i>	98	66.67	WP_018698660
	<i>Skermanella aerolata</i>	100	65.45	WP_044429191
	<i>Rhodoligotrophos appendicifer</i>	99	65.14	WP_144293913
	<i>Methylobacterium oryzihabitans</i>	100	64.55	WP_127729087
WP_129217335	<i>Lichenibacterium</i> sp. 6Y81	100	86.73	WP_237477124
	<i>Lichenibacterium minor</i>	100	84.69	WP_129222562
	<i>Lichenihabitans psoromatis</i>	100	63.27	WP_165492806
	<i>Sinorhizobium fredii</i> (PAB)	97	51.04	WP_012709011
WP_129219385	<i>Methylobacterium</i> sp. 275MFSHa3.1 (PAB)	100	73.77	WP_091675833
	<i>Methylobacterium</i> sp. Leaf88	100	72.95	WP_056271413
	<i>Methylorubrum extorquens</i> (PAB)	100	70.49	WP_003598456
	<i>Methylobacterium oryzae</i> (PAB)	98	68.85	WP_043758477
WP_129224161	<i>Lichenibacterium</i> sp. 6Y81	100	94.59	WP_237477013
	<i>Aureimonas altamirensis</i>	98	68.81	WP_232413559
	<i>Skermanella mucosa</i>	100	66.67	WP_202680322
	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Tv2a-2 (PAB)	99	66.36	WP_024519766
<i>Lichenibacterium minor</i>				
WP_129225689	<i>Lichenibacterium</i> sp. 6Y81	100	78.79	WP_237479053
	<i>Comamonas thiooxydans</i>	100	70.71	WP_034407119
	<i>Comamonas testosteroni</i>	100	70.71	WP_149356526
	<i>Mesorhizobium amorphae</i> (PAB)	100	67.68	WP_192177866
WP_129227845	<i>Lichenibacterium</i> sp. 6Y81	100	87.37	WP_237477550
	<i>Aureimonas psamosilenae</i> (PAB)	100	64.21	WP_152046766
	<i>Gemmobacter straminiformis</i>	96	63.04	WP_185798974
	<i>Rhodobacter amnigenus</i>	96	60.87	WP_161762857
	<i>Deinococcus planocerae</i>	96	56.52	WP_102126279

Примечание. PAB — бактерии, ассоциированные с растениями

мембраны бактерий, которые связывают и переносят хелаты железа, называемые сидерофорами, а также витамин B12, комплексы никеля и углеводы. Процесс переноса требует энергии в виде протонной двигательной силы и комплекса из трех белков внутренней мембраны, TonB-ExbB-ExbD, для передачи этой энергии на внешнюю мембрану. У обоих штаммов гены, кодирующие эти белки, найдены. TonB рецепторы оказались гомологичным

таковым у бактерий *Nitrobacter winogradskyi*, *Archangium violaceum*, *Cystobacter fuscus* с уровнем гомологии 45–50% и величиной Query Cover 97%. Наибольший уровень гомологии характерен для *Lichenihabitans psoromatis* — 57.64% при величине Query Cover 96%.

Монооксигеназа синтеза антибиотиков (Abm). У *L. ramalinae* обнаружено шесть паралогов этого фермента, а у *L. minor* — пять.

Наиболее филогенетически близкими к генам Abm *Lichenibacterium* оказались гомологи *Licheni-habitans psoromatis* (величина сходства 64.29%) и *Rhizobium arenae* (53.12%). Некоторые ортологи, как например Abm WP_129219385 *L. ramalinae*, имели высокое сходство с генами эпифитных *Methylobacterium*, выделенных с поверхности листьев различных растений (величина сходства 70–74%). У *L. minor* гомологами по гену abm оказываются симбиотические бактерии *Aureimonas psammosilene*, штаммы группы *Mezorhizobium*, патоген человека *Comamonas testosteroni*, а также свободноживущие *Hyphomicrobium zavarzinii* и *Sker-manella mucosa* (табл 2).

Ферменты этого суперсемейства участвуют в синтезе поликетидных антибиотиков (Grocholski *et al.*, 2012). Недавно показана способность монооксигеназы регулировать инвазию патогенных грибов в ткани растений (Patkar, Naqvi, 2017). В частности, монооксигеназа служит эффекторным пептидом, способствующим последующей колонизации тканей. Интересно, что ортологи Abm паразитического грибка *Magnaporthe oryzae* были обнаружены только у нескольких видов симбиотических бактерий, что позволяет предположить, что патогенная линия приобрела Abm, вероятно, путем горизонтального переноса генов от ризосферных бактерий.

Известно, что наиболее эффективными защитными механизмами растений являются гормоны и гормоноподобные соединения, такие как салициловая кислота, жасмоновая кислота или этилен. Эти же соединения способны выделять и зеленые водоросли (Tarakhovskaya *et al.*, 2007). Так например, Pichler *et al.* (2020) обнаружили, что индолил уксусная, индолил масляная, абсцизовая, жасмоновая кислоты, гиббереллин A3 (GA3) и GA4 высвобождаются внеклеточно у водорослей рода *Trebouxia* и *Asterochloris* (фотобиотны лишайников). Показано, что Abm способны инактивировать жасмоновую кислоту, выделяемую растением в ответ на заражение патогенными грибами (Patkar, Naqvi, 2017). Наличие нескольких копий паралоогичных генов этого белка может быть индикатором их функциональности, что позволяет высказать предположение о наличии сходных с вышеприведенным механизмом инвазии *Lichenibacterium* в лишайниковый таллом.

Таким образом, анализ геномов двух бактериобионтов лишайников *L. ramalinae* и *L. minor* обнаружил генные детерминанты, обеспечивающие синтез факторов адгезии, белков пилинов и флагеллинов, способствующие фиксации клеток на грибом мицелии и на клеточных стенках водорослей. Наличие двух фенотипов — планктонного и пленочного позволяют бактериям рода *Lichenibacterium* мигрировать в формирующиеся подеции лишайников и далее интегрироваться в

них, переходя в пленочный фенотип. Значения гомологии отдельных изученных генов, продукты экспрессии которых обеспечивают регуляцию интеграции, адаптации и выживания, позволяют дополнить нашу гипотезу (Pankratov *et al.*, 2022) о более тесной физиологической связи бактерий рода *Lichenibacterium* с зелеными водорослями, чем с грибами.

Номера доступа DDBJ/ENA/GenBank для последовательностей, проанализированных в этом исследовании, следующие: QYBC000000 (геном штамма RmlP001^T) и QYBB000000 (геном штамма RmlP026^T).

Соблюдение этических стандартов. Настоящая статья не содержит результатов исследований, полученных с использованием животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

Финансирование. Работа финансово поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Госзадание “Микробиология инновационных биотехнологий”, № 122040800164-6) и, частично, средствами гранта РФФИ (19-04-00297а).

Благодарности. Автор благодарит лихенолога, сотрудника кафедры экологии, ботаники и охраны природы Самарского национального исследовательского университета имени акад. С.П. Королева и Е.С. Корчикова за идентификацию лишайника.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bi H., Zhang Ch. Integration host factor is required for the induction of acid resistance in *Escherichia coli* // Curr. Microbiol. 2014. V. 69. P. 218–224. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0595-7>
- Coleman S.A., Minnick M.F. Differential expression of the invasion-associated locus B (*ialB*) gene of *Bartonella bacilliformis* in response to environmental cues // Microb. Pathog. 2003. V. 34. P. 179–186. [https://doi.org/10.1016/S0882-4010\(03\)00005-6](https://doi.org/10.1016/S0882-4010(03)00005-6)
- Coleman S.A., Minnick M.F. Establishing a direct role for the *Bartonella bacilliformis* invasion-associated locus B (*ialB*) protein in human erythrocyte parasitism // Infect. Immun. 2001. V. 69(7). P. 4373–4381. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4373-4381.2001>
- Dutta A., Batish M., Parashar V. Structural basis of KdpD histidine kinase binding to the second messenger c-di-AMP // J Biol Chem. 2021. V. 296:100771. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100771>
- Erlacher A., Cernava T., Cardinale M., Soh J., Sensen C.W., Grube M., Berg G. *Rhizobiales* as functional and endosymbiotic members in the lichen symbiosis of *Lobaria pulmonaria* L. // Front. Microbiol. 2015. V 6: article 53. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00053>
- Gallego V., García M.T., Ventosa A. *Methylobacterium variabile* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from

- an aquatic environment // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005. V. 55(4). P. 1429–1433.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.63597-0>
- Gondim A.C.S., Guimarães W.G., Sousa E.H.S. Heme-based gas sensors in nature and their chemical and biotechnological applications // *BioChem.* 2022. V. 2. P. 43–63.
<https://doi.org/10.3390/biochem2010004>
- Grocholski T., Oja T., Humphrey L., Mäntsälä P., Niemi J., Metsä-Ketelä M. Characterization of the two-component monooxygenase system AlnT/AlnH reveals early timing of quinone formation in alnumycin biosynthesis // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194(11). P. 2829–2836.
<https://doi.org/10.1128/JB.00228-12>
- Gu Z., Liu Y., Wang N., Jiao N., Shen L., Liu H., Zhou Y., Liu X., Li J., Liang J., Busse H.-J. *Chelatococcus reniformis* sp. nov., isolated from a glacier // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. V. 66(11). P. 4525–4529.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001384>
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids. Symp.* 1999. V. 41. P. 95–98.
- Hodkinson B.P., Gottel N.R., Schadt C.W., Lutzoni F. Photoautotrophic symbiont and geography are major factors affecting highly structured and diverse bacterial communities in the lichen microbiome // *Environ. Microbiol.* 2012. V. 14(1). P. 147–161.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02560.x>
- Hug I., Deshpande S., Sprecher K.S., Pfohl T., Jenal U. Second messenger-mediated tactile response by a bacterial rotary motor // *Science*. 2017. V. 358. P. 531–534.
<https://doi.org/10.1126/science.aan5353>
- Jourand Ph., Giraud E., Béna G., Sy A., Willems A., Gillis M., Dreyfus B., de Lajudie Ph. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylophilic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004. V. 54. P. 2269–2273.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.02902-0>
- Kämpfer P., Scholz H.C., Lodders N., Loncaric I., Whatmore A.M., Busse H.-J. *Camelimonas abortus* sp. nov., isolated from placental tissue of cattle // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. P. 62. P. 1117–1120.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.034389-0>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Molecular Biology and Evolution*. 2018. V. 35. P. 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lee Y.M., Kim E.H., Lee H.K., Hong S.G. Biodiversity and physiological characteristics of Antarctic and Arctic lichens-associated bacteria // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 10. P. 2711–2721.
<https://doi.org/10.1007/s11274-014-1695-z>
- Li L., Osman G., Salam N., Mohamed O.A., Jiao J., Ma J., Asem M.D., Xiao M., Li W.-J. *Limoniibacter endophyticus* gen. nov., sp. nov., an alphaproteobacterium isolated from the roots of *Limonium otolepis* // *Arch. Microbiol.* 2018. V. 200. P. 663–670.
<https://doi.org/10.1007/s00203-017-1472-0>
- Madhaiyan M., Poonguzhali S. *Methylobacterium pseudosaisicola* sp. nov. and *Methylobacterium phyllostachyos* sp. nov., isolated from bamboo leaf surfaces // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 2376–2384.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.057232-0>
- Ming Y.-Z., Liu L., Xian W.-D., Jiao J.-Y., Liu Z.-T., Li M.-M., Xiao M., Li W.-J. *Rhabdaerophilum calidifontis* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from a hot spring, and proposal of *Rhabdaerophilaceae* fam. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70(4). P. 2298–2304.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004035>
- Noh H.J., Baek K., Hwang C.Y., Shin S.C., Hong S.G., Lee Y.M. *Lichenihabitans psoromatis* gen. nov., sp. nov., a member of a novel lineage (*Lichenihabitantaceae* fam. nov.) within the order of *Rhizobiales* isolated from Antarctic lichen // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2019. V. 69. P. 3837–3842.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003695>
- Noh H.J., Lee Y.M., Park C.H., Lee H.K., Cho J.C., Hong S.G. Microbiome in *Cladonia squamosa* is vertically stratified according to microclimatic conditions // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11:268.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00268>
- Noh H.J., Park Y., Hong S.G., Lee Y.M. Diversity and physiological characteristics of Antarctic lichens-associated bacteria // *Microorganisms*. 2021. V. 9(3):607.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9030607>
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. et al. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. P. 1166–1167.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Pankratov T.A. *Acidobacteria* in microbial communities of the bog and tundra lichens // *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2012. V. 81(1). P. 51–58.
<https://doi.org/10.1134/S0026261711060166>
- Pankratov T.A., Grouzdev D.S., Patutina E.O. et al. *Lichenibacterium ramalinae* gen. nov., sp. nov., *Lichenibacterium minor* sp. nov., the first endophytic, beta-carotene producing bacterial representatives from lichen thalli and the proposal of the new family *Lichenibacteriaceae* within the order *Rhizobiales* // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2020. V. 113(4). P. 477–489.
<https://doi.org/10.1007/s10482-019-01357-6>
- Pankratov T.A., Nikitin P.A., Patutina E.O. Genome analysis of two lichen bacteriobionts, *Lichenibacterium ramalinae* and *Lichenibacterium minor*: toxin–antitoxin systems and secretion proteins // *Microbiology*. 2022. V. 91(2). P. 160–172.
<https://doi.org/10.1134/S0026261722020096>
- Patkar R.N., Naqvi N.I. Fungal manipulation of hormone-regulated plant defense // *PLoS Pathog.* 2017. V. 13(6):e1006334.
<https://doi.org/10.1111/jpy.13032>
- Pichler G., Stöggli W., Carniel F.C., Muggia L., Ametrano C.C., Holzinger A., Tretiach M., Kranner I. Abundance and extracellular release of phytohormones in aero-terrestrial microalgae (*Trebouxiphyceae*, *Chlorophyta*) as a potential chemical signaling source // *J. Phycol.* 2020. V. 56(5). P. 1295–1307.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006334>
- Rad V., Simões-Araújo J.L., Leite J., Passos S.R., Martins L.M.V., Xavier G.R., Rumjanek N.G., Baldani J.I., Zilli J.A. *Microvirga vignae* sp. nov., a root nodule symbiotic bacterium isolated from cowpea grown in semi-arid Brazil // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014. V. 64. P. 725–730.
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.053082-0>

- Sato S., Siarot L., Matsuoka J., Aono T., Oyaizu H. An *Azorhizobium caulinodans* ORS571 mutant with deletion of a gene encoding a TIGR02302 family protein overproduces exopolysaccharides and is defective in infection into plant host cells // *Soil Sci. Plant. Nutr.* 2016. V. 62(4). P. 392–398.
https://doi.org/10.1080/00380768.2016.1200954
- Skipper C., Ferrieri P., Cavert P. Bacteremia and central line infection caused by *Bosea thiooxidans*. *IDCases*. 2020. 19:e00676.
https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00676
- Stonehouse E., Kovacicova G., Taylor R.K., Skorupski K. Integration host factor positively regulates virulence gene expression in *Vibrio cholerae* // *J. Bacteriol.* 2008. V. 190(13). P. 4736–4748
https://doi.org/10.1128/JB.00089-08
- Sun L., Liu H., Chen W., Huang K., Lyu W., Gao X. *Alsobacter soli* sp. nov., a novel bacterium isolated from paddy soil, emended description of the genus *Alsobacter* and description of the family *Alsobacteraceae* fam. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. P. 3902–3907.
https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003088
- Tani A., Sahin N. *Methylobacterium haplocladii* sp. nov. and *Methylobacterium brachythecii* sp. nov., isolated from bryophytes. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013. V. 63. P. 3287–3292.
https://doi.org/10.1099/ijms.0.048215-0
- Tani A., Sahin N., Kimbara K. *Methylobacterium oxalidis* sp. nov., isolated from leaves of *Oxalis corniculata* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. P. 1647–1652.
https://doi.org/10.1099/ijms.0.033019-0
- Tarakhovskaya E.R., Maslov Yu.I., Shishova M.F. Phytohormones in Algae // *Russ. J. Plant. Physiol.* 2007. V. 54(2). P. 163–170.
https://doi.org/10.1134/S1021443707020021
- Tatusov R.L., Koonin E.V., Lipman D.J. A genomic perspective on protein families // *Science*. 1997. V. 278(5338). P. 631–637.
https://doi.org/10.1126/science.278.5338.631
- Trifinopoulos J., Nguyen L.T., von Haeseler A., Minh B.Q. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. P. 232–235.
https://doi.org/10.1093/nar/gkw256
- Ueki A., Kodama Y., Kaku N., Shiromura T., Satoh A., Watanabe K., Ueki K. *Rhizomicrobium palustre* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, fermentative stalked bacterium in the class *Alphaproteobacteria* isolated from rice plant roots // *J. Gen. Appl. Microbiol.* 2010. V. 56(3). P. 193–203.
https://doi.org/10.2323/jgam.56.193
- Urakami T., Sasaki J., Suzuki K.-I., Komagata K. Characterization and description of *Hyphomicrobium denitrificans* sp. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1995. V. 45(3). P. 528–532.
https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-528
- Van Aken B., Peres C.M., Doty S.L., Yoon J.M., Schnoor J.L. *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* × *nigra* DN34) // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1995. V. 54(4). P. 1191–1196.
https://doi.org/10.1099/ijms.0.02796-0
- Verma M., Kumar M., Dadhwal M., Kaur J., Lal R. *Devosia albogilva* sp. nov. and *Devosia crocina* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2009. V. 59(4). P. 795–799.
https://doi.org/10.1099/ijms.0.005447-0
- Zhang L., Song M., Cao Q., Wu Sh., Zhao Y., Huang Y.-W., Chen K., Li S.-P., Xia Z.-Y., Jiang J.-D. *Camelimonas fluminis* sp. nov., a cyhalothrin-degrading bacterium isolated from river water // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. V. 65. P. 3109–3114.
https://doi.org/10.1099/ijms.0.000384

Genome Analysis of Two Lichen Bacteriobionts, *Lichenibacterium ramalinae* and *Lichenibacterium minor*: Factors of Virulence and Adaptation

T. A. Pankratov[#]

Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

[#]e-mail: tpankratov@gmail.com

Successful invasion and adaptation of bacteria into lichen symbiosis requires the involvement of a number of physiological mechanisms that regulate interactions between bacteriobionts, mycobionts and algobionts and ensure the optimization of thallus growth and development. The genomes of two lichen bacteriobionts *Lichenibacterium ramalinae* and *L. minor* were analysed to identify those factors. No nodulation genes traditional for rhizobia were found. TIGR02302 protein has been suggested to have a similar function. Genes encoding proteins associated with the implementation of planktonic and biofilm phenotypes – flagellins and pilins – have been found. These genes have a high level of similarity with the genes of plant symbiont bacteria. Genetic determinants of virulence factors such as locus B invasion proteins, Integration host factor (IHF), sensory histidine kinases, siderophore receptor and transport proteins and monooxygenase of antibiotic synthesis (Abm) were found in the genomes of the studied bacteria. The listed genes have similarities with those in organisms forming associations of different degrees of association with plants. Based on the data obtained, the assumption of a priority association of bacteria of the *Lichenibacteriaceae* family with green lichen algae was suggested.

Keywords: *Lichenibacterium*, nodulation factors, virulence, histidine kinase, siderophores, lichens