

АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ДВУХ БАКТЕРИОБИОНТОВ ЛИШАЙНИКОВ,
LICHENIBACTERIUM RAMALINAE И *LICHENIBACTERIUM MINOR*:
ТОКСИН–АНТИТОКСИН СИСТЕМЫ И БЕЛКИ СЕКРЕЦИИ© 2022 г. Т. А. Панкратов^а, *, П. А. Никитин^б, Е. О. Патутина^с^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия^бФакультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119192 Россия^сИнститут биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: tpankratov@gmail.com

Поступила в редакцию 31.10.2021 г.

После доработки 15.11.2021 г.

Принята к публикации 15.11.2021 г.

Проведен анализ геномов двух бактериобионтов кустистого эпифитного лишайника *Ramalina pollinaria* – *Lichenibacterium ramalinae* и *L. minor*. Выявлены генетические детерминанты, потенциально определяющие интеграцию и адаптацию этих бактерий в талломах лишайников. Впервые проведена оценка генных детерминант факторов реакции на стресс и систем секреции лишайниковых бактериобионтов. Гены, кодирующие белки токсин–антитоксин (ТА) систем VarCB, имели уровень гомологии >60% с генами известных симбионтов растений – *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Mesorhizobium* и *Ralstonia*, а также *Bartonella* – патогеном человека. Гены, кодирующие белки системы секреции II типа, найдены в геномах обоих видов. Гены, кодирующие белки секреции VI типа, обнаружены только в геноме *L. ramalinae*, при этом они гомологичны таковым у эпифитного *Methylobacterium*, патогена растений *Agrobacterium* и корневых симбионтов растений *Rhizobium* и *Neorhizobium*. Степень гомологии генов, кодирующих белки ТА и белков систем секреции, с генами бактерий, ассоциированных с растениями, составляет более 60%. Это позволяет предположить, что основной мишенью инвазии могут быть зеленые водоросли. Обнаружение в геномах лишайниковых бактериобионтов генов синтеза уреаз позволило сформулировать гипотезу, согласно которой разложение мочевины приводит к дополнительному снабжению компонентов симбиоза аммонием и гидрокарбонатом. Последний может быть потенциально использован фототрофными эукариотами и прокариотами как источник дополнительного углерода. Анализ геномов бактериобионтов лишайников *L. ramalinae* и *L. minor* показал, что их стратегии выживания могут различаться: *L. ramalinae* теснее интегрирован в симбиоз, в то время как *L. minor* характеризуется большим количеством черт автономности.

Ключевые слова: *Lichenibacterium*, анализ генома, вирулентность, адаптация, лишайники**DOI:** 10.31857/S0026365622020112

Микробные сообщества лишайников активно исследуются на протяжении последних 20 лет. Произошел существенный сдвиг в восприятии лишайников как комплексных систем. Доказано присутствие в них бактерий (Панкратов и соавт., 2017), формирующих микроколонии среди гиф микобионта и клеток фотобионта (водорослей), то есть во внутренней среде таллома. Эти бактерии не относятся к филуму *Cyanobacteria* и найдены в водорослевых лишайниках. Методами флуоресцентной микроскопии с мечеными зондами, денатурирующего градиентного гель-электрофореза, а также методом молекулярного клонирования было показано доминирование в лишайниковых талломах представителей класса *Alphaproteobacteria* (Cardinale et al., 2008). Позднее (Erlacher et al., 2015) по-

казано доминирование представителей порядков *Hyphomicrobiales* (бывший *Rhizobiales*) и *Rhodospirillales*. Была обнаружена специфическая для лишайников группа клонов LAR1 (Lichen Associated Rhizobiales) (Hodkinson, Lutzoni, 2009), которые формировали изолированный филогенетический кластер в порядке *Hyphomicrobiales*. Недавно из антарктического лишайника *Psoroma* sp. был выделен и охарактеризован представитель нового семейства *Lichenihabitantaceae*, *Lichenihabitans psoromatis*, филогенетически близкий клонам группы LAR1 (Noh et al., 2019). Одновременно из лишайника *Ramalina pollinaria* был описан и второй представитель кластера LAR1 – *Lichenibacterium*, с двумя видами *L. ramalinae* и *L. minor*, внутри нового семейства *Lichenibacteriaceae* (Pankratov et al.,

2020). Представители этого кластера найдены также и в ряде образцов, не связанных с лишайниковыми симбиозами (Li et al., 2012). Стабильное обнаружение бактерий рода *Lichenibacterium* в лишайниках различных видов, например, *Cladonia* (Панкратов, неопубл. данные), позволило предположить, что бактерии этого рода специфически приурочены к лишайниковым симбиозам и представляют интерес как группа автохтонных для лишайников бактерий.

Роль бактерий в лишайниковых симбиозах постепенно становится более понятной благодаря выделению чистых культур и анализу их физиологических характеристик (Grube et al., 2009), в результате анализа метагеномных данных (Wicaksono et al., 2020) и данных транскрипционного анализа (Nurhani et al., 2013). Наиболее часто обсуждаемыми и частично доказанными являются данные о фиксации молекулярного азота, антибиотической и солюбилизирующей активности бактериобионтов лишайников (González et al., 2005; Grube, Berg, 2009), а также о синтезе гормонов и факторов защиты от токсических соединений (Erlacher et al., 2015).

Другой важный аспект – интеграция и селекция бактерий в лишайниковый симбиоз. В этой связи возникают вопросы: 1) как бактерии избегают отторжения со стороны микобионта и фотобионта; почему только некоторые виды способны к интеграции в лишайниковый таллом; 2) как протекает процесс селекции. Механизмы и факторы, обеспечивающие селекцию бактериальных эндобионтов лишайников, а также их адаптацию в симбиозе, пока совсем не исследованы (неизвестны). В этой связи, поиск генетических детерминант адаптации и инвазии в бактериях, которые существуют в глубоких слоях таллома и специфически приурочены именно к лишайникам, выглядит логичным и обоснованным.

В число факторов, которые могут оказаться значимыми для формирования и поддержания симбиотических отношений бактерий и микобионта (фотобионта), следует включить: белки систем нодуляции (играющие ключевую роль во взаимодействии ризобийных бактерий с корнями растений); белки систем мобильности (флагеллины и пилины); белки адгезии (адгезины и пилины); системы транспорта (белки секреции и киназы); токсин–антитоксин системы; сигнальные белки или их продукты; белки секреции сидерофоров; разнообразные факторы вирулентности. В данной статье обсуждается поиск и филогеномный анализ генов, кодирующих токсин–антитоксин системы, белки секреции и уреазу.

Белки секреции присутствуют у большинства бактерий, взаимодействующих с хозяйскими организмами, и некоторые из них, наряду с пилинами, являются частью систем, отвечающих за ви-

рулентность и паразитизм (Depluvere et al., 2016; Green, Meccas, 2021). Если белки секреции I, II и III типов широко распространены среди прокариот и характеризуются большим функциональным спектром, то типы IV, V и VI имеют ограниченное распространение среди бактерий. В частности, V тип – это, в основном, системы секреции патогенных и паразитических бактерий, а IV и VI могут иметь как бактерии-патогены человека и животных (например, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* и *Serratia marcescens*), так и патогены растений (*Agrobacterium tumefaciens*) (Green, Meccas, 2021).

Токсин–антитоксин системы присутствуют практически во всех микроорганизмах и локализованы на плазидах или в хромосоме. Их основная функция – регуляция процессов деления, программируемая гибель клетки и другие процессы, связанные с контролем популяционной плотности (Hayes, 2003). Однако в последнее время появляются данные о том, что ТА системы могут участвовать в контроле вирулентности при патогенезе растений (Shavit et al., 2016).

Впервые роль уреазы, как фактора вирулентности, была установлена в работе Сох и соавт. при изучении экспериментального криптококкоза (Cox et al., 2000). При этом уровень активности этого фермента мог быть видовым и/или специфичным для конкретного вида и/или места инфекции. Известно также, что механизм транспорта и гидролиза мочевины лежит в основе вирулентности у *Helicobacter pylori*. Процесс осуществляется благодаря механизму снижения pH периплазмы *H. pylori*, в результате которого активируется канал мочевины с протонным захватом (UreI), импортирующим мочевины в бактериальный цитозоль, где она гидролизуется уреазой. Далее аммиак и бикарбонат используются для буферизации протонов внутри периплазмы до значений pH, приемлемых для выживания бактерии (Ansari, Yamaoka, 2016).

Целью данной работы было выявление и сравнительный анализ в геномах *L. ramalinae* и *L. minor* генетических детерминант, влияющих на межбактериальную коммуникацию и их взаимодействие с эукариотическими компонентами лишайникового симбиоза: уреазы, токсин–антитоксин системы и комплекс белков секреции.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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* и охарактеризованы как два новых вида – *L. ramalinae* и *L. minor*.

Анализ геномов. Аннотированные в GenBank геномные сборки (*L. ramalinae*, GCA_004137085; *L. minor*, GCA_004137685) анализировали с ис-

Таблица 1. Характеристики геномов *L. ramalinae* и *L. minor*

Показатель	<i>L. ramalinae</i>	<i>L. minor</i>
Размер (Мб)	5.8	5.92
Г + Ц, %	70.8	70.5
Белки	5299	5493
рРНК	3	3
тРНК	50	55
нкРНК	4	4
Геномное покрытие	32×	78×
Гены (общее кол-во)	5442	5674
Кодирующие регионы	5385	5612
Кодирующие гены	5299	5493
Гены РНК	57	62
Псевдогены (без белков)	86	119

пользованием 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 визуализации геномных кластеров и оперонов использовались пакеты DNA Features Viewer (Zulkower, Rossler, 2020) и matplotlib (Hunter, 2007) языка программирования Python3 (Van Rossum, Drake, 2009). Для поиска ортологичных генов использовали базу данных COG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/research/cog>) (Tatusov et al., 1997).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика геномов. Оба генома имели средние значения величины – около 6 Мб (табл. 1). Плазмидные последовательности не обнаружены. У типового вида *L. ramalinae* размер генома оказался меньше, чем у *L. minor*.

Размер геномов не предполагает их облигатно паразитический стиль жизни, так как у большинства истинных паразитов, например, микоплазмы, борелии или хламидии, он не превышает 2 Мб. Факультативные симбионты *Hamiltonella defensa* и *Regiella insecticola* имеют размеры геномов немногим более 2 Мб, а факультативный симбионт мухи цеце *Sodalis glossinidius* – 4.2 Мб (Clark et al., 2010). Вместе с тем, геномы обоих штаммов *Lichenibacterium* меньше, чем геномы некоторых ризобийных симбионтов и свободноживущих ризобий. Так, например, у различных

видов *Rhizobium* размер генома варьирует в пределах от 4.98 Мб у *Rhizobium rhizoryzae* DSM 29514 до 7.5 Мб у *Rhizobium sophorae* BCCM/LMG 27901. У *Rhizobium leguminosarum* размер генома может достигать, в зависимости от штамма, 8 Мб.

Количество кодирующих генов у *L. minor* на 194 больше, чем у *L. ramalinae*. 976 белков *L. ramalinae* и 1164 белков *L. minor* не были аннотированы и имеют статус гипотетического белка. Виды различаются также количеством транспортных РНК – у *L. ramalinae* их выявлено 50, а у *L. minor* – 55, что пропорционально разнице в размерах геномов.

Токсин–антитоксин системы (ТА). Среди генов, которые участвуют в формировании токсинов и факторов их инактивации, выделяются белки VarCB, относящиеся к классу тРНК-специфичных эндонуклеаз (Fraikin et al., 2020). В геноме *L. ramalinae* найдено семь паралогичных последовательностей гена, кодирующего белок VarC, т.е. собственно токсин. У *L. minor* их четыре. Один из паралогов этого гена у *L. minor* оказался в одном кластере с генами симбиотических бактерий родов *Bradyrhizobium* и *Rhizobium*, ассоциированных с корнями растений, а также оппортунистического патогена человека *Brucella anthropi* (рис. 1). Большинство паралогов этого гена у *L. ramalinae* кластеризуются в группах генов свободноживущих бактерий. И только один из них оказался в кластерах, сформированных генами ризобийных бактерий (рис. 2). Филогеномный анализ выявил родство генов, кодирующих VarC белки, как генам бактерий – симбионтов растений, так и свободноживущих бактерий, выделенных из почв и иных субстратов.

Ген, кодирующий белок VarB (антитоксин) в геноме *L. ramalinae* представлен двумя паралогами, а у *L. minor* – только одним геном. Эволюционный анализ этого гена в обеих культурах показал его родство как со свободноживущим *Prosthecomicrobium*

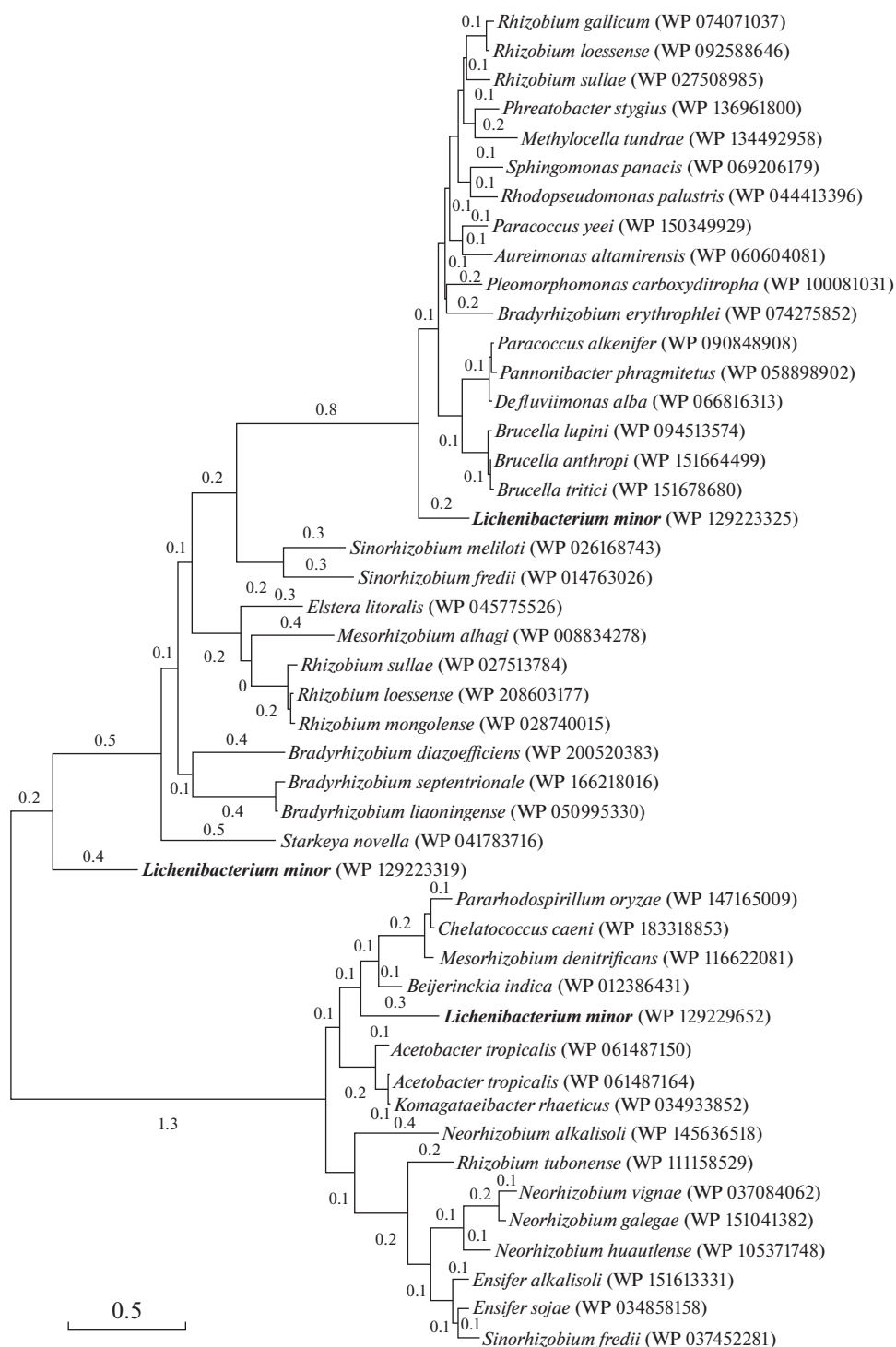


Рис. 1. Эволюционный анализ филогении гена *varC* *Lichenibacterium minor* методом максимального правдоподобия. Эволюционная история была определена с помощью метода максимального правдоподобия и модели Jones et al. w/freq. Исходные деревья для эвристического поиска были получены автоматически путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице парных расстояний, оцененных с помощью модели JTT, и последующего выбора топологии с лучшим значением log-вероятности.

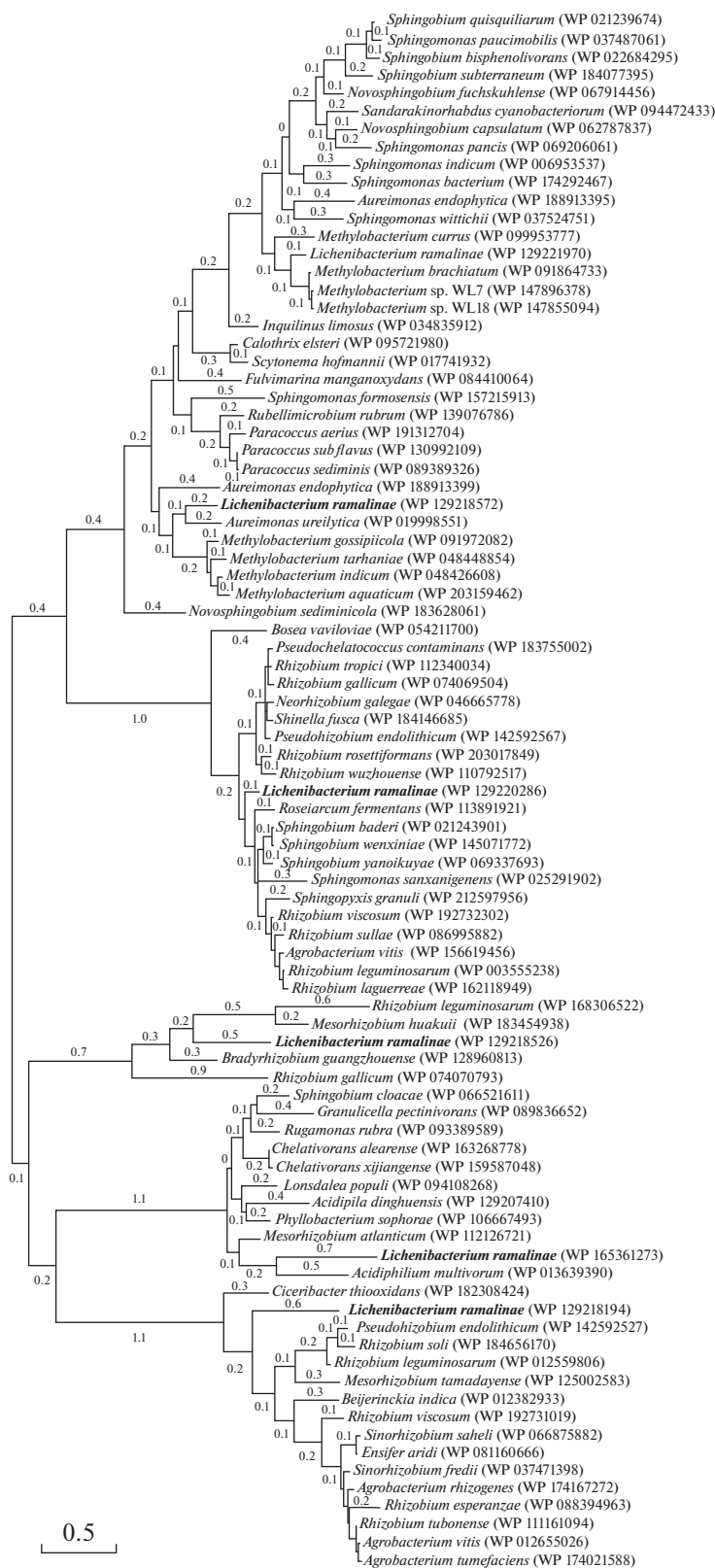


Рис. 2. Эволюционный анализ филогении гена *varC* *Lichenibacterium ramalinae* методом максимального правдоподобия. Показано дерево с наибольшим логарифмическим правдоподобием (–12422.15). Исходные деревья для эвристического поиска были получены автоматически путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице парных расстояний, оцененных с помощью модели JTT, и последующего выбора топологии с наибольшим значением логарифмического правдоподобия. Дерево нарисовано в масштабе, длина ветвей измеряется в количестве замен на сайт. В данном анализе участвовали 87 аминокислотных последовательностей. Всего в окончательном наборе данных было 172 позиции.

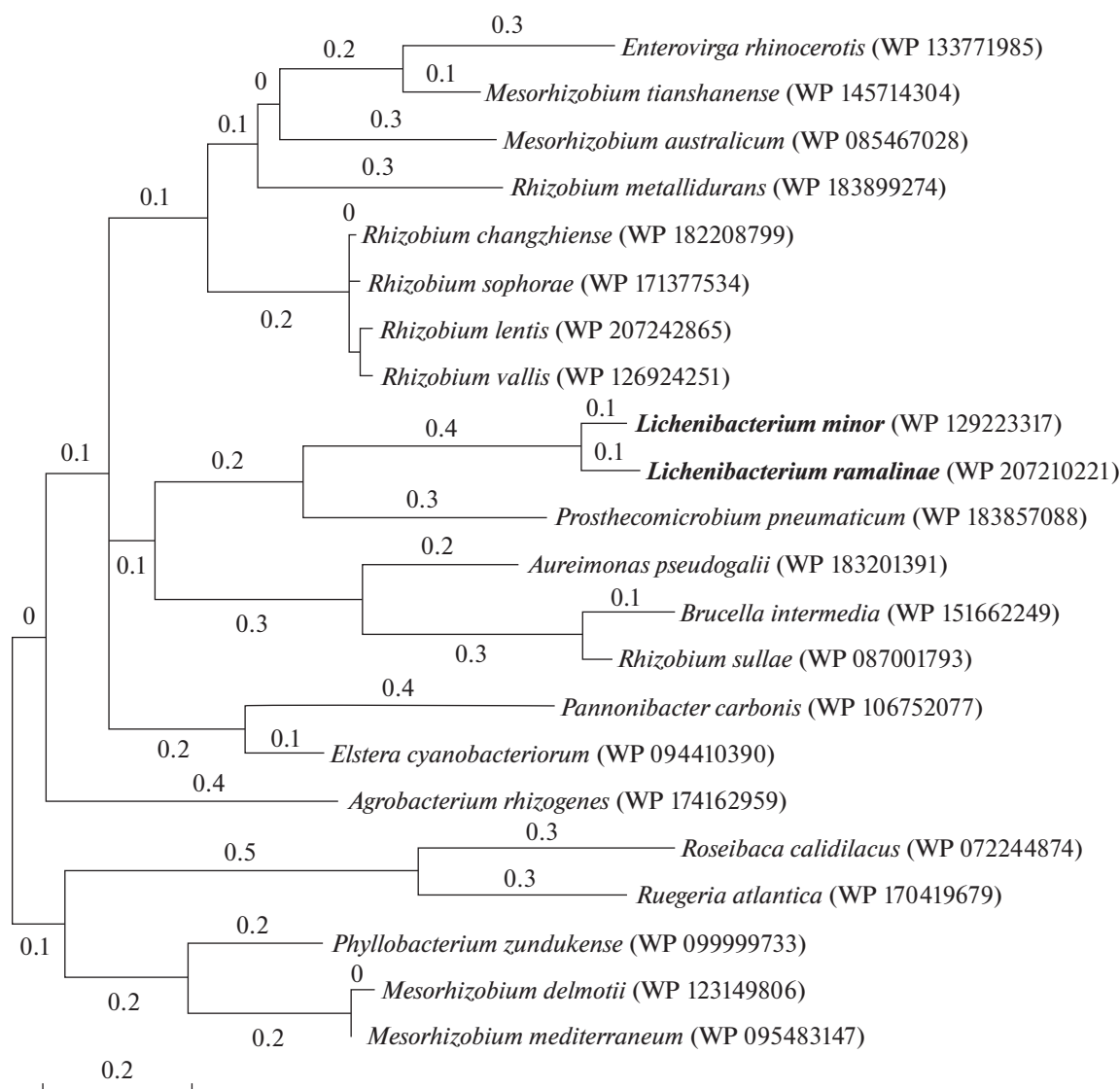


Рис. 3. Эволюционный анализ филогении гена *varB* у *L. ramalinae* и *L. minor* методом максимального правдоподобия. Эволюционная история была определена с помощью метода максимального правдоподобия и модели Jones et al. w/freq. Дерево нарисовано в масштабе, длина ветвей измеряется в количестве замен на сайт. В данном анализе участвовали 22 аминокислотные последовательности. Всего в окончательном наборе данных было 66 позиций.

pneumaticum, так и с паразитической *Brucella intermedia* и симбионтом *Rhizobium sullae* (рис. 3).

Ранее у патогена растений *Acidovorax citrulli* показана активация оперона *VarCB* системы во время инфекционного процесса (Shavit et al., 2016). Было установлено, что экспрессия *varB* отстает от экспрессии токсина на несколько суток. В отличие от патогенов животных, большинство патогенных бактерий растений, включая *A. citrulli*, колонизируют внеклеточные пространства внутри растительной ткани (Alfano, Collmer, 1996). Инвазия таких бактерий соответствует взаимодействию с растительной тканью, а не внутриклеточному поведению. Аналогичная ситуация возможна и для *Lichenibacterium*, когда факторы *VarCB* участву-

ют в активной колонизации лишайника. Тем более что данные, полученные Shavit et al. (2016) подтвердили, что в процессе колонизации проростков после заражения культурой *A. citrulli* численность клеток вырастала на три порядка, что указывало на отсутствие остановки деления клеток во время экспрессии *varC*. Таким образом, белки *VarBC* не останавливали рост бактериальной популяции, а наоборот, способствовали более активной колонизации.

В геномах обоих штаммов найден антитоксин Phd. Этот белок имеет различный уровень гомологии у двух видов *Lichenibacterium*. Если ген антитоксина *L. minor* кластеризуется в группу, представленную *Azospirillum*, *Segnochromacter*, *Methy-*

lorubrum и наиболее близок к *Nitrobacter*, то в случае *L. ramalinae* он имеет высокий уровень гомологии с геном паразитического *Ensifer adhaerens*, а также симбионта *Aureimonas endophytica* (рис. 4). В этом же кластере находится *Sphingomonas*, который, как было показано ранее, является одним из наиболее распространенных в лишайниках представителей альфапротеобактерий (Jiang et al., 2017). Ген токсина *doc* найден только у *L. ramalinae*. Система TA Phd/Doc ранее была обнаружена в геноме патогенной для растений бактерии *Pseudomonas syringae* (Guérout et al., 2013).

Интересно, что токсин HicA, ген которого также обнаружен в геномах обеих бактерий, у *L. ramalinae* не имеет антитоксина HicB. Можно предположить, что продукт трансляции гена *hicA* с помощью систем секреции выбрасывается за пределы клетки, где его мишенями могут являться РНК других микроорганизмов, в отношении которых может проявляться его специфичность. В то же время, *hicAB* присутствуют в хромосоме *L. minor*, у которого нет системы секреции VI типа.

Ранее для *Burkholderia pseudomallei* было показано влияние сверхэкспрессии токсина HicA на остановку роста и увеличение количества персистирующих клеток, устойчивых к ципрофлоксацину или цефтазидиму (Butt et al., 2014). Со стимулированием персистенции и формированием биопленочного фенотипа связывают и активность других ТА систем, например, RelBE и ParDE, которые также обнаружены в геномах обеих культур. Кроме указанных, в геномах обоих штаммов присутствуют ТА гены *pemK/mazF*, *brnT/brnA*, регулирующие ответ на стресс у ряда патогенных бактерий, например, *Brucella abortus* (Heaton et al., 2012). Таким образом, наличие токсин–антитоксин систем разного типа может свидетельствовать как о наличии устойчивости к стрессовым факторам хозяйского организма (антибиотики, лишайниковые кислоты, пептиды и т.д.), так и возможном участии исследуемых бактерий в формировании бактериобиома лишайника посредством контроля численности и активности собственных и чужеродных бактериальных популяций. Разнообразие ТА систем у *Lichenibacterium* может свидетельствовать о физиологической и экологической пластичности этого рода бактериобионтов лишайников.

Белки секреции I, II, IV, VI типов. Геномы *L. ramalinae* и *L. minor* включают в себя гены, кодирующие белки секреции I, II, IV и VI типов. Причем гены белков секреции первого типа представлены только ортологами *hlyD*. Они, по всей вероятности, являются уникальными, так как для большинства генов в нуклеотидных базах данных не удалось найти близкие гены, удовлетворяющие условиям гомологии. Исключение составляют лишь некоторые белки. Например, белок HlyD (NCBI no WP_165361460) имеет сходство с орто-

логами из бактерий рода *Methylobacterium* (выделены с листьев пшеницы), на уровне 74% (при 100% покрытии) и на уровне 61–63% – с ортологами из симбиотических *Mesorhizobium* и *Bradyrhizobium* (также при 100% покрытии).

Гены белков секреции второго типа представлены в геноме *L. ramalinae* 11 генами, из которых 5 объединены в одну кассету (рис. 5а), а остальные располагаются в различных участках генома. Часть из них представлена паралогичными генами псевдопилинов/секретин *gspDG*. У *L. minor* гены, кодирующие белки секреции II типа, расположены в двух кластерах (рис. 5б), в которых также присутствуют гены сборки пилинов и псевдопилинов. Системы секреции II типа являются наиболее распространенными, и обеспечивают транспорт разнообразных классов веществ через наружную мембрану грамотрицательных бактерий (Korotkov et al., 2012). Известно (Ursula et al., 2017), что система секреции II типа (T2SS) вносит свой вклад в жизнеспособность патогенной бактерии *Acinetobacter baumannii in vivo*. В частности, была показана роль T2SS в защите *A. baumannii* от человеческого комплемента. Мутанты с делецией гена T2SS *DgspD* были в 100 раз менее жизнеспособны при инкубации с человеческой сывороткой. Возможно, что у *Lichenibacterium* может функционировать сходный механизм защиты от хозяйского организма (микобионта).

Среди белков, секретируемых растительными патогенами и патогенами человека в процессе заражения, присутствуют в основном ферменты протеазы, липазы, хитиназы, а также эндотоксины (Sandkvist, 2001). Ранее при изучении метаболизма обоих штаммов *Lichenibacterium* мы обнаружили у *L. ramalinae* способность использовать пектин и ламинарин в качестве источников углерода (Pankratov et al., 2020). В то же время хитинолитическая и целлюлозолитическая активности не были обнаружены. Эти данные могут также указывать на то, что *Lichenibacterium* в лишайниковом симбиозе ассоциирован не с микобионтом, а с фотобионтом (ламинарин и пектины – полисахариды растительного происхождения).

Среди генов гликозилгидролаз, присутствующих в геноме *L. ramalinae*, найдены представители пяти семейств (1, 15, 16, 37 и 127), а в геноме *L. minor* – четырех семейств (1, 15, 16, 127). Семейство 16 – это гликозилгидролазы, субстратами которых являются полимеры, содержащие β -1,4- или β -1,3-гликозидные связи, 1,3- β -галактаны, 1,3- β -глюканы, 1,3(4)- β -глюканы, лихенаны, β -агарозы, β -порфираны and κ -каррагинаны. Некоторые из этих полисахаридов являются компонентами клеточных стенок грибов и водорослей. Ранее (Mathews et al., 2019) было показано, что гены гликозилгидролаз необходимы для факторов вирулентности *Agrobacterium tumefaciens* на

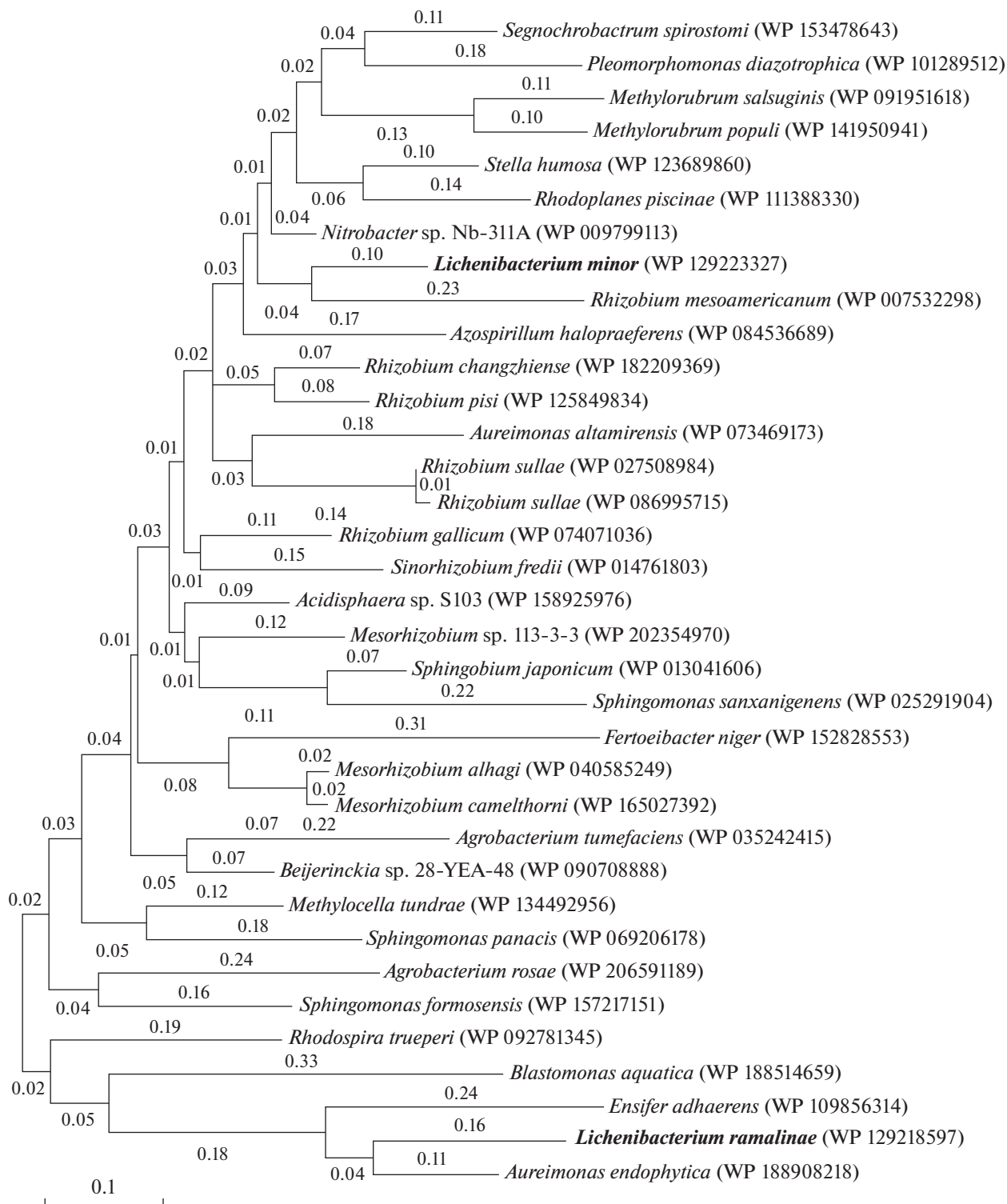


Рис. 4. Эволюционный анализ филогении гена *phd* *Lichenibacterium ramalinae* и *L. minor* методом максимального правдоподобия. Эволюционная история была определена с помощью метода максимального правдоподобия и модели Jones et al. w/freq. Исходные деревья для эвристического поиска были получены автоматически путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице парных расстояний, оцененных с помощью модели JTT, и последующего выбора топологии с лучшим значением log-вероятности.

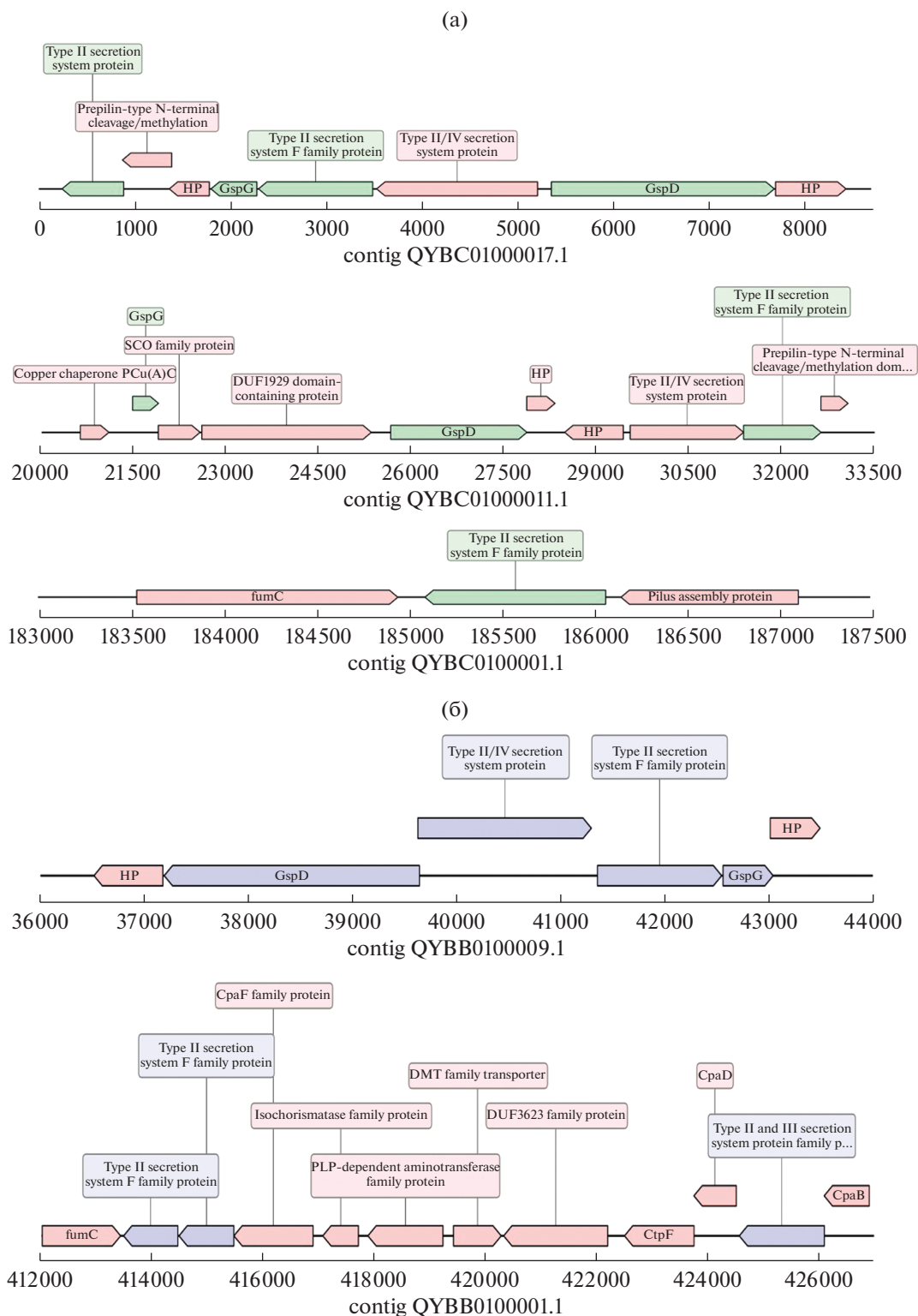


Рис. 5. Организация генов белков секреции II типа в геноме *L. ramalinae* (а) и *L. minor* (б). НР – гипотетический белок.

Bryophyllum daigremontiana и *Solanum lycopersicum*. В работе d'Enfert и соавт. (1987) была впервые показана роль второй системы секреции во внеклеточном транспорте пуллулазы. Вероятно, что

системы секреции II типа у *Lichenibacterium* вносят свой вклад в транспорт гликозилгидролаз, участвующих в ассоциации с микобионтом или фотобионтом.

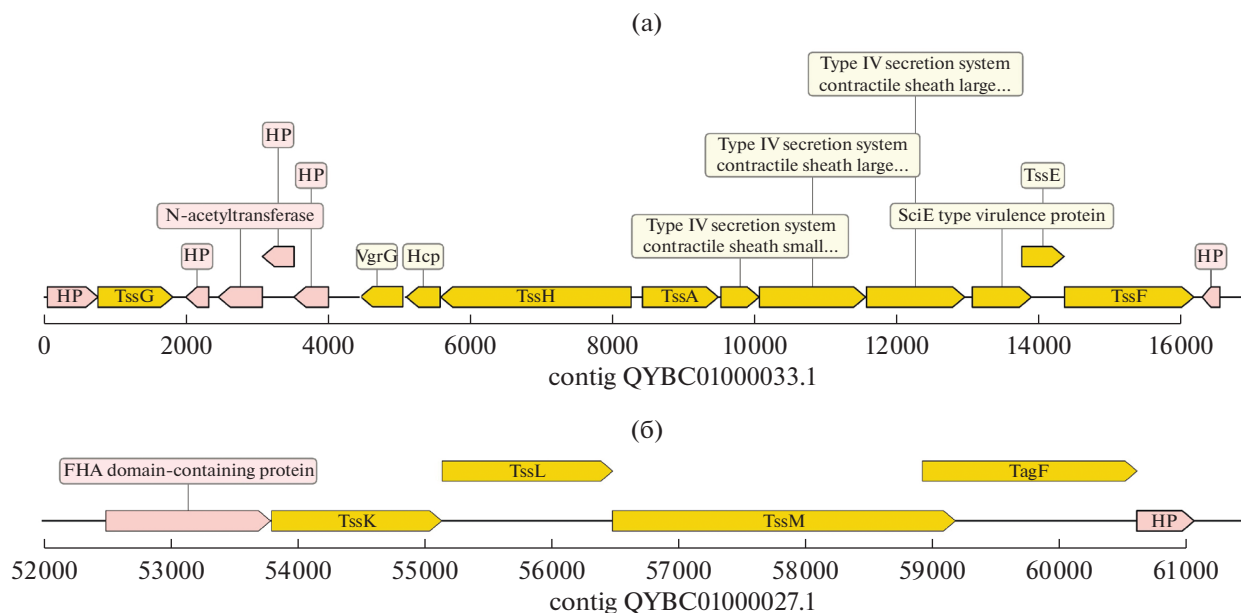


Рис. 6. Положение генов, кодирующие белки секреции VI типа в геноме *L. ramalinae*: а – оперон белков сборки канала секреции; б – гены, кодирующие мембранные белки секреции VI типа. HP – гипотетический белок.

Если гены синтеза белков секреции II типа характерны для обоих видов *Lichenibacterium*, то гены синтеза белков VI типа (Т6SS) найдены только у *L. ramalinae*, что указывает на функциональные различия двух видов. Пластичность кластера Т6SS предполагает, что эволюционно эта система могла быть приобретена *L. ramalinae* путем горизонтального переноса (Navarro-García et al., 2019). Известно, что Т6SS грамотрицательных бактерий представляют собой устройства эффекторной транслокации, напоминающие перевернутое устройство для прокалывания у бактериофагов, состоящее, по крайней мере, из 13 белков, называемых ядерными компонентами. Бактерии используют быстрое сокращение длинной оболочки секреторной системы типа VI (Т6SS) для доставки эффекторов в клетку-мишень. Они осуществляют широкий набор функций, включая вирулентность и антибактериальную активность (Pukatzki et al., 2006, 2009; Sana et al., 2012), а также являются компонентом систем межбактериальной коммуникации (Galliche et al., 2017). В геноме *L. ramalinae* гены этой системы организованы в два оперона, первый из которых включает гены белков сборки канала секреции – гены, кодирующие белки базальной пластинки *tssEFGK*, наконечник *Hcp* и *VgrG* – гемолизин-корегулируемый белок (белок прокалывания клетки) (рис. 6а). Второй содержит гены, кодирующие белки мембранного комплекса (рис. 6б).

Ранее было показано, что система секреции Т6SS используется бактериями для атаки на другие бактерии (Basler et al., 2013). Нельзя исклю-

чить, что бактерии *L. ramalinae* могут участвовать в атаках на грамотрицательные бактерии, поддерживая таким способом стабильность лишайникового бактериобиома. Ближайшими гомологами белков *Hcp* и *VgrG* являются белки эпифитных *Methylobacterium* и корневых симбионтов растений *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Neorhizobium* (>72% идентичности). Уровень сходства гомологичных генов, кодирующих белки базальной пластинки, оказался меньше, и составил около 60–62% с ортологами из эпифитных *Methylobacterium*. Можно предположить, что разные гены, кодирующие белки комплекса Т6SS у *L. ramalinae* были приобретены независимо, путем горизонтального переноса.

Уреаза. Обе культуры *Lichenibacterium* имеют все гены для экспрессии белков, участвующих в гидролизе мочевины, включая системы транспорта мочевины в клетку. В геномах также найдены системы транспорта никеля – кофактора уреазы (*HoxN/HupN/NixA*, белок бисинтеза кофактора никель-пинчера *LarV* и белок вставки никеля *LarC*).

Вероятно, что присутствие уреазы у этих бактерий обусловлено необходимостью адаптации к кислой среде, характерной для всех кладониевых лишайников и рамалины (рН водных экстрактов талломов от 3.5 до 4.5 в апикальной части таллома (Pankratov, 2012)). Следствием активности уреазы может быть понижение рН микроокружения, увеличение пула доступного иона аммония, а также формирование дополнительного бикарбоната, который может быть использован как самими

бактериями, так и водорослями в цикле Кальвина. На фоне данных, указывающих на ассоциацию *Lichenibacterium* с водорослями, предположение об участии уреаз в стимулировании фототрофии у водорослей может быть достойным последующей экспериментальной проверки.

Таким образом, анализ геномов двух бактериобионтов лишайников *Lichenibacterium ramalinae* и *L. minor* показал наличие генетических детерминант, экспрессия которых может обусловить направленную инвазию этих бактерий в лишайниковый симбиоз. Наличие ТА систем двух типов предполагает возможность вовлечения этих бактерий в процессы регуляции состава и численности микроокружения во внутренней среде таллома лишайника, а также регулировки численности собственной популяции в ответ на стресс. Четыре системы секреции потенциально способны обеспечивать многоуровневую коммуникацию в микробных ценозах лишайников с микроорганизмами-соседами и способствовать формированию биопленочных фенотипов *Lichenibacterium*. Отсутствие системы секреции III типа предполагает, что эти бактерии не имеют механизмов, обеспечивающих инвазию в клетки эукариот, следовательно, паразитизм на эукариотах можно исключить. Подтверждением этому является спектр потребляемых субстратов, в который, прежде всего, входят полиолы и сахара (Pankratov et al., 2020), что характерно для свободноживущих бактерий. Вероятнее всего, мутуализм является основной стратегией *Lichenibacterium* в симбиозе с лишайником. Позитивная роль *Lichenibacterium* может заключаться в контроле численности нежелательных бактерий и создании микросреды, в которой происходит обогащение продуктами распада мочевины — гидрокарбоната и аммония. Наличие разнообразных систем секреции, ТА систем и уреазы позволяет этим бактериям проявлять экологическую и физиологическую пластичность в разных микроусловиях, возникающих при формировании и дальнейшем росте таллома лишайника.

Два вида этого рода отличаются по набору генов, обеспечивающих обсуждаемые функции. Для *L. minor* характерно отсутствие системы секреции VI типа, но при этом более активно выражены процессы образования каротиноидов — β -каротина и ликопина (Pankratov et al., 2020). Кроме того, в геноме *L. minor* обнаружены гены, отвечающие за синтез бактериохлорофилла (2-винил бактериохлорофиллид гидратаза, ферредоксин:протохлорофиллид редуктаза, хлорофилл синтаза ChlG и другие) и белков фотосистемы II, что предполагает, при наличии возможной фотозависимой фиксации CO₂, автономное существование этого вида в лишайниковом симбиозе. У *L. ramalinae* есть все системы для проявления антибактериальных свойств, что подразумевает более активное участие этих бактерий в регуляции состава бактериобиома лишайников.

Итак, анализ геномов бактериобионтов лишайников *L. ramalinae* и *L. minor* показал, что стратегии выживания двух видов могут отличаться. *L. ramalinae* приобретает черты более глубоко интегрированного в лишайниковый симбиоз организма, а *L. minor*, приобретая, по-видимому, путем горизонтального переноса фотосистему II и гены синтеза бактериохлорофилла, стремится к автономии, но сохраняет способность противостоять атакам со стороны бактериального микроокружения и эукариот.

Номера доступа DDBJ/ENA/GenBank для последовательностей, созданных в этом исследовании, следующие: QYVC000000 (геном штамма RmlP001T) и QYVB000000 (геном штамма RmlP026T).

Пользовательские скрипты, использованные в данном исследовании для визуализации кластеров генов, были размещены на Github (https://github.com/nikitin-p/Lichenibacterium_analysis).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана грантом РФФИ (№ 19-04-00297а) и частично Министерством образования и науки Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alfano J.R., Collmer C. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall // *Plant Cell*. 1996. V. 8. P. 1683–1698. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1683>
- Ansari S., Yamaoka Y. Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory // *Helicobacter*. 2017. V. 22. Art. 10.1111/hel.12386. <https://doi.org/10.1111/hel.12386>
- Basler M., Ho B.T., Mekalanos J.J. Tit-for-tat: type VI secretion system counterattack during bacterial cell–cell interactions // *Cell*. 2013. V. 152. P. 884–894. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.042>
- Butt A., Higman V.A., Williams C., Crump M.P., Hemsley C.M., Harmer N., Titball R.W. The HicA toxin from *Burkholderia pseudomallei* has a role in persister cell formation // *Biochem. J*. 2014. V. 459. P. 333–344. <https://doi.org/10.1042/BJ20140073333>
- Cardinale M., de Castro J.V., Mueller H., Berg G., Grube M. *In situ* analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of *Alphaproteobacteria* // *FEMS Microbiol. Ecol.*

2008. V. 66. P. 63–71.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00546.x>
- Clark E.L., Karley A.J., Hubbard S.F. Insect endosymbionts: manipulators of insect herbivore trophic interactions? // *Protoplasma*. 2010. V. 244. P. 25–51.
<https://doi.org/10.1007/s00709-010-0156-2>
- Cox G.M., Mukherjee J., Cole G.T., Casadevall A., Perfect J.R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis // *Infect Immun*. 2000. V. 68. P. 443–448.
<https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.443-448.2000>
- Depluvere S., Devos S., Devreese B. The role of bacterial secretion systems in the virulence of gram-negative airway pathogens associated with cystic fibrosis // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. Art. 1336.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01336>
- d'Enfert C., Ryter A., Pugsley A.P. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase // *EMBO J*. 1987. V. 6. P. 3531–3538.
- 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. Art. 53.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00053>
- Fraikin N., Goormaghtigh F., Van Melderen L. Type II toxin-antitoxin systems: evolution and revolutions // *J. Bacteriol.* 2020. V. 202. e00763-19.
<https://doi.org/10.1128/JB.00763-19>
- Gallique M., Bouteiller M., Merieau A. The type VI secretion system: a dynamic system for bacterial communication? // *Front. Microbiol.* 2017. V. 28. Art. 1454.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01454>
- González I., Ayuso-Sacido A., Anderson A., Genilloud O. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005. V. 54. P. 401–415.
<https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.05.004>
- Green E.R., Meccas J. Bacterial secretion systems: an overview // *Microbiol. Spectr.* 2021. V. 4.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015>
- Grube M., Berg G. Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis // *Fungal Biol. Rev.* 2009. V. 23. P. 72–85.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.10.001>
- Grube M., Cardinale M., de Castro J., Müller H., Berg G. Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses // *ISME J*. 2009. V. 3. P. 1105–1115.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2009.63>
- Guérout A.-M., Iqbal N., Mine N., Ducos-Galand M., Van Melderen L., Mazel D. Characterization of the *phd-doc* and *ccd* toxin–antitoxin cassettes from *Vibrio* superintegrons // *J. Bacteriol.* 2013. V. 195. P. 2270–2283.
- 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.
- Hayes F. Toxins–antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest // *Science*. 2003. V. 301. P. 1496–1499.
<https://doi.org/10.1126/science.1088157>
- Heaton B.E., Herrou J., Blackwell A.E., Wysocki V.H., Crosson S. Molecular structure and function of the novel BrnT/BrnA toxin–antitoxin system of *Brucella abortus* // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 12098–12110.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.332163>
- Hodkinson B.P., Lutzoni F. A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the *Rhizobiales* // *Symbiosis*. 2009. V. 49. P. 163–180.
<https://doi.org/10.1007/s13199-009-0049-3>
- Hunter J.D. Matplotlib: A 2D graphics environment // *Comput. Sci. Eng.* 2007. V. 9. P. 90–95.
<https://doi.org/10.1109/mcse.2007.55>
- Jiang D.-F., Wang H.-Y., Si H.-L., Zhao L., Liu C.-P., Zhang H. Isolation and culture of lichen bacteriobionts // *The Lichenologist*. 2017. V. 49. P. 175–181.
<https://doi.org/10.1017/S0024282917000044>
- Korotkov K., Sandkvist M., Hol W. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism // *Nat. Rev. Microbiol.* 2012. V. 10. P. 336–351.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2762>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Mol. Biol. Evol.* 2018. V. 35. P. 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Li E., Hamm C.M., Gulati A.S., Sartor R.B., Chen H., Wu X., Zhang T., Rohlf F.J., Zhu W., Gu C., Robertson C.E., Pace N.R., Boedeker E.C., Harpaz N., Yuan J., Weinstock G.M., Sodergren E., Frank D.N. Inflammatory Bowel diseases phenotype, *C. difficile* and NOD2 genotype are associated with shifts in human ileum associated microbial composition // *PLoS One*. 2012. V. 7. e26284.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026284>
- Mathews S.L., Hannah H., Samagaio H., Martin C., Rodriguez-Rassi E., Matthyse A.G. Glycoside hydrolase genes are required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens* on *Bryophyllum daigremontiana* and tomato // *Appl. Environ. Microbiol.* 2019. V. 85. e00603-19.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00603-19>
- Navarro-García F., Ruiz-Perez F., Cataldi Á., Larzábal M. Type VI secretion system in pathogenic *Escherichia coli*: structure, role in virulence, and acquisition // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. Art. 01965.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01965>
- Noh H.J., Baek K., Hwang C.Y., Shin S.C., Hong S.G., Lee Y.M. *Lichenihibitans psoromatis* gen. nov., sp. nov., a member of a novel lineage (*Lichenihibitantaceae* 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>
- Nurhani A.R.S., Abdul Munir A.M., Mohd Wahid S., Farah Diba A.B. A preliminary transcriptomic analysis of lichen *Dirinaria* sp. // *AIP Conference Proceedings*. 2013. V. 1571. P. 258.
<https://doi.org/10.1063/1.4858665>
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. P. 1166–1167.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Pankratov T.A., Grouzdev D.S., Patutina E.O., Kolganova T.V., Suzina N.E., Berestovskaya J.J. *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. P. 477–489.
<https://doi.org/10.1007/s10482-019-01357-6>
- Pankratov T.A., Kachalkin A.V., Korchikov E.S., Dobrovolskaya T.G. Microbial communities of lichens // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 293–309.
<https://doi.org/10.1134/S0026261717030134>
- Pukatzki S., Ma A.T., Sturtevant D., Krastins B., Sarracino D., Nelson W.C., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 1528–1533.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0510322103>
- Pukatzki S., McAuley S.B., Miyata S.T. The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains // Curr. Opin. Microbiol. 2009. V. 12. P. 11–17.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.11.010>
- Sana T.G., Hachani A., Bucior I., Soscia C., Garvis S., Termine E., Engel J., Filloux A., Bleves S. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and fur and modulates internalization in epithelial cells // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 27095–27105.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.376368>
- Sandkvist M. Type II secretion and pathogenesis // Infect. Immun. 2001. V. 69. P. 3523–3535.
<https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.3523-3535.2001>
- Shavit R., Lebendiker M., Pasternak Z., Burdman S., Helman Y. The *vapB*–*vapC* operon of *Acidovorax citrulli* functions as a *Bona-fide* toxin–antitoxin module // Front. Microbiol. 2016. V. 6. Art. 1499.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01499>
- Tatusov R.L., Koonin E.V., Lipman D.J. A genomic perspective on protein families // Science. 1997. V. 278. 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>
- Ursula W., Johnson T.L., Chedid Kh., Xi Ch., Simmons L.A., Mobley H.L.T., Sandkvist M. Targeting the type II secretion system: development, optimization, and validation of a high-throughput screen for the identification of small molecule inhibitors // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2017. V. 7. Art. 380.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00380>
- Van Rossum G., Drake F.L. Python 3 Reference Manual. . Scotts Valley, CA: CreateSpace. 2009.
- Wicaksono W.A., Cernava T., Grube M., Berg G. Assembly of bacterial genomes from the metagenomes of three lichen species // Microbiol. Resour. Announc. 2020. V. 9. e00622-20.
<https://doi.org/10.1128/MRA.00622-20>
- Zulkower V., Rosser S. DNA Features Viewer, a sequence annotations formatting and plotting library for Python // Bioinformatics. 2020. V. 36. P. 4350–4352.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa213>

Genome Analysis of Two Lichen Bactobionts, *Lichenibacterium ramalinae* and *Lichenibacterium minor*: Toxin–Antitoxin Systems and Secretion Proteins

T. A. Pankratov¹*, P. A. Nikitin², and E. O. Patutina³

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Moscow, 119192 Russia

³Skryabin Institute of Bioengineering, Research Centre of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: tpankratov@gmail.com

Received October 31, 2021; revised November 15, 2021; accepted November 15, 2021

Abstract—The genomes of two bactobionts of the fruticose lichen *Ramalina pollinaria*, *Lichenibacterium ramalinae* and *L. minor*, were analyzed. Genetic determinants potentially determining the integration and adaptation of these bacteria in the lichen thallus were identified. This is the first report on assessment of genetic determinants of the stress reaction factors and secretion systems of lichen bacteriobionts. The genes encoding the proteins of the VapCB toxin-antitoxin (TA) systems exhibited >60% homology with the genes of the known plant symbionts *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Mesorhizobium*, and *Ralstonia*, as well as with those of a human pathogen *Bartonella*. The genes encoding the proteins of type II secretion system were found in the genomes of both species. The genes encoding type IV secretion proteins were found only in the genome of *L. ramalinae*; they were homologous to those of epiphytic *Methylobacterium*, plant pathogens *Agrobacterium*, and plant root symbionts *Rhizobium* and *Neorhizobium*. Homology between the genes encoding TA system and secretion system proteins and the genes of plant-associated bacteria was over 60%. This may indicate that green algae are the main target for invasion. Detection of the urease synthesis genes in the genomes of lichen bacteriobionts suggested the hypothesis that urea decomposition results in an additional supply of ammonium and bicarbonate to the symbiosis. The latter may potentially be utilized by phototrophic eukaryotes and prokaryotes as an additional carbon source. Analysis of the genomes of lichen bacteriobionts *L. ramalinae* and *L. minor* revealed the possible differences in their survival strategies, with *L. ramalinae* more integrated into the symbiosis, while *L. minor* is characterized by more autonomous features.

Keywords: *Lichenibacterium*, genome analysis, virulence, adaptation, lichens