

Artículo

# Potencial biotecnológico de los líquenes: una ventana metabólica para su análisis y aprovechamiento.

César Álvarez-Mejía<sup>1</sup>, Adán T. Morales-Vargas<sup>2</sup>, Varinia López-Ramírez<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Tecnológico Nacional de México/ITS de Abasolo, Coordinación de ingeniería Ambiental, Blvd. Cuitzeo de los Naranjos 401, Col. Cuitzeo de los Naranjos, 36976, Abasolo Guanajuato, México.

<sup>2</sup> Departamento de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Universidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, Av. Mutualismo Esq. Prol. Río Lerma S/N, 38060, Celaya, Guanajuato, México

<sup>3</sup> Tecnológico Nacional de México/ITS de Irapuato. Coordinación de Ing. Bioquímica. Carretera Irapuato-Silao km 12.5 Col. El Copal, 36821, Irapuato, Guanajuato, México.

\* Correspondencia: varinia.lr@irapuato.tecnm.mx.

**Resumen:** Los líquenes son organismos constituidos por la asociación simbiótica establecida entre un hongo (micobionte), una levadura y un organismo fotosintético (fotobionte; alga o cianobacteria). Han sido considerados como micro-ecosistemas porque además pueden asociarse a ellos bacterias. La estrecha relación entre organismos de diferentes grupos biológicos hace de los líquenes un modelo biológico de interés, no solo por la relación física y metabólica que guardan las fracciones comprometidas en la simbiosis, sino también por la transición morfológica responsable de la diversidad de morfotipos que presentan las especies. Estos organismos han desarrollado estrategias que les permiten adaptarse a condiciones ambientales no favorables, permitiendo su distribución cosmopolita. Por no depender de su sustrato, los líquenes pueden acoplarse a rocas, suelo, cortezas de árboles e incluso edificaciones. Hasta ahora, se han descrito más de 15,000 especies de líquenes, que se han clasificado principalmente en base a sus características macroscópicas, su reactividad frente a compuestos químicos y los metabolitos secundarios que sintetizan. Esta asociación ha contribuido a la generación de compuestos secundarios complejos, asociados a la diversidad metabólica de los simbioses, algunos de los cuales que han sido estudiados presentan un uso importante como fármacos, antibióticos, tintes, antioxidantes etc., exhibiendo propiedades innovadoras en diversos campos de la industria farmacéutica y alimentaria. Dada la diversidad que presentan, se considera que exista aun una gran cantidad de compuestos por explorar, y sobre todo, su papel en el establecimiento y ventajas adaptativas en el ecosistema. Gracias al conocimiento sobre los procesos metabólicos descritos para la síntesis de sustancias líquénicas, y al avance sobre el aislamiento, cultivo y mantenimiento de los simbioses se prevé que a partir de este grupo de organismos en un futuro se podrán obtener compuestos con potencial biotecnológico

**Keywords:** *Líquenes; Metabolitos secundarios; Biotecnología*

**Citar este trabajo:** Álvarez-Mejía, C.; Morales-Vargas, A.; López-Ramírez, V. Potencial biotecnológico de los líquenes: una ventana metabólica. *REIA* 2022, 6 (4), 28-39.

Recibido: 18/07/2022

Aceptado: 09/09/2022

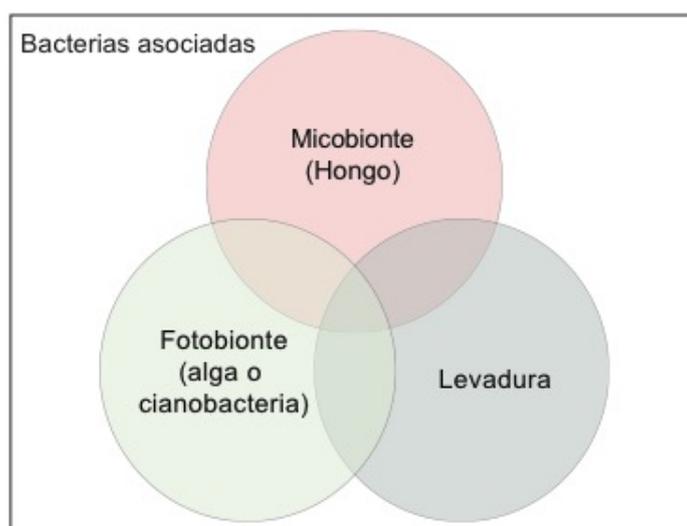
Publicado: 07/12/2022

## 1. Estructura y composición de líquenes.

Los líquenes son organismos producto de la relación simbiótica de especímenes de diferente origen biológico (Figura 1). Donde el hongo o micobionte provee el cuerpo del líquen, mientras que el fotobionte asegura la producción de carbohidratos o polioles que favorecen el desarrollo del hongo [1-2]. En esta asociación, el micobionte es dependiente de la presencia del fotobionte, sin embargo, existen algunas especies que son capaces de

desarrollarse en ausencia de su simbiote y presentar características morfológicas diferentes [3-4]. Un estudio realizado por Spribille y col. (2016) señala la presencia de una tercera fracción constituyente, una levadura del género *Cyphobasidium* spp., que podría estar involucrada en la regulación de síntesis de metabolitos secundarios por parte del micobionte [5]. Aunado a esta complejidad, algunos autores se han enfocado en el estudio de comunidades bacterianas epífitas de los líquenes con el fin de evaluar la contribución de dichas poblaciones en el mantenimiento y regulación de la simbiosis, así como en la producción de metabolitos con actividad biológica [6-9]. La diversidad bacteriana descrita por medio de estudios metagenómicos, sugiere que la estructura poblacional de las comunidades que pueden encontrarse en los líquenes, depende del nicho ecológico donde se encuentren [10]. Dichas poblaciones bacterianas pueden incluso sobrevivir a las condiciones de almacenaje en las colecciones por largos periodos de tiempo, como en el caso de *Lobaria pulmonaria*, donde se ha estimado que la población bacteriana puede recuperarse hasta 80 años posterior a su colecta [11]. Los líquenes tienen que verse como modelos simbióticos, donde las fracciones constituyentes interactúan estrechamente entre sí y con ecto- y endo-comunidades bacterianas, modificando con esto la concepción que se tenía de ellos, ahora deben de ser evaluados como micro-ecosistemas para poder entender la complejidad de procesos que pueden llevarse a cabo en el interior de sus cuerpos o talos.

Otra característica que destaca de los líquenes, es su capacidad de desarrollarse en diversos sustratos y bajo condiciones climáticas extremas lo que los hace un grupo altamente diverso [12]. Su clasificación se basa en sus características morfológicas y la reactividad química de sus metabolitos frente a soluciones ácidas o alcalinas [13], aunque en la actualidad se ha comenzado a utilizar métodos genéticos para una mejor clasificación y análisis evolutivos de los mismos [14-15]. A pesar de estar conformados por organismos de distinto origen, anteriormente los líquenes se clasificaban dentro del grupo de las plantas [16], actualmente se clasifican dentro del grupo de los hongos y el nombre de la especie líquénica toma el nombre del micobionte [17].



**Figura 1.** Fracciones constituyentes de los líquenes identificadas como simbiotes.

## 2. Clasificación de los líquenes.

Dada la diversidad líquénica descrita hasta ahora, se han establecido tres criterios de evaluación para su clasificación que están basados en tres aspectos generales: i) género del micobionte, ii) características morfológicas y iii) reactividad química. En el primer caso, el micobionte definirá muchas veces las características fenotípicas del líquen dado

que se ha observado que no existe correspondencia entre el número de micobiontes y fotobiontes, es decir, un mismo fotobionte puede estar asociado a diferentes tipos de micobiontes [18-19]. En cuanto a sus características morfológicas, los líquenes se clasifican en crustáceos o crustosos, foliares (con o sin lóbulos) y fruticosos (arbustivos o colgantes; Figura 2). La clasificación morfológica puede incluir aspectos como el desarrollo de ascocarpos y ascos [20]. La reactividad química de sus metabolitos frente a compuestos ácidos ( $\text{HNO}_3$  al 50% v/v) y básicos (KOH al 10% p/v) y sus combinaciones, al igual que análisis por técnicas cromatográficas dan indicio de la diversidad de compuestos y/o productos metabólicos sintetizados por los líquenes y contribuyen a discriminar especímenes que son morfológicamente idénticos [21]. Al área de investigación que se centra en la clasificación de especies liquénicas a partir de sus metabolitos se le conoce como quimiotaxonomía [22].



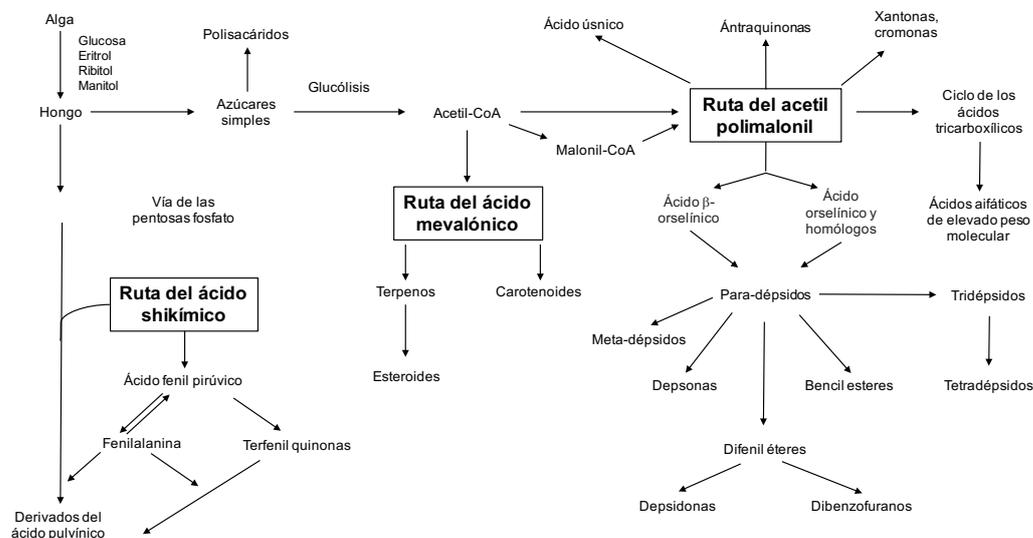
**Figura 2.** Clasificación de líquenes de acuerdo a su morfología. A. Crustosos; B. Foliares; C. Fruticosos.

### 3. Metabolitos secundarios sintetizados por líquenes.

La investigación microbiana, ha demostrado que los hongos son una fuente importante de metabolitos secundarios, de estructura compleja, con una amplia variabilidad de funciones, principalmente a nivel de nuevos antibióticos, anticancerígenos, etc. [23]. Estos compuestos generalmente son producto de procesos de adaptación, comunicación intra o interespecífica, así como de estrategias para el dominio del hábitat ante otros microorganismos, por ello, la ecología de diversos hongos presentes en el suelo ha sido sujeto a un intenso estudio [24].

Entre los sistemas de mayor interés para la búsqueda de compuestos secundarios, encontramos a los hongos o micobiontes presentes en líquenes. Hasta ahora se han descrito más de 700 compuestos químicos producidos por líquenes, de algunos de éstos se ha estimado que dicha síntesis sólo es posible cuando las fracciones se encuentran unidas [25]. Los metabolitos secundarios de líquenes se han identificado por pruebas químicas, cristalización de extractos y posterior comparación de estructuras con guías y referencias, por cromatografía en capa de papel, por cromatografía en capa fina (TLC), por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectrometría de masas (MS) y por espectroscopía de resonancia magnética nuclear [26].

La disposición de los metabolitos secundarios o sustancias liquénicas se sugiere que están presentes en la medula del talo o cuerpo del líquen [17]. Las tres vías metabólicas implicadas en la síntesis de sustancias liquénicas son: (i) la vía del acetil polimalonil, (ii) la vía de ácido shikímico y (iii) la vía del ácido mevalónico [17, 21] (Figura 3).



**Figura 3.** Vías metabólicas y conjunto de metabolitos secundarios derivados. Tomada y modificada de (Nash III, 2008) [17].

De este conjunto de vías se desprenden compuestos de diferente naturaleza química y grado de complejidad, que otorgan a los líquenes sus colores y propiedades fenotípicas (Tabla 1), sin embargo, únicamente se ha probado la actividad biológica de un conjunto de los productos obtenidos por estas vías de síntesis. Dichos metabolitos secundarios pueden estar constituidos por aminoácidos, ácidos orgánicos, lípidos, policétidos, carbohidratos, dépsidos, depsidonas y terpenos, y presentan actividad antibiótica, antitumoral, citotóxica, antiproliferativa, antihumectante, antiprionica, antioxidante, entre otras (Figura 4) [27-29].

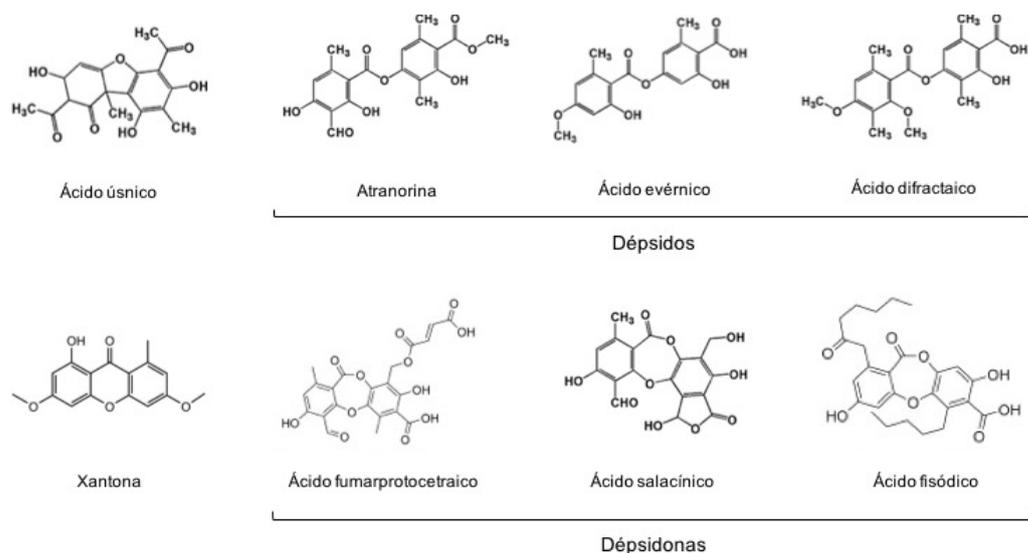
**Tabla 1.** Algunas actividades biológicas asociadas a metabolitos secundarios de líquenes.

Liquen	Metabolitos secundarios	Actividad	Referencia
<i>Cetraria islandica</i> , <i>Cladonia furcata</i> , <i>Hypogymnia physodes</i> , <i>Lasallia pustulata</i> , <i>Parmelia caperata</i> , <i>Parmelia sulcata</i> , <i>Xanthoparmelia stenophylla</i> , <i>Rhizoplaca chrysoleuca</i> , <i>Thammodia vermicularis</i> , <i>Ramalina terebrata</i>	Compuestos fenólicos, flavonoides y ramalina.	Antioxidante	[30-34].
<i>Ramalina farinacea</i> <i>Umbilicaria cylindrica</i> <i>Cladonia convoluta</i> <i>Cladonia firma</i>	Dépsidos, Ácido norstictico, carboxilato de β-metil orcinol, etil haematomato, atranorina y ácido úsnico.	Antimicrobiana	[27, 35-37].
<i>Cladonia furcata</i> , <i>Cladonia pyxidata</i> , <i>Cladonia rangiferina</i> .	Ácido fumarprotocetraico.	Antitumoral	[32,38].

<i>Flavocetraria cucullata</i>	Ácido salacínico, ácido escumático, ácido baeomicésico, ácido d-protoliquesterínico y ácido liquesterínico.	Citotóxica	[37-39].
<i>Parmelia sulcata</i> , <i>Cladonia rangiferina</i> , <i>Lobaria pulmonaria</i> .	Serina proteasa.	Antiprionica	[40].
<i>Teloschistes chrysophthalmus</i> , <i>Ramalina celastri</i>	Ácido úsnico y parietina.	Antiviral	[41].
<i>Platismatia glauca</i> , <i>Pseudevernia furfuracea</i> ; así como especies de los géneros <i>Usnea</i> , <i>Ramalina</i> , <i>Lecanora</i> , entre otros.	Ácido úsnico.	Inhibidor de formación de biopelículas microbianas	[42-43].

#### 4. Usos de los compuestos liquénicos.

El metabolito secundario sintetizado por líquenes y que ha recibido mayor atención por parte de la comunidad científica, y que es empleado en la industria farmacéutica y cosmética, es el ácido úsnico [42], el cual es sintetizado por especies de los géneros *Usnea*, *Ramalina*, *Cladonia*, *Parmelia*, *Alectoria*, *Lecanora* y *Evernia*, y se ha reportado que presenta actividad antiviral, antiproliferativa, antiinflamatoria, analgésica además de presentar actividad antimicrobiana inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Haemophilus influenzae*. Este compuesto es empleado en pomadas para el tratamiento de quemaduras y se ha logrado sintetizar químicamente [44-45, 28].



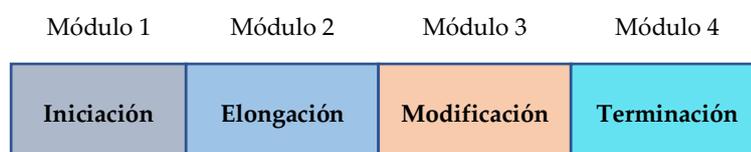
**Figura 4.** Estructura química de sustancias liquénicas con actividad biológica.

Por otra parte, algunos compuestos derivados de xantina y  $\beta$ -carotenos presentes en líquenes de las especies *Cladonia vulcani*, *Ramalina lacera* y *Thamnolia vermicularis*, se han asociado a actividades antioxidantes y de fotoprotección [39, 45-46], estos compuestos han sido identificados espectrofotométricamente, por HPLC y cromatografía de gases. Su acu-

mulación es diferencial dependiendo de si las fracciones del líquen se encuentran separadas (micobionte y fotobionte) o en respuesta a la desecación y/o rehidratación de los especímenes [25, 34, 48]. Esto es importante considerar cuando se planea la obtención de metabolitos secundarios de origen líquénico, ya que algunos metabolitos sólo se sintetizan cuando ambas fracciones están juntas. La incorporación de nuevas técnicas como el análisis de imágenes obtenidas por espectroscopia de masas (MSI, por sus siglas en inglés), ofrece una alternativa para la identificación y evaluación de la concentración, así como la determinación de patrones de distribución espacial de sustancias líquénicas con el fin de establecer el papel que tienen dichos metabolitos a nivel fisiológico y ecológico [49]. Se ha evaluado la síntesis de nanopartículas usando plata y su uso como agentes antimicrobianos aún está en evaluación [50] y se sigue explorando nuevas combinaciones de las mismas para determinar el espectro de acción, así como su evaluación en agentes anticancerígenos [51]. El uso de nanopartículas no solo se ha limitado al sector clínico, su uso de nanopartículas de plata con diferentes metabolitos líquénicos ha sido evaluados en diversos sectores con interés comercial, considerando el bajo costo y la eficiencia dentro de sus procesos [52]. Esta diversidad metabólica tiene un especial interés para entender la complejidad de la asociación simbiótica, así como el efecto adaptativo en el ecosistema, por lo tanto, comprender el proceso de síntesis y regulación nos ayudará a entender un poco más la restauración de hábitats que experimentan un desequilibrio ecológico por la contaminación o cambio climático [53]. Un aspecto relevante adicional a los metabolitos secundarios, es el estudio de la microflora asociada, se ha considerado que esta microflora podría participar en la modificación, regulación, expresión o contribución con esta riqueza metabólica. El asilamiento de bacterias asociadas con potencial biotecnológico también se ha reportado y forma parte de estos casos [54].

### 5. Mecanismos de síntesis de sustancias líquénicas.

La identificación de metabolitos secundarios sintetizados por líquenes, ha permitido establecer que la síntesis de algunos productos procede a partir de sintetetas de péptidos no ribosómicas (NRPS, por sus siglas en inglés) y complejos multienzimáticos entre las NRPS y policetido sintetetas (PKS). Las NRPS son enzimas organizadas en módulos que selectivamente activan, modifican y condensan aminoácidos de forma ordenada [55]. Estos módulos pueden actuar independientemente, sin embargo, para que se lleve a cabo el correcto ensamblaje de la molécula, los módulos deben de actuar en conjunto (Figura 5), [56].



**Figura 5.** Representación gráfica de la estructuración genómica de módulos involucrados en la síntesis de sustancias líquénicas. Los módulos 2 y 3, agrupan reacciones químicas de condensación, isomerización, adición de grupos funcionales, transesterificación, entre otras.

La organización genómica de la NRPS determina la secuencia, complejidad y estructura del metabolito, así como la clasificación de las NRPS, por ejemplo, si se encuentran formando un conjunto de genes como en algunas bacterias y hongos se denominan del tipo I que pueden a su vez clasificarse en reductoras y no reductoras [57], mientras que aquellas que están distribuidas a lo largo del genoma son del tipo II, estas últimas son poco frecuentes y requieren de interacciones específicas para promover la síntesis del metabolito [58-59]. Aunque la diversidad estructural entre las NRPS es muy

grande, comparten el mecanismo de síntesis de complejos proteicos que emplean compuestos azufrados como acarreadores [56].

En diferentes genomas de hongos y bacterias, la organización y localización de las NRPS han sido descritas [60-61], y su actividad ha sido evaluada por delección genética y remplazo alélico [62-63]. Los genes de las NRPS abarcan entre 6 y 45 kpb y los motivos conservados en los dominios de adenilación, tiolación, condensación, epimerización, etc, han sido descritos, sin embargo, la amplia variedad de modificaciones que pueden sufrir los sustratos provoca que exista una diversificación organizacional en los módulos de las NRPS, que no se refleja a nivel estructural, ya que se ha observado que mantienen una conservación a dicho nivel, por ejemplo, el dominio de adenilación en la síntesis gramicidina en *Bacillus brevis* y la síntesis de luciferasa en las luciérnagas (*Photinus pyralis*) es similar [58, 64]. A este respecto, en líquenes se ha observado que un conjunto de cianolíquenes de distribución cosmopolita, pueden presentar síntesis de toxinas como nodularina y microcistina a partir de policétido sintetasas (PKS), que inhiben el crecimiento de otros microorganismos [65]. Análisis metagenómicos realizados en *Peltigera membranacea* demostraron la síntesis de metabolitos secundarios por NRPS (Nosperina) [21].

Los procesos evolutivos responsables de la conformación de los módulos en los genes de las NRPS son complejos, y pueden involucrar duplicación en tándem y/o pérdida de los módulos, fusión génica, recombinación y conversión de módulos individuales o dominios entre las NRPS [60]. En líquenes, existen esfuerzos por relacionar la amplia gama de metabolitos secundarios con la diferenciación a nivel estructural de las NRPS y las PKS, sin embargo, los trabajos se han centrado en evaluar algunos de los módulos de las PKS reductoras en hongos liquenizadores con respecto a hongos no liquenizantes, en algunos casos, la agrupación en clados ha permitido establecer que algunos módulos presentan una distribución cosmopolita mientras que otros son específicos de ciertos géneros, como es el caso de los micobiontes del orden de los Pertusariales [66-68].

Profundizar en la secuenciación de especies de líquenes y micobiontes en los cuales se hayan identificado compuestos con actividad biológica debe ser de interés de la comunidad científica, para poder analizar la presencia y variabilidad genética en los módulos de NRPS y poder evaluar la pertinencia de su amplificación, clonación e introducción en microorganismos modelo como *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y/o *Escherichia coli*, con el fin de obtener en mayores rendimientos.

#### 4. Producción biotecnológica de sustancias líquénicas

A pesar de las ventajas que ofrecen los metabolitos secundarios o sustancias líquénicas, su obtención a gran escala es limitada, dada la proporción en la que se encuentran en el cuerpo del líquen y a la baja tasa de crecimiento de los éstos. En los líquenes crustosos, se ha estimado que su tasa de crecimiento es  $\leq 0.87$  mm al año, mientras que en los líquenes foliosos y fruticosos se ubica en el rango de 0.06 a 36.5 mm/año [53]. Por lo anterior, la comunidad científica se ha enfocado en el aislamiento de las fracciones, particularmente de los micobiontes, por ser la fracción responsable de sintetizar la mayoría de sustancias líquénicas hasta ahora reportadas. Los primeros esfuerzos por separar la fracción fúngica datan de 1906, sin embargo, no existe hasta ahora un método estándar de aislamiento y mantenimiento de micobiontes a nivel de laboratorio. La causa de esto es variable y está relacionada con la concentración de esporas durante la siembra, la germinación de las mismas y el desarrollo posterior del hongo, la alta probabilidad de contaminación por bacterias y otros hongos, dada la tasa de crecimiento de los micobiontes, que puede ser de algunas semanas hasta meses [69-70].

Los métodos de aislamiento de los micobiontes promueven su crecimiento y desarrollo a partir de las estructuras reproductivas del líquen como son apotecios, soledios, isidios y/o picnidios para asegurar la germinación de los mismos [72-73]. Por lo general, dichos métodos emplean condiciones de crecimiento estándar como es, su cultivo en oscuridad, en medios suplementados con glucosa, maltosa y/o sacarosa, a temperaturas que oscilan entre 12 a 20°C [73] incluso se ha probado la adición de hormonas vegetales como el ácido indol-3-butírico (IBA) y ribitol para promover la germinación de esporas de *Nephromopsis ornata*, y el incremento de la tasa de crecimiento en *Ramalina farinacea* y *Ramalina fastigiata*, respectivamente con resultados satisfactorios en ambos casos [74-75]. Algunos autores han evaluado el efecto de modificaciones en los medios de cultivo para promover la síntesis de metabolitos secundarios de interés, como el caso de *Ramalina celastri* que con la adición de manitol (2%) al medio MY10 (extracto de malta 1%, extracto de levadura 0.4%, sacarosa 10%, en agua destilada estéril), se obtuvo un aumento en el rendimiento del 7.9% para la síntesis de ácido úsnico con respecto al micobionte desarrollado en medio sin suplementar [76]. Asimismo, el aumento de la concentración de manitol del 2 al 5.8%, favorecen la producción de antraquinonas como emodina (0.90% w/w) y 7-cloroemodina, metabolitos con actividad antioxidante en el micobionte *Caloplaca erythrantha* [77]. En algunos casos se ha observado que cambios en la osmolaridad del medio de cultivo, pueden favorecer la producción antranorina en el micobionte *Parmotrema reticulatum* a los 50 días de incubación, mientras que, si se mantiene el control de la humedad en el sistema, se favorece el metabolismo de lípidos hacia la síntesis de triacilgliceroles [78]. Por otra parte, se ha estimado que las condiciones de crecimiento influyen en la producción y tipo de metabolitos sintetizados por el micobionte, particularmente, para *Ramalina dilacerata*, se ha observado que la expresión de genes de policétido sintetas no ribosómicas (NRPS) aumenta a pH 6.5 en agar extracto de malta suplementado con glucosa y que la expresión de la policétido sintasa 6-MSAS (del tipo reductor) aumenta cuando el medio presenta un valor de pH 8.5. Este aumento en la expresión de genes está relacionado con un aumento en el número de metabolitos secundarios [79]. Una vez que se estandariza el cultivo del micobionte, se procede con la extracción, concentración y evaluación de las sustancias líquénicas, en la mayoría de los casos este conjunto de pasos involucra la extracción con diferentes solventes orgánicos [80-81]. Otra alternativa que se está explorando para aumentar la concentración de metabolitos secundarios, es la aplicación de técnicas de Ingeniería Genética que considera la clonación de genes asociados a estos metabolitos en particular aquellos que involucran a sintetetas de péptidos no cromosómicas o PKS de tipo 1 [82-85]; así como el diseño de sistemas heterólogos para la obtención a mayor escala de isómeros funcionales de sustancias líquénicas [84]. El análisis de genomas de micobiontes y fotobiontes permitirá profundizar en la comprensión de la arquitectura, dinámica y regulación genómica de regiones implicadas en la síntesis de metabolitos secundarios por parte de los líquenes [86-87], para proponer nuevos esquemas de obtención de éstos a mayor escala, con el fin de aprovechar sus propiedades, diversidad funcional y su espectro de acción.

## 5. Conclusiones

La diversidad metabólica que presentan los líquenes los convierte en blancos para su aprovechamiento biotecnológico. Para ello, la comunidad científica deberá trabajar en el desarrollo y estandarización de estrategias microbiológicas, incrementar la información genómica de micobiontes, fotobiontes, y con ello, los análisis bioinformáticos. Así como el empleo de herramientas de ingeniería genética, que en conjunto permitan la manipulación a nivel laboratorio de los líquenes, sus fracciones y/o sus comunidades bacterianas asociadas para poder aprovechar la variedad metabólica de estos organismos simbióticos.

El potencial biotecnológico de los metabolitos secundarios producidos por los líquenes, así como la microflora asociada, es una muestra de la diversidad química natural con propiedades nuevas, con bajo impacto a los ecosistemas y con diversos usos en sectores industriales, de la salud, alimenticio y textil, sin embargo, aun se continúan explorando los procesos para un adecuado cultivo, y evitar así la depredación de los líquenes por un uso extensivo.

Esta revisión es un acercamiento al potencial biotecnológico que ofrece la asociación simbiótica de los líquenes e invita a la reflexión para su adecuado uso y conservación.

**Contribución:** Conceptualización, Álvarez-Mejía, C. y López-Ramírez, V; Redacción y Revisión, Álvarez-Mejía, C., Morales-Vargas, A. T.; López-Ramírez, V.

**Financiamiento:** La línea de investigación para la evaluación y análisis de líquenes ha sido financiada por el TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO, así como por el INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE IRAPUATO.

**Agradecimientos:** Agradecemos a todos los alumnos asociados a proyectos de la línea de investigación de líquenes de las carreras de Ing. Bioquímica e Ing. Ambiental del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato e Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, respectivamente.

**Conflicto de interés:** Los autores declaran no tener conflicto de intereses. Los financiadores no tuvieron ningún rol en el diseño del estudio; en la recopilación, análisis o interpretación de datos; en la redacción del manuscrito, o en la decisión de publicar los resultados.

## Referencias

1. DePriest, P. T. Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986-2001. *Annu Rev Microbiol* **2004**, *58*, 273–301.
2. Tran, K. N.; Pham, N.; Jang, S-H.; Lee, C. Purification and characterization of a novel medium-chain ribitol dehydrogenase from a lichen-associated bacterium *Sphingomonas* sp. *PLoS ONE* **2020**, *15*(7), e0235718.
3. Shanmugam, K.; Srinivasan, M.; Neelakantan, H. G. Insights into *in vitro* phenotypic plasticity, growth and secondary metabolites of the mycobiont isolated from the lichen *Platygramme caesiopruinosa*. *Arch. Microbiol* **2022**, *204*, 90.
4. Pichler, G.; Carniel, F. C.; Muggia, L.; Holzinger, A.; Tretlach, M.; Kranner, I. Enhanced culturing techniques for the mycobiont isolated from the lichen *Xanthoria parietina*. *Mycol. Prog* **2021**, *20*, 797-808.
5. Spribille, T.; Tuovinen, V.; Resl, P.; Vanderpool, D.; Wolinski, H.; Aime, M.C.; Schneider, K.; Stabenheiner, E.; Toome-Heller, M.; Thor, G.; Helmut, M.; Johannesson, H.; McCutcheon, J. P. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science* **2016**, *353*, 488-492.
6. Aschenbrenner, I. A.; Cardinale, M.; Berg, G.; Grube, M. Microbial cargo: do bacteria on symbiotic propagules reinforce the microbiome of lichens? *Annual Review of Microbiology* **2014**, *16*(12), 3743–3752.
7. Biosca, E. G.; Flores, R.; Santander, R. D.; Díez-Gil, J. L.; Barreno E.; Innovative Approaches Using Lichen Enriched Media to Improve Isolation and Culturability of Lichen Associated Bacteria. *PLoS One* **2016**, 1–22.
8. Parrot, D.; Antony-Babu, S.; Intertaglia, L.; Grube, M.; Tomasi, S.; Suzuki, M. T. Littoral lichens as a novel source of potentially bioactive Actinobacteria. *Sci Rep* **2015**, *5*, 15839.
9. Swamy, C. T.; Gayathri, D. High throughput sequencing study of foliose lichen-associated bacterial communities from India. *Mol. Biol. Rep.* **2021**, *48*, 2389-2397.
10. Aschenbrenner, I. A.; Cernava, T.; Berg, G.; Grube, M. Understanding Microbial Multi-Species Symbioses. *Frontiers in Microbiol* **2016**, *7*, 1–9.
11. Cernava, T.; Berg, G.; Grube, M. High Life Expectancy of Bacteria on Lichens. *Microb. Ecol* **2016**, *72*(3), 510–513.
12. Walser, J.; Holderegger, R.; Gugerli, F.; Hoebee, S. E. V. A. Microsatellites reveal regional population differentiation and isolation in *Lobaria pulmonaria*, an epiphytic lichen. *Mol. Ecol* **2004**, *14*(2), 457–467
13. Divakar, P. K.; Crespo, A.; Blanco, O.; Lumbsch, H. T. Phylogenetic significance of morphological characters in the tropical *Hypotrachyna* clade of parmelioid lichens (Parmeliaceae, Ascomycota). *Mol. Phylog. Evol.* **2006**, *40*(2), 448–58.
14. Cardinale, M.; Puglia, A. M.; Grube, M. Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2006**, *57*(3), 484–95.
15. Nelsen, M. P.; Lücking, R.; Boyce, C. K.; Lumbsch, H. T.; Ree, R. H. The macroevolutionary dynamics of symbiotic and phenotypic diversification in lichens. *PNAS* **2020**, *117*(35), 21495-21503.
16. Hale, M. E. How to know the Lichens. 1<sup>st</sup> ed.; P. K. N. Series. W.M. C. Brown Company Publishers: Dubuque, Iowa, U.S.A, **1969**; 3-6.
17. Nash III, T. H. *Lichen Biology*. 2<sup>nd</sup> ed.; C. U. Press, Ed. New York, USA, **2008**; 4.

18. Fedrowitz, K.; Kaasalainen, U.; Rikkinen, J. Geographic mosaic of symbiont selectivity in a genus of epiphytic cyanolichens. *Ecol and Evol* **2012**, 2(9), 2291–303.
19. Kaasalainen, U.; Tuovinen, V.; Mwachala, G.; Pellikka, P.; Rikkinen, J. Complex Interaction Networks Among Cyanolichens of a Tropical Biodiversity Hotspot. *Front. Microbiol.* **2021**, 12, 672333.
20. Herrera-Campos M.; Huhndorf, S.; Lücking, R. The foliicolous lichen flora of Mexico IV: a new, foliicolous species of *Pyrenothrix* (Chaetothyriales : Pyrenothrichaceae). *Mycologia* **2005**, 97(2), 356–361.
21. Kampa, A.; Gagunashvili, A. N.; Gulder, T. A. M.; Morinaka, B. I.; Daolio, C.; Godejohann, M.; Miao, V. P. W.; Piel, J.; Andrésón, Ó. S. Metagenomic natural product discovery in lichen provides evidence for a family of biosynthetic pathways in diverse symbioses. *PNAS* **2013**, 110(33), E3129–E3137.
22. Xu, M.; Heidmarsson, S.; Olafsdottir, E. S.; Buonfiglio, R.; Kogej, T.; Omarsdottir, S. Secondary metabolites from cetrarioid lichens: chemotaxonomy, biological activities and pharmaceutical potential. *Phytomedicine* **2016**, 23(5), 441–459.
23. White, P. A. S.; Oliveira, R. C. M.; Oliveira, A. P.; Serafini, M. R.; Araújo, A. A. S.; Gelain, D. P.; Moreira, J. C.; Almeida, J. R.; Quintans, J. S.; Quintans-Junior, L. J.; Santos, M. R. Antioxidant Activity and Mechanisms of Action of Natural Compounds Isolated from Lichens: A Systematic Review. *Molecules* **2014**, 14496–14527.
24. Ockinger, E.; Nilsson, S. Local population extinction and vitality for an epiphytic lichen in fragmented old-growth forest. *Ecol* **2010**, 91(7), 2100–2109.
25. Kranner, I.; Cram, W. J.; Zorn, M.; Wornik, S.; Yoshimura, I.; Stabentheiner, E.; Pfeifhofer, H. W. Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *PNAS* **2005**, 102(8), 3141–6.
26. Calcott, M. J.; Ackerley, D. F.; Knight, A.; Keyzers, R. A.; Owen, J. G. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chem Soc Rev* **2018**, 47, 1730-1760
27. Manojlovic, N. T., Vasiljevic, P. J., Maskovic, P. Z., Juskovic, M.; Bogdanovic-Dusanovic, G. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) delise (Umbilicariaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**, ID:452431, 1-8.
28. Rodriguez, C. M., Bennett, J. P.; Johnson, C. J. Lichens: Unexpected anti-prion agents? *Prion* **2012**, 6(1), 11–16.
29. Zambare, V. P.; Christopher, L. P. Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharmaceutical Biol* **2012**, 50(6), 778–798.
30. Gülçin, I.; Oktay, M.; Küfrevioğlu, Ö. I.; Aslan, A. Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *J Ethnopharmacol* **2002**, 79(3), 325–329.
31. White, P. A. S.; Oliveira, R. C. M.; Oliveira, A. P.; Serafini, M. R.; Araújo, A. A. S.; Gelain, D. P.; Moreira, J. C. F.; Almeida, J. R. G. S.; Quintans, J. S. S.; Quintans-Junior, L. J.; Santos, M. R. V. Antioxidant activity and mechanisms of action of natural compounds isolated from lichens: a systematic review. *Molecules* **2014**, 19(9), 14496-14527.
32. Kosanić, M.; Ranković, B.; Stanojković, T.; Rančić, A.; Manojlović, N. *Cladonia* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *LWT-Food Science and Technology* **2014**, 59(1), 518–525.
33. Kumar, J.; Dhar, P.; Tayade, A. B.; Gupta, D.; Chaurasia, O. P.; Upreti, D. K.; Arora, R.; Srivastava, R. B. Antioxidant capacities, phenolic profile and cytotoxic effects of saxicolous lichens from trans-Himalayan cold desert of Ladakh. *PLoS ONE* **2014**, 9(6).
34. Luo, H.; Ren, M.; Lim, K. M.; Koh, Y. J.; Wang, L. S.; Hur, J. S. Antioxidative Activity of Lichen *Thamnomia vermicularis* in vitro. *Mycobiol* **2006**, 34(3), 124–7.
35. Esimone, C. O.; Adikwu, M. U. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Ramalina farinacea*. *Fitoterapia* **1999**, 70(4), 428–431.
36. Saenz, M. T.; Garcia, M. D.; Rowe, J. G. Antimicrobial activity and phytochemical studies of some lichens from south of Spain. *Fitoterapia* **2006**, 77(3), 156–159.
37. Aoussar, N.; Laasri, F. E.; Bourhia, M.; Manojlovic, N.; Mhand, R. A.; Rhallabi, N.; Ullah, R.; Shahat, A.; Noman, O. M.; Nasr, F. A.; Almarfadi, O. M.; Mzibri, M. E.; Vasiljević, P.; Benbacer, L.; Mellouki, F. Phytochemical Analysis, Cytotoxic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Lichens. *Evid Based Complement Alternat Med* **2020**, 2020, 8104538.
38. Tripathi, A. H.; Negi, N.; Gahtori, R.; Kumari, A.; Joshi, P.; Tewari, L. M., Joshi, Y.; Bajpai, R.; Upreti, D. K., A Review of Anti-Cancer and Related Properties of Lichen-Extracts and Metabolites. *Anticancer Agents Med Chem* **2022**, 22(1); 115-142.
39. Nguyen, T. T.; Yoon, S.; Yang, Y.; Lee, H-B.; Oh, S.; Jeong, M. H.; Kim, J-J.; Yee, S-T.; Crisan, F.; Moon, C.; Lee, K. Y.; Kim, K. K.; Hur, J-S.; Kim, H. Lichen secondary metabolites in *Flavocetraria cucullata* Exhibit anti-cancer effects on human cancer cells through the induction of apoptosis and suppression of tumorigenic potentials. *PLoS ONE* **2014**, 9(10), 1–14
40. Johnson, C. J.; Bennett, J. P.; Biro, S. M.; Duque-Velasquez, J. C.; Rodriguez, C. M.; Bessen, R. A.; Roche, T. E. Degradation of the Disease-Associated Prion Protein by a Serine Protease from Lichens. *PLoS ONE* **2011**, 6(5), e19836.
41. Fazio, A. T.; Adler, T.; Bertoni, M. D.; Sepúlveda, C. S.; Damonte, E. B.; Maier, M. S. Lichen Secondary Metabolites from the Cultured Lichen Mycobionts of *Teloschistes chrysophthalmus* and *Ramalina celastri* and their Antiviral Activities. *Z Naturforsch C J Biosci* **2007**, 62(7-8): 543–549.
42. Francolini, I.; Norris, P.; Piozzi, A.; Donelli, G.; Stoodley, P. Usnic Acid, a Natural Antimicrobial Agent Able To Inhibit Bacterial Biofilm Formation on Polymer Surfaces. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**, 48(11), 4360–4365.
43. Mitrović, T.; Stamenković, S.; Cvetković, V.; Radulović, N.; Mladenović, M.; Stanković, M.; Topuzovic, M.; Radojevic, I.; Stefanovic, O.; Vasic, S.; Čomić, L. *Platismatia glauca* and *Pseudevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, Antimicrobial and antibiofilm agents. *EXCLI J* **2014**, 13, 938–953.

44. Gauslaa, Y.; Bidussi, M.; Solhaug, K. A.; Asplund, J. L. P. Seasonal and spatial variation in carbon based secondary compounds in green algal and cyanobacterial members of the epiphytic lichen genus *Lobaria*. *Phytochemistry* **2013**, *94*, 91–98.
45. Ingólfssóttir, K. Usnic acid. *Phytochem* **2002**, *61*, 729–736.
46. Nguyen, K. H.; Chollet-Krugler, M.; Gouault, N.; Tomasi, S. UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 1490–1508.
47. Dzubaj, A.; Bačkor, M.; Tomko, J.; Peli, E.; Tuba, Z. Tolerance of the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. to metal stress. *Ecotoxicol Environ Saf* **2008**, *70*(2), 319–326.
48. Weissman, L.; Garty, J.; Hochman, A. Characterization of Enzymatic Antioxidants in the Lichen *Ramalina lacera* and Their Response to Rehydration. *Appl Environ Microbiol* **2005**, *71*(11):6508-14.
49. Le Pogam, P.; Legouin, B.; Geairon, A.; Rogniaux, H.; Lohézic-Le Dévéhat, F.; Obermayer, W.; Boustie, J.; Le Lamer, A-C. Spatial mapping of lichen specialized metabolites using LDI-MSI: chemical ecology issues for *Ophioparma ventosa*. *Sci Rep* **2016**, *6*, 37807.
50. Rattan, R.; Shukla, S.; Sharma, B.; Bhat, M. A Mini-Review on Lichen-Based Nanoparticles and Their Applications as Antimicrobial Agents. *Front Microbiol* **2021**, *12*, 633090.
51. Tripathi A. H.; Negi N.; Gahtori, R.; Kumari, A.; Joshi, P.; Tewari, L. M.; Joshi, Y.; Bajpai, R.; Upreti, D. K.; Upadhyay, S. K. A Review of Anti-Cancer and Related Properties of Lichen-Extracts and Metabolites. *Anticancer Agents Med Chem* **2022**, *22*(1), 115-142.
52. Hamida, R. S.; Ali, M. A.; Abdelmeguid, N. E.; Al-Zaban, M. I.; Baz, L.; Bin-Meferij, M. M. Lichens—A Potential Source for Nanoparticles Fabrication: A Review on Nanoparticles Biosynthesis and Their Prospective Applications. *J Fungi* **2021**, *7*, 291.
53. Oksanen, I. Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, *73*(4), 723-34.
54. Suzuki, M. T.; Parrot, D.; Berg, G.; Grube, M.; Tomasi, S. Lichens as natural sources of biotechnologically relevant bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **2016**, *100*(2), 583-95.
55. Challis, G. L.; Ravel, J.; Townsend, C. A. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem & Biol* **2000**, *7*(3), 211–24.
56. Marahiel, M. A. Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics. *Chem & Biol* **1997**, *4*(8), 561–567.
57. Brunauer, G.; Muggia, L.; Stocker-Wörgötter, E.; Grube, M. A transcribed polyketide synthase gene from *Xanthoria elegans*. *Mycological Research*, **2009**, *113*(Pt 1), 82–92.
58. Hur, G. H.; Meier, J. L.; Baskin, J.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R.; Marahiel, M. A.; Burkart, M. D. Crosslinking studies of protein-protein interactions in nonribosomal peptide biosynthesis. *Chem & Biol* **2009**, *16*(4), 372–81.
59. Konz, D.; Marahiel, M. A. How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol* **1999**, *6*, R39–R48.
60. Bushley, K. E.; Turgeon, B. G. Phylogenomics reveals subfamilies of fungal nonribosomal peptide synthetases and their evolutionary relationships. *BMC Evol Biol* **2010**, *10*, 26.
61. Palmer, J. M.; Keller, N. P. Secondary metabolism in fungi: does chromosomal location matter? *Current Opinion in Microbiol* **2010**, *13*(4), 431–6.
62. Jirakkakul, J.; Punya, J.; Pongpattanakitshote, S.; Paungmoung, P.; Vorapreeda, N.; Tachaleat, A.; Klomnara, C.; Tanticharoen, M.; Cheevadhanarak, S. Identification of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for bassianolide synthesis in wood-decaying fungus *Xylaria* sp. BCC1067. *Microbiology (Reading)*, **2008**, *154*(Pt 4), 995–1006.
63. Zimmermann, M.; Fischbach, M. A. A family of pyrazinone natural products from a conserved nonribosomal peptide synthetase in *Staphylococcus aureus*. *Chemistry & Biology* **2010**, *17*(9), 925–30.
64. Strieker, M.; Tanović, A.; Marahiel, M. A. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current Opinion in Struct Biol* **2010**, *20*(2), 234–40.
65. Kaasalainen, U.; Fewer, D. P.; Jokela, J.; Wahlsten, M.; Sivonen, K.; Rikkinen, J. Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. *PNAS* **2012**, *109*(15), 5886–5891.
66. Muggia, L.; Grube, M. Type III polyketide synthases in lichen mycobionts. *Fungal Biology* **2010**, *114*(4), 379–385.
67. Schmitt, I.; Martín, M. P.; Kautz, S.; Lumbsch, H. T. Diversity of non-reducing polyketide synthase genes in the Pertusariales (lichenized Ascomycota): a phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **2005**, *66*(11), 1241–1253.
68. Schmitt, I.; Kautz, S.; Lumbsch, H. T. 6-MSAS-like polyketide synthase genes occur in lichenized ascomycetes. *Mycological Res* **2008**, *112*(Pt 2), 289–296.
69. Molina, M. D. C.; Crespo, A. Comparison of development of axenic cultures of five species of lichen-forming fungi. *Mycological Res* **2000**, *104*(5), 595–602.
70. Sangvichien, E.; Hawksworth, D. I.; Whalley, A. J. S. Ascospore discharge, germination and culture of fungal partners of tropical lichens, including the use of a novel culture technique. *IMA Fungus*, **2011**, *2*(2), 143–153.
71. Cordeiro, L. M. C.; Reinhardt, V. D. F.; Iacomini, M. Phytochemistry grown *Physcia kalbii* mycobiont. *Phytochemistry* **2012**, *84*, 88–93.
72. Molina, M.; Divakar, P.; González, P. Success in the isolation and axenic culture of *Anaptychia ciliaris* (Physciaceae, Lecanoromycetes) mycobiont. *Mycoscience* **2015**, *56*, 351–358.
73. Hoang, D.; Takenaka, Y.; Hamada, N.; Tanahashi, T. Eremophilane-type sesquiterpenes from cultured lichen mycobionts of *Sarcographa tricosia*. *Phytochemistry* **2013**, *91*, 242–248.

74. Wang, Y.; Han, K. S.; Wang, X. Y.; Koh, Y. J.; Hur, J.-S. Effect of Ribitol and Plant Hormones on Aposymbiotal Growth of the Lichen-forming Fungi of *Ramalina farinacea* and *Ramalina fastigiata*. *Mycobiology* **2009**, 37(1), 28–30.
75. Wang, X. Y.; Wei, X. L.; Luo, H.; Kim, J. A.; Jeon, H. S.; Koh, Y. J.; Hur, J.-S. Plant hormones promote growth in lichen-forming fungi. *Mycobiology* **2010**, 38(3), 176–9.
76. Fazio, A.; Adler, M.; Maier, M. Usnic acid and triacylglycerides production by the cultured lichen mycobiont of *Ramalina celastri*. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, 9(2), 213–214.
77. Fazio, A. T.; Adler, M. T.; Bertoni, M. D.; Maier, M. S. Culture studies on the mycobiont of *Caloplaca erythrantha* (Tuck.) Zahlbr. (Teloschistaceae): high production of major lichen secondary metabolites. *The Lichenologist* **2012**, 44(4), 533–542.
78. Fazio, A. T.; Bertoni, M. D.; Adler, M. T.; Ruiz, L. B.; Rosso, M. L.; Muggia, L.; Hager, A.; Stocker-Wörgötter, E.; Maier, M. S. Culture studies on the mycobiont isolated from *Parmotrema reticulatum* (Taylor) Choisy: Metabolite production under different conditions. *Mycological Progress* **2009**, 8(4), 359–365.
79. Timsina, B. A.; Sorensen, J. L.; Weihrauch, D.; Piercey-Normore, M. D. (2013). Effect of aposymbiotic conditions on colony growth and secondary metabolite production in the lichen-forming fungus *Ramalina dilacerata*. *Fungal Biol* **2013**, 117(11–12), 731–743.
80. Tanahashi, T.; Takenaka, Y.; Ikuta, Y.; Tani, K. Nagakura, N.; Hamada N. Xanthonones from the cultured lichen mycobionts of *Pyrenula japonica* and *Pyrenula pseudobufonia*. *Phytochemistry* **1999**, 52, 401–405.
81. Takenaka, Y.; Hamada, N.; Tanahashi, T. Monomeric and dimeric dibenzofurans from cultured mycobionts of *Lecanora iseana*. *Phytochemistry* **2005**, 66, 665–668.
82. Takenaka, Y.; Morimoto, N.; Hamada, N.; Tanahashi, T. Phytochemistry Phenolic compounds from the cultured mycobionts of *Graphis proserpens*. *Phytochemistry*, **2011**, 72(11–12), 1431–1435.
83. Alberti, F.; Foster, G. D.; Bailey, A. M. Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. *Applied Microbiol and Biotech* **2016**, 493–500.
84. Gagunashvili, A. N.; Davidsson, S. P.; Jónsson, Z. O.; Andrésson, Ó. S. Cloning and heterologous transcription of a polyketide synthase gene from the lichen *Solorina crocea*. *Mycology Research* **2009**, 113(3), 354–363.
85. Miao, V.; Coëffet-LeGal, M. F.; Brown, D.; Sinnemann, S., Donaldson, G., Davies, J. Genetic approaches to harvesting lichen products. *Trends in Biotech* **2001**, 19(9), 349–355.
86. Chooi, Y. H.; Stalker, D. M.; Davis, M. A.; Fujii, I.; Elix, J. A.; Louwhoff, S. H. J. J.; Lawrie, A. C. (2008). Cloning and sequence characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from the lichen *Xanthoparmelia semiviridis*. *Mycological Research* **2008**, 112(2), 147–161.
87. Park, S.-Y.; Choi, J.; Lee, G.-W.; Kim, J. A.; Oh, S.-O.; Jeong, M.-H.; Yu, N.-H.; Kim, S.; Lee, Y.-H.; Hur, J.-S. Draft Genome Sequence of Lichen-Forming Fungus *Cladonia metacorallifera* Strain KoLRI002260. *Genome Announcements* **2014**, 2(1), e01065-13.