

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

УДК 57.065

РАЗВИТИЕ МЕТОДОЛОГИИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРОМИЦЕТОВ

© 2023 г. А. А. Бавтушный¹, Ю. А. Рыбаков¹, Е. В. Патрушева¹, *, С. П. Синецкий¹

¹Национальный Биоресурсный центр “Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов”,
Научно исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

*e-mail: lpatrush@gmail.com

Поступила в редакцию 29.09.2023 г.

После доработки 11.10.2023 г.

Принята к публикации 01.11.2023 г.

Грибы представляют собой одну из самых многочисленных групп эукариотических организмов. Они играют важную роль во всех экосистемах, являются патогенами людей, животных и растений, а также деструкторами и/или продуцентами различных биологически активных соединений. В современной лабораторной практике за последние десятилетия появилось множество методов, позволяющих идентифицировать представителей царства грибов. Однако вопрос остается нерешенным для целого ряда родов микромицетов: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* и др. Использование молекулярных методов ДНК-штрихкодирования, мультилокусного типирования, микросателлитных ДНК не дает полной гарантии однозначности идентификации. Эффективное решение этой задачи возможно при использовании полногеномного секвенирования. В данном обзоре приведен сравнительный анализ различных методов идентификации грибов.

Ключевые слова: анализ геномных данных, биоинформатика, видовая идентификация, маркерные гены, микромицеты, полногеномное секвенирование

DOI: 10.56304/S0234275823050034

ВВЕДЕНИЕ

Грибы — это обширная группа гетеротрофных эукариотов, насчитывающая до 1.5 млн. видов, и, таким образом, уступающая по объему только насекомым. В почве биомасса грибов преобладает, составляя до 90% от массы прокариот и беспозвоночных. Грибы играют большую роль в круговороте веществ в природе, в разложении остатков животных и растений, попадающих в почву, являются основным звеном в сложном процессе разложения древесины и опада. Многие виды грибов являются паразитами, возбудителями болезней растений,

животных и человека, вызывают порчу сельскохозяйственной продукции и продуктов питания, образуют токсины, а также служат причиной повреждения промышленных материалов и изделий. Мицелиальные грибы широко используются в промышленной биотехнологии как продуценты пищевого и кормового белка, многих ферментов и других биологически активных соединений (антибиотиков, органические кислоты, фитогормоны, пигменты, алкалоиды), а также в составе биологических средств защиты растений [1–4].

Идентификация грибов до уровня вида имеет большое значение как для фундаментальных исследований по таксономии и филогении, изучению биоразнообразия и экологии, так и в практических областях — медицине (профилактика и борьба с микопатогенами), мониторинге биоповреждений, биотехнологии и т.д.

Условность принятой видовой таксономии микроорганизмов в значительной степени зависит от выбранных видоспецифических признаков. В целом их можно объединить в две группы — фенотипические и молекулярные.

Применяемые методы идентификации грибов основаны на культурально-морфологических и биохимических свойствах. Проблемы такого под-

Список сокращений: MALDI-TOF MS — матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетной масс-спектрометрией, NGS — секвенирование следующего поколения (next-generation sequencing), WGS — полногеномное секвенирование (whole genome sequencing), ITS — внутренний транскрибируемый спейсер (internal transcribed spacer), MLST — мультилокусное типирование последовательностей (multi-locus sequence typing), SSR — простые повторяющиеся последовательности (simple sequence repeats), GCPSR — филогенетическое распознавание вида на основе генеалогического соответствия (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition), SGC — строгое генеалогическое соответствие (strict genealogical concordance); AFLP — полиморфизм длин амплифицируемых фрагментов (Amplified fragment length polymorphisms); рДНК — рибосомная ДНК.

хода заключаются в трудоемкости и длительности выполнения анализов. В последние годы интенсивно разрабатывается методология молекулярно-генетической и протеомной идентификации микромицетов. К ее преимуществам относится значительное сокращение времени получения результатов, возможность работы с некультивируемыми формами и смешанными культурами. Среди молекулярно-генетических и протеомных методов наибольший опыт приобретен при использовании мультилокусного типирования нуклеотидных последовательностей грибов и ДНК-штрихкодирования. Для культивируемых видов совпадение результатов идентификации на основе фенотипических и молекулярно-генетических признаков не очевиден, т.к. последние определяют лишь вероятность проявления соответствующих свойств в фенотипе. Максимальная “объективность” таксономической идентификации возможна при разработке метода полногеномного секвенирования. В обзоре рассмотрены и проанализированы традиционные методы идентификации грибов и перспективы использования полногеномного секвенирования.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Основные методы идентификации микромицетов

Идентификация по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам

Морфологические признаки — внешний вид колоний, строение органов спороношения и полового размножения и т.д. — традиционно широко используемые как важные таксономические характеристики в идентификации грибов, имеют, однако, ряд недостатков. Во многих случаях число этих признаков ограничено, они не всегда удобны для наблюдения и часто нестабильны, поскольку сильно зависят от состава среды и условий культивирования, что требует жесткой стандартизации и унификации условий выращивания чистой культуры гриба. Недостаточное количество морфологических признаков наблюдается у агномицетов (например, *Sclerotium*, *Rhizoctonia* и др.), у которых отсутствуют органы спороношения, а у аскомицетов, где идентификация осуществляется по половой стадии (телеоморфе), аскомы в культуре часто не образуются. У многих анаморфных видов такие важные таксономические характеристики, как форма и размер конидий, весьма вариабельны, что также затрудняет идентификацию. В таксономических исследованиях изучение морфологических признаков более эффективно для определения грибов на уровне порядков, семейств или родов, чем для идентификации видов.

Использование ряда хемотаксономических свойств, включающих состав экзометаболитов, в частности, микотоксинов [5], полисахаридов кле-

точной стенки [6], стеролов и жирных кислот [7, 8], принесло определенные успехи в систематике некоторых родов грибов (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Fusarium*) [9–11], но развитие этих подходов в дальнейшем было лимитировано вариабельностью спектров и нестабильностью биосинтеза таких маркерных соединений.

MALDI-TOF MS

Более успешным методом идентификации и внутривидового типирования микроорганизмов стало использование матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS). Метод позволяет создавать профили масс-спектров различных метаболитов, в частности белков, и проводить сравнение микроорганизмов по белковым фингерпринтам [12]. В настоящее время коммерческие системы MALDI доступны для проведения биологических исследований, а также для диагностических приложений в клинической медицине, биотехнологии и промышленности. Представители некоторых родов грибов, таких как *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* или *Trichoderma*, а также различные дрожжи из клинических образцов (например, *Candida albicans*) успешно идентифицированы с помощью MALDI-TOF MS. Однако в настоящее время не существует универсального метода для грибов различных групп, даже несмотря на использование ограниченного числа матричных соединений [13].

Тем не менее, MALDI-TOF MS используется преимущественно в медицинской микологии для идентификации клинических изолятов мицелиальных и дрожжеподобных грибов и отдельных фитопатогенов. Широкому распространению метода препятствует недостаточная надежность и разрешающая способность, особенно в отношении труднокультивируемых видов [14], а также необходимость создания обширных баз данных спектров, что трудно достижимо при большом видовом разнообразии природных изолятов грибов.

ДНК-штрихкодирование

Использование молекулярных методов для идентификации грибов началось более двух десятилетий назад, когда был исследован рибосомный оперон [15]. Анализ последовательностей рДНК большой субъединицы (nrLSU-26S или 28S), малой субъединицы (nrSSU-18S) и всей внутренней транскрибируемой спейсерной области ITS, включающей ген 5.8S рРНК (ITS1, 5.8S, ITS2; около 0.45–0.80 кб) положил начало новой эре молекулярно-филогенетической идентификации в царстве грибов. Для этих трех локусов были отмечены разные темпы эволюции, что привело к различиям в генетической вариабельности, причем SSU эволюционирует медленнее всего, поэто-

му обладает наименьшим разнообразием последовательностей, а эволюционирующий быстрее ITS демонстрирует высокую вариабельность [16].

ITS-последовательность была предложена в качестве первого штрихкода для грибов. Метод основан на использовании одного универсального маркера, последовательности ДНК-штрихкода, для идентификации и классификации видов и включает в себя два этапа. Первоначально создается библиотека штрихкодов рДНК известных видов, а затем последовательность штрихкода неизвестного образца сопоставляется с этой библиотекой для целей идентификации. Выбор ITS обусловлен тем, что этот локус представлен в геноме несколькими сотнями копий, легко амплифицируется и секвенируется, и обладает сравнительно высокой вариабельностью, что обеспечивает хорошее разрешение в широком диапазоне видов. Было показано, что область ITS в качестве маркера обеспечивает наибольшую вероятность правильной идентификации для обширных групп грибов [17]. Количество депонированных ITS-последовательностей в GenBank и др. базах данных в настоящее время составляет более 1.3 миллиона. Кураторские базы данных, такие как UNITE, MaarjAM, ISHAM, NCBI RefSeq (Targeted Loci) и CBS/WI [18–25] играют важную роль в этом начинании. В UNITE представлено около 2.5 миллионов последовательностей ITS грибов, что соответствует более чем 100000 гипотетических видов при пороговом значении по умолчанию 98.5% идентичности. Уже устаревшее количество прочтений ITS грибов в SRA (9 762 039 423 по состоянию на январь 2019 г.) превышает количество последовательностей ITS грибов, добавленных в GenBank (1 367 715 по состоянию на март 2020 г.), более чем в 7000 (в настоящее время, вероятно, более чем в 10000 раз). Шесть лет назад соотношение числа последовательностей ITS в SRA и GenBank составляло 20 : 1, а всего два года назад оно увеличилось до 1000 : 1 [26].

Область LSU также содержит гипервариабельные домены D1 и D2 и сама по себе [27] или в сочетании с областью ITS также может использоваться в филогенетическом анализе для определения родства видов и реже для видовой идентификации грибов [28–30].

Однако есть ряд данных об ограничении применения ITS последовательности в качестве универсального ДНК-штрихкода. Так было показано, что ITS не обеспечивает достаточного разрешения среди близкородственных видов *Aspergillus* [31], *Penicillium*, многих патогенов растений, животных и человека (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Colleto-trichum*, *Fusarium*, *Phytophthora*) и некоторых других грибов (например, пресноводных *Sordariomycetes*, *Trichoderma*) [32, 33]. Кроме того, присутствие негомологичных копий ITS в геноме, внутригеномная изменчивость цистрона рДНК, включая

область ITS, опережающие темпы видообразования, в частности, у высокоспециализированных фитопатогенов, по сравнению с скоростью дивергенции ITS-последовательностей, могут привести к противоречивой молекулярной идентификации. Еще одним субъективным фактором, затрудняющим использование ITS как универсального штрихкода, является наличие в GenBank определенного числа последовательностей неверно идентифицированных видов, на основании сравнения с которыми делаются ошибочные заключения о видовой принадлежности исследуемого образца.

Для увеличения эффективности и надежности идентификации грибов были предложены дополнительные, вторичные маркеры штрихкодирования – кодирующие белки гены β -тубулина II (TUB2), большой (RPB1) и малой (RPB2) субъединиц ДНК-направленной РНК-полимеразы II, трансляционного фактора элонгации 1 α (TEF1), ДНК-топоизомеразы I (TOP1), фосфоглицераткиназы (PGK) и субъединиц I (COX1) и II (COX2) цитохром С оксидазы, которые широко используются в практике [34–36]. Количество депонированных последовательностей в базах данных в настоящее время имеет около 110000 записей для TEF1 и 67000 для RPB2. Эффективность каждого из указанных вторичных маркеров при разделении близкородственных видов индивидуальна для каждой группы и должна быть эмпирически установлена для каждого таксона. Секвенирование ITS-последовательности обязательно и проводится в первую очередь, иногда этого достаточно для полноценной идентификации, в большинстве же случаев оно подходит только для определения рода и предварительного определения вида, и тогда требуется одновременное использование одного или нескольких вторичных маркеров [33]. Даже если ITS не обеспечивает достаточное разделение близких видов, число депонированных последовательностей для ITS значительно шире, чем для других генов, что предполагает компромисс между объемом базы данных и точностью идентификации.

Для ряда таксонов ITS или другие области рДНК теперь не считаются основным филогенетическим маркером [37], а используются только в предварительных исследованиях с целью приблизительной идентификации. При разделении таксонов на уровне видов в последние годы не без успеха применяют AFLP и, несколько реже, другие методы. Данные, полученные с помощью AFLP, могут нести филогенетический сигнал, но только при анализе близкородственных видов [38].

В последнее время популярными молекулярными маркерами стали микросателлиты [39]. Это простые повторяющиеся последовательности (SSR) или короткие tandemные повторы (STR) – гипервариабельные, повторяющиеся мотивы, состоя-

шие из моно-, ди-, три-, тетра- или пентануклеотидных единиц, расположенных по всему геному. Локусы SSR обычно многочисленны и полиморфны в нетранскрибируемых областях генома, поскольку они не подвержены действию отбора, этот маркер считается селективно нейтральным и хорошо подходит для дифференциации видов и даже популяций грибов. Так, профиль SSR грибов был использован в качестве ДНК-индикатора для дифференциации видов, подвидов и штаммов *Trichoderma* [40], а также видов ржавчины тополя *Melampsora medusae* и *M. larici-populina* [41, 42]. Для генотипирования и идентификации грибов по структуре SSR разработан сетевой ресурс FungSatDB (<http://webtom.cabgrid.res.in/fungsatdb/>), позволяющий осуществлять полногеномный анализ SSR [43].

Мультилокусное типирование нуклеотидных последовательностей

Наилучшие результаты в таксономических и филогенетических исследованиях обеспечивает сочетание данных анализа ряда генов — MLST. Оно может проводиться путем независимого изучения отдельных генов-маркеров.

Для идентификации видов с помощью мультилокусного типирования применяют два основных метода [44]. Наиболее распространен среди микологов метод, основанный на генеалогическом соответствии — GCPSR [45] или SGC [44]. При его использовании необходимо реконструировать серию генных генеалогий и оценить их совпадение. Точка, выше которой на филогенетическом дереве не будет наблюдаться согласованности генеалогий отдельных генов, должна быть отмечена как граница вида. Второй подход — коалесцентная делимитация (coalescent-based delimitation, CBD) [46] — основан на применении группы методов для вероятностно-математического моделирования генеалогии индивидуумов/штаммов к общему предку и позволяет выявить эволюционно независимые линии.

GCPSR очень полезна при идентификации грибов, поскольку она обладает более сильной дифференцирующей способностью, чем другие концепции видов, такие как определение морфологических и биологических видов [47]. Хотя GCPSR требует двух или более генетических локусов для определения вида, согласно мнению Geiser D.M. [48] для общей видовой идентификации достаточно одного маркера. После того, как на основе рибосомных генов определена таксономическая группа, например, семейство или род, можно использовать белок-кодирующие гены и с помощью BLAST-поиска и/или филогенетического анализа провести более убедительную идентификацию до уровня вида.

Так, на основе последовательностей девяти генов (BenA, CaM, RPB2 и т.д.), была обновлена

классификация семейств и родов порядка *Eurotiales*. В валидированный список 2014 г. были включены 339 видов *Aspergillus*, 354 *Penicillium* и 88 видов *Talaromyces*. После проведенного анализа эти цифры значительно увеличились и включают *Aspergillus* 446 видов (увеличение на 32%), *Penicillium* 483 (увеличение на 36%) и *Talaromyces* 171 вид (увеличение на 94%) [49].

Однако использование ДНК-штрихкодирования или мультигенного типирования методом GCPSR не дает полной гарантии получения надежного филогенетического дерева. Гомоплазия, неполнота выборки, гибридизация и горизонтальный перенос генов способны приводить к трудно интерпретируемым результатам и ошибочным выводам [50]. Поэтому ряд авторов рассматривают возможность описания видов исключительно на основании сравнения сиквенсов (sequence-based classification and identification, SBCI), по крайней мере в будущем [33]. Это актуально для изучения труднокультивируемых и, особенно, некультивируемых видов, и для исследования сложных сообществ микроорганизмов, таких как почвенные, когда выделить чистую культуру достаточно сложно.

Полногеномное секвенирование

(WGS) Каждый из описанных выше методов имеет свои сильные и слабые стороны. Например, при сравнении последовательностей тестируемого образца со штаммом-эталоном (ITS и т.д.) часто повторяются ошибки, которые были допущены при создании эталонных сборок, депонированных в GenBank [33]. Кроме того, иногда отсутствует корреляция в разделении видов по молекулярным маркерам, даже при мультилокусном типировании и морфофизиологическим признакам. Так, в результате анализа выборки изолятов *Alternaria*, морфологически относящихся к комплексному виду *A. infectoria*, а также штаммов, относящихся к родственным видам — *A. malorum*, *A. cetera* и близкому роду *Embellisia* (*E. abundans*), идентификация конкретных видов различалась в зависимости от выбора критериев определения: морфологии конидий и зачатков плодовых тел, хемотаксономических признаков (продукции вторичных метаболитов, в частности микотоксинов) и молекулярных индикаторов — области ITS и генов (gpd) и tef-1a [51].

Обнаружение SSR грибов проводится путем разработки геномной библиотеки и секвенирования ДНК клонов, несущих повторы, оно требует больших затрат времени и средств. С появлением технологии NGS анализ SSR *in silico* приобретает большие преимущества по сравнению с методами, основанными на создании геномной библиотеки [52]. Скорее всего, в среднесрочной перспективе анализ отдельных нуклеотидных последо-

довательностей будет вытеснен полногеномным секвенированием.

Полногеномное секвенирование повышает эффективность разработанного метода идентификации грибов с помощью микросателлитной ДНК [53].

Проблемы выбора маркера (маркеров), стоящие перед MLST, также могут быть решены при переходе к основанной на полногеномном секвенировании идентификации. Она может применяться не только на уровне вида, но и на более низком (например, разновидностей), и на более высоком уровне (например, рода, семейства и т.д.). При сравнении геномов двух изолятов, принадлежащих к одному и тому же виду, обычно используемое пороговое значение, определяемое по средней идентичности нуклеотидов (average nucleotide identity, ANI), как для генов домашнего хозяйства, так и для генома в целом, составляет >97%, что соответствует значениям ДНК–ДНК реассоциации от 90 до 95% [54]. При этом облегчается поиск новых последовательностей, иных, нежели “гены домашнего хозяйства”, используемых в MLST, но общих для большой выборки геномов, в частности, полиморфных участков, и их последующей проверки в качестве потенциальных вторичных штрихкодов. Так, например, сравнительный анализ геномов 128 видов *Phytophthora* выявил родо- и видоспецифические ди-, три- и тетрануклеотидные повторы, причем их число может быть характерным для конкретного изолята, что позволяет использовать уникальные паттерны повторов для разработки специфичных для изолята маркеров [55]. При сопоставлении геномов трех близких видов *Fusarium graminearum sensu stricto*, *F. meridionale* и *F. asiaticum*, ранее входивших в состав комплексного вида *Fusarium graminearum*, и нескольких природных изолятов, отнесенных ранее к этому виду, были обнаружены удобные для идентификации видоспецифические маркеры – 12 генов вегетативной несовместимости и ряд генов вторичного метаболизма и патогенеза [56]. Кроме того, в случае WGS возможно проведение множественного выравнивания отдельных гомологичных последовательностей генома [сборки] или выравнивания всего генома в целом и сравнения с референсными штаммами определенных видов, позволяющее дифференцировать виды даже на основе единичных нуклеотидных замен.

Новые поколения секвенирования (второе и третье) в настоящее время используют для изучения разнообразия природных образцов и выявления патогенных организмов. Этот молекулярно-генетический метод наиболее актуален для клинической диагностики, поскольку работы ведутся со смешанными культурами, присутствующими в анализируемых образцах, и требуется быстрое получение результатов. Шаги в этом направлении делаются двумя основными способами; во-первых,

это улучшение идентификации с помощью полногеномного секвенирования (WGS) штаммов, которые можно культивировать в лабораторных условиях. Во-вторых, использование метагеномного секвенирования для выявления разнообразия организмов непосредственно из природного источника, чтобы обойти процесс культивирования. WGS может применяться для идентификации организма, его типирования для эпидемиологических целей и выявления возможной устойчивости к противомикробным препаратам [47, 57].

Использование WGS менее распространено для идентификации грибов, чем для бактерий, но данный подход в микологии намного эффективнее по сравнению с более субъективными методами, основанными на морфологических признаках. Так, корреляция фенотипической идентификации с использованием микроскопии и морфологии, а также физиологических исследований по сравнению с секвенированием области D2 большой субъединицы гена рРНК и полных областей ITS многих штаммов плесневых грибов составляет примерно 50% [58].

Видовое определение микромицетов можно проводить в сочетании с построением филогенетических деревьев. Методы и программное обеспечение для проведения соответствующих анализов представлен в обзоре “Phylogenetic methods in natural product research” (2009) [59]. Taylor J.W. и др. [60] создали концепцию филогенетического распознавания видов GCPSR на основе филогенетической согласованности нескольких несвязанных генетических локусов с использованием общих генов центрального метаболизма [61].

При проверке эффективности использования полногеномных секвенсов в таксономии на примере выборки из 1544 геномов грибов было установлено, что попарное сравнение собранных геномов хорошо согласуется с существующей таксономией. Определение геномного расстояния между образцами позволило определить, принадлежат ли два штамма к одному и тому же или к разным видам в пределах одного рода с точностью более 95%, хотя одно геномное расстояние предлагается не для замены устоявшихся таксономических подходов или изменения определения видов, а в качестве мощного дополнительного метода в таксономии грибов [62].

Сравнение геномов трех изолятов *Metarhizium* выявило различия в частоте встречаемости повторов и количестве повтор-индуцированных мутаций (repeat-induced point mutation, RIP) и позволило надежно разделить близкие виды *M. anisopliae*, *M. robertsii* и *M. acridum* [63].

Важные результаты были получены при использовании полногеномного секвенирования грибов рода *Aspergillus* – возбудителей аспергиллеза, в первую очередь *Aspergillus fumigatus* и близких ви-

дов, относящихся к секции *Fumigati*. Был проведен сравнительный геномный анализ 18 штаммов 13 видов, в том числе 8 видов секции *Fumigati*, с целью идентифицировать гены, как ранее связанные с вирулентностью, так и никогда ранее не привлекавшиеся в анализ, эволюция которых различается между патогенами и непатогенами. Хотя большинство факторов вирулентности присутствовало у всех видов, были найдены несколько генов, специфичных для секции или вида, которые рекомендуется использовать для идентификации [64]. В другом исследовании геномов клинических изолятов *Aspergillus fumigatus* и двух близкородственных, но менее патогенных видов *A. clavatus* и *Neosartorya fischeri* было показано, что 8.5, 12.6 и 13.5% генов *A. fumigatus*, *A. clavatus* и *N. fischeri*, соответственно, являются видоспецифичными. Они значительно меньше по размеру, чем гены основного метаболизма, общие для всех видов, содержат меньше экзонов и локализованы в субтеломерной области. По крайней мере, 20% генов, специфичных для *A. fumigatus*, функциональны и участвуют в катаболизме углеводов и хитина, транспорте, детоксикации, вторичном метаболизме и патогенезе, а также рассматриваются, как потенциальные маркеры при диагностике возбудителей аспергиллеза [65].

Таким образом, очевидно, что полногеномное секвенирование имеет много преимуществ по сравнению со всеми другими методами идентификации, в частности, оно позволяет выявить большое количество генов-кандидатов, потенциально связанных с морфологическими, экологическими, физиологическими и репродуктивными различиями между близкородственными и дивергирующими видами. Это дает возможность эффективно исследовать не только конкретные видовые признаки, но и механизмы, лежащие в основе их формирования. Кроме того, сравнение полногеномных последовательностей даже между двумя штаммами может дать представление об истории генетического обмена/репродуктивной изоляции между ними в природе.

Сложность использования полногеномных последовательностей для идентификации грибов заключается в том, что в настоящее время преимущественно секвенированы геномы видов, вызывающих экономический и медицинский интерес. Кроме того, для большинства из них в базе данных обычно представлен геном только одного репрезентативного штамма, и поэтому внутривидовые вариации последовательности генома остаются неизвестными. Однако по мере увеличения объема баз данных полногеномный анализ можно было бы распространить с видового на более высокие таксономические уровни с однозначными порогами сходства последовательностей в масштабах всего генома для установления молекулярно-генетических критериев родов, семейств, отрядов и

классов. Помимо этого, с помощью метагеномного секвенирования последовательности ДНК грибов можно напрямую получать из образцов окружающей среды и сравнивать с известными геномами для обнаружения новых видов, даже для некультивируемых грибов [54].

Ресурсы для анализа геномных данных

Быстро растущее количество биологических данных требует развития возможности их анализа, иначе высокопроизводительные технологии малоэффективны.

Эти технологии требуют создания систем хранения в электронных базах данных, связанных с разработкой специального программного обеспечения, позволяющего обновлять, запрашивать и искать данные [66]. Информация должна быть легкодоступной и гибкой по отношению к запросам, чтобы можно было осуществлять поиск информации, которая может быть проанализирована для объяснения метаболических путей и роли участвующих в них белков и генов.

Для идентификации на основе фенотипа верификация основывается на сравнении с оригинальными описаниями и изучением типовых образцов, включая культуры и/или изображения в виде оцифрованного типового материала в хранилищах, таких как JSTOR Global Plants и порталах микологических коллекций: Fungorum [<http://www.speciesfungorum.org>], Myco-Bank [<http://www.mycobank.org>], The Faces of Fungi [<http://www.facesoffungi.org>], The Yeasts Trust Database [<http://www.theyeasts.org>], USDA Fungal Databases [<https://nt.ars-grin.gov/fungaldata-bases/>], Biodiversity Biodiversity Heritage Library [<https://www.biodiversitylibrary.org>], Cyberliber [<http://www.cybertruffle.org.uk/cyberliber/>], и Google Scholar [<https://scholar.google.com>].

Программное обеспечение (ПО) для обработки результатов меташтрихкодирования ДНК часто используемых грибных сообществ реализованы в QIIME [67, 68] и Mothur [69]. Альтернативами, специально разработанными для последовательностей ITS, являются, среди прочих, CLOTU [70], PIPITS [71] и CONSTAX [72]. Кроме того, было разработано ПО для конкретных целей, таких как исследования микробных сообществ окружающей среды (BioMaS) [73] и микобиома человека (HumanMycobiomeScan) [74].

Также известны ресурсы для идентификации по различным маркерам (указаны в скобках). Barcode of Life Database, BOLD — http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine (ITS),

CBS-KNAW — <http://www.cbs.knaw.nl/Collections/BioloMICSSequences.aspx> (ITS),

FUSARIUM-ID — <http://isolate.fusariumdb.org> (ITS, *tef1*, RPB1, RPB2, *tub2*),

Fungal Barcoding — <http://www.fungalbarcoding.org> (ITS),

Fungal MLST database Q-Bank — <http://www.q-bank.eu/Fungi/> (фрагмент гена актина, *tub2*, *RPB1*, *RPB2*, *tef1*),

ISHAM, The International Society for Human and Animal Mycology — <http://its.mycologylab.org> (ITS),

Naïve Bayesian Classifier — <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp> (28S, ITS),

RefSeq Target Loci (RTL) — <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/targetedloci/> (ITS, 18S, 28S),

International Subcommision on *Hypocrea* and *Trichoderma* (ISHT) TrichoKey and TrichoBLAST (*Trichoderma*) — <http://www.isth.info/tools/blast/> (ITS and *tef1*, *RPB2*),

UNITE, User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza Database — <https://unite.ut.ee/> (ITS).

Подробная информация также приводится в статье [75]. Все перечисленные ресурсы являются отличными инструментами для получения информации о таксономии, часто с прямыми ссылками на доступные источники.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Идентификация видов грибов является важным аспектом многих областей науки и прикладных исследований. Условность классической видовой таксономии микроорганизмов в значительной степени, зависит от выбранных видоспецифических признаков. Объективным недостатком “классической” таксономии является трудоемкость проведения морфологической идентификации и необходимость выделения чистых культур.

Развитие молекулярно-генетической и протеомной методологии открыло широкие возможности для таксономической классификации микроорганизмов, позволяя значительно ускорить получение результатов. Для некоторых методик становится необязательным предварительное получение “чистых” культур и процесса наработки биомассы микроорганизмов в лабораторных условиях.

Молекулярно-генетические методологии видовой идентификации основываются на оценке сходства последовательностей и выявлении видоспецифических участков ДНК с использованием биоинформационных баз данных. Учитывая, что молекулярно-генетические и протеомные методы оценивают лишь вероятность проявления признаков в фенотипе, они не всегда обеспечивают полное совпадение результатов с видовым определением по морфологии. Решением этой проблемы может стать метод WGS, который позволяет одновременно учитывать множество маркеров, в том числе не имеющих фенотипического проявления.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1053.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmit J.P., Mueller G.M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodivers Conserv.*, 2007, 16(1), 99–111. <https://doi.org/10.1007/s10531-006-9129-3>
2. Adnan M., Islam W., Gang L., Chen H. Advanced research tools for fungal diversity and its impact on forest ecosystem. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2022, 29(30), 45044–45062. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20317-8>
3. Gonçalves M.F.M., Esteves A.C., Alves A. Marine fungi: opportunities and challenges. *Encyclopedia*, 2022, 2(1), 559–577. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010037>
4. Truong D.T., Tett A., Pasoli E., Huttenhower C., Segata N. Microbial strain-level population structure and genetic diversity from metagenomes. *Genome Res.*, 2017, 24(7), 626–638. <https://doi.org/10.1101/gr.216242.116>
5. Frisvad J.C., Larsen T.O., de Vries R., Meijer M., Houbraken J., Cabañes F.J., Ehrlich K., Samson R.A. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Stud. Mycol.*, 2007, 59, 31–37. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.04>
6. Leal J.A., Prieto A., Bernabé M., Hawksworth D.L. An assessment of fungal wall heteromannans as a phylogenetically informative character in ascomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2010, 34(6), 986–1014. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00225.x>
7. Müller M.M., Kantola R., Kitunen V. Combining sterol and fatty acid profiles for the characterization of fungi. *Mycol. Res.*, 1994, 98(6), 593–603. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80404-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80404-8)
8. Weete J.D., Abril M., Blackwell M. Phylogenetic distribution of fungal sterols. *PLoS One*, 2010, 5(5), 10899. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010899>
9. Frisvad J.C. Taxonomy, chemodiversity, and chemocconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. *Front. Microbiol.*, 2015, 5(773), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00773>
10. Schmidt H., Adler A., Holst-Jensen A., Klemsdal S.S., Logrieco A., Mach R.L., Nirenberg H.I., Thrane U., Torp M., Vogel R.F., Yli-Mattila T., Niessen L. An integrated taxonomic study of *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* based on the use of composite datasets. *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, 95(3), 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.012>
11. Желифонова В.П., Антипова Т.В., Козловский А.Г. Вторичные метаболиты в таксономии грибов рода *Penicillium*. *Микробиология*, 2010, 79(3), 291–300.
12. Tsuchida S., Umemura H., Nakayama T. Current status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in clin-

- ical diagnostic microbiology. *Molecules*, 2020, 25(20), 4775.
<https://doi.org/10.3390/molecules25204775>
13. Greco V., Piras C., Pieroni L., Ronci M., Putignani L., Roncada P., Urbani A. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. *Expert Rev. Proteom.*, 2018, 15(8), 683–696.
<https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1505510>
 14. Ranque S., Normand A.C., Cassagne C., Murat J.B., Bourgeois N., Dalle F., Gari-Toussaint M., Fourquet P., Hendrickx M., Piarroux R. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. *Mycoses*, 2014, 57(3), 135–140.
<https://doi.org/10.1111/myc.12115>
 15. Seifert K.A., Wingfield B.D., Wingfield M.J. A critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous *Ascomycetes* and ascomycetous anamorphs. *Canad. J. Bot.*, 1995, 73(S1), 760–767.
<https://doi.org/10.1139/b95-320>
 16. Kress W.J., Erickson D.L. DNA barcodes: methods and protocols. *DNA barcodes*. Humana Press, 2012, 858, 3–8.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_1
 17. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2012, 109(16), 6241–6246.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
 18. Hawksworth D.L., Lücking R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. In: *The Fungal Kingdom*. [Ed: J. Heitman, B.J. Howlett, P.W. Crous, E.H. Stukenbrock, T.Y. James, N.A.R. Gow] ASM Press. Washington, DC, USA, 2018, 79–95.
<https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch4>
 19. Öpik M., Davison J., Moora M., Zobel M. DNA-based detection and identification of *Glomeromycota*: the virtual taxonomy of environmental sequences. *Botany*, 2014, 92(2), 135–147.
<https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0110>
 20. Kõljalg U., Nilsson R.H., Abarenkov K., Tedersoo L., Taylor A.F., Bahram M., Bates S.T., Bruns T.D., Bengtsson-Palme J., Callaghan T.M., Douglas B., Drenkhan T., Eberhardt U., Dueñas M., Grebenc T., Griffith G.W., Hartmann M., Kirk P.M., Kohout P., Larsson E., Lindahl B.D., Lücking R., Martín M.P., Matheny P.B., Nguyen N.H., Niskanen T., Oja J., Peay K.G., Peintner U., Peterson M., Põldmaa K., Saag L., Saar I., Schüßler A., Scott J.A., Senés C., Smith M.E., Suija A., Taylor D.L., Telleria M.T., Weiss M., Larsson K.H. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol. Ecol.*, 2013, 22(21), 5271–5277.
<https://doi.org/10.1111/mec.12481>
 21. Kõljalg U., Abarenkov K., Nilsson R.H., Larsson K.H., Taylor A.F. The UNITE database for molecular identification and for communicating fungal species. *Biodiversity Information Science and Standards*, 2019, 8, 47.
<https://doi.org/10.203897/biss.3.37402>
 22. Schoch C.L., Robbertse B., Robert V., Vu D., Cardinali G., Irinyi L., Meyer W., Nilsson R.H., Hughes K., Miller A.N., Kirk P.M., Abarenkov K., Aime M.C., Ariyawansa H.A., Bidartondo M., Boekhout T., Buyck B., Cai Q., Chen J., Crespo A., Crous P.W., Damm U., De Beer Z.W., Dentinger B.T., Divakar P.K., Dueñas M., Feau N., Fliegerova K., García M.A., Ge Z.W., Griffith G.W., Groenewald J.Z., Groenewald M., Grube M., Gryzenhout M., Gueidan C., Guo L., Hambleton S., Hamelin J., Hansen K., Hofstetter V., Hong S.B., Houbraken J., Hyde K.D., Inderbitzin P., Johnston P.R., Karunarathna S.C., Kõljalg U., Kovács G.M., Kraichak E., Krizsan K., Kurtzman C.P., Larsson K.H., Leavitt S., Letcher P.M., Liimatainen K., Liu J.K., Lodge D.J., Luangsaard J.J., Lumbsch H.T., Maharachchikumbura S.S., Managoga D., Martín M.P., Minnis A.M., Moncalvo J.M., Mule G., Nakasone K.K., Niskanen T., Olariaga I., Papp T., Petkovits T., Pino-Bodas R., Powell M.J., Raja H.A., Redecker D., Sarmiento-Ramírez J.M., Seifert K.A., Shrestha B., Stenroos S., Stielow B., Suh S.O., Tanaka K., Tedersoo L., Telleria M.T., Udayanga D., Untereiner W.A., Diéguez Uribeondo J., Subbarao K.V., Vágvölgyi C., Visagie C., Voigt K., Walker D.M., Weir B.S., Weiß M., Wijayawardene N.N., Wingfield M.J., Xu J.P., Yang Z.L., Zhang N., Zhuang W.Y., Federhen S. Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. *Database*, 2014, 2014, bau061.
<https://doi.org/10.1093/database/bau061>
 23. Irinyi L., Serena C., Garcia-Hermoso D., Arabatzis M., Desnos-Ollivier M., Vu D., Cardinali G., Arthur I., Normand A.C., Giraldo A., da Cunha C.K., Sandoval-Denis M., Hendrickx M., Nishikaku S.A., de Azevedo Melo A.S., Merseguier K.B., Khan A., Rocha J.A.P., Sampaio P., da Silva Briones M.R., Carmona e Ferreira R., de Medeiros Muniz M., Castañón L.R., Estrada-Barcenas D., Cassagne C., Mary C., Duan S.Y., Kong F., Sun A.Y., Zeng X., Zhao Z., Gantois N., Botterel F., Robbertse B., Schoch C., Gams W., Ellis D., Halliday C., Chen S., Sorrell T.C., Piarroux R., Colombo A.L., Pais C., de Hoog S., Zancopé-Oliveira R.M., Taylor M.L., Toriello C., de Almeida Soares C.M., Delhaes L., Stubbe D., Dromer F., Ranque S., Guarro J., Cano-Lira J.F., Robert V., Velegriaki A., Meyer W. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM) – ITS reference DNA barcoding database - the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med. Mycol.*, 2015, 53(4), 313–337.
<https://doi.org/10.1093/mmy/myv008>
 24. Vu D., Groenewald M., Szöke S., Cardinali G., Eberhardt U., Stielow B., de Vries M., Verkley G.J.M., Crous P.W., Boekhout T., Robert V. DNA barcoding analysis of more than 9000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. *Stud. Mycol.*, 2016, 85(1), 91–105.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.007>
 25. Vu D., Groenewald M., de Vries M., Gehrman T., Stielow B., Eberhardt U., Al-Hatmi A., Groenewald J.Z., Cardinali G., Houbraken J., Boekhout T., Crous P.W., Robert V., Verkley G.J.M. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Stud. Mycol.*, 2019, 92(1), 135–154.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001>
 26. Lücking R., Dal Forno M., Moncada B., Coca L.F., Vargas-Mendoza I.Y., Aptroot A., Arias L.J., Besal B., Bungartz F., Cabrera-Amaya D.M., MES C., Chaves J.L., Eliasaro S., Gutiérrez-M.C., Hernández-M.J.E., Herrera-Campos M.A., Holgado-Rojas M.E., Jonitz H., Kuk-

- wa M., Lucheta F., Madriñán S., Marcelli M.P., Martins S.M.A., Mercado-Díaz J.A., Molina J.A., Morales E.A., Nelson P.R., Nugra F., Ortega F., Paredes T., Patiño A.L., Peláez-Pulido R.N., Pérez-Pérez R.E., Perlmutter G.B., Rivas-Plata M.E., Robayo J., Rodríguez C., Simijaca D.F., SotoMedina E., Spielmann A.A., Suárez-Corredor A., Torres J.M., Vargas C.A., Yáñez-Ayabaca A., Weera-koon G., Wilk K., Celis-Pacheco M., Diazgranados M., Brokamp G., Borsch T., Gillevet P.M., Sikaroodi M., Lawrey J.D. Turbo-taxonomy to assemble a megadiverse lichen genus: seventy new species of *Cora* (Basidiomycota: Agaricales: Hygrophoraceae), honouring David Leslie Hawksworth's seventieth birthday. *Fungal Divers.*, 2017, 84(1), 139–207.
<https://doi.org/10.1007/s13225-016-0374-9>
27. Liu K.L., Porras-Alfaro A., Kuske C.R., Eichorst S.A., Xie G. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78(5), 1523–1533.
<https://doi.org/10.1128/AEM.06826-11>
 28. Porras-Alfaro A., Liu K.L., Kuske C.R., Xie G. From genus to phylum: large-subunit and internal transcribed spacer rRNA operon regions show similar classification accuracies influenced by database composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014, 80(3), 829–840.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02894-13>
 29. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2012, 109(16), 6241–6246.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
 30. Raja H.A., Miller A.N., Pearce C.J., Oberlies N.H. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J. Nat. Prod.*, 2017, 80(3), 756–770.
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
 31. Geiser D.M., Klich M.A., Frisvad J.C., Peterson S.W., Varga J., Samson R.A. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.*, 2007, 59, 1–10.
<https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.01>
 32. Hibbett D., Abarenkov K., Kõljalg U., Öpik M., Chai B., Cole J., Wang Q., Crous P., Robert V., Helgason T., Herr J.R., Kirk P., Lueschow S., O'Donnell K., Nilsson R.H., Oono R., Schoch C., Smyth C., Walker D.M., Porras-Alfaro A., Taylor J.W., Geiser D.M. Sequence-based classification and identification of Fungi. *Mycologia*, 2016, 108(6), 1049–1068.
<https://doi.org/10.3852/16-130>
 33. Andersen B., Sørensen J.L., Nielsen K.F., Gerrits van den Ende B., de Hoog S. A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group. *Fungal Genet. Biol.*, 2009, 46(9), 642–656.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.05.005>
 34. Минаева Л.П., Самохвалова Л.В., Завриев С.К., Стахеев А.А. Первое выявление гриба *Fusarium coffeatum* на территории Российской Федерации. *Сельскохозяйственная биология*, 2022, 57(1), 131–140.
 35. Юрков А.П., Крюков А.А., Горбунова А.О., Кожемяков А.П., Степанова Г.В., Мачс Э.М., Родионов А.В., Шишова М.Ф. Молекулярно-генетическая идентификация грибов арбускулярной микоризы. *Экологическая генетика*, 2018, 16(2), 11–23.
 36. Wilailuck D., Prisana W., Siwaret A., Anurag S. Morphological and molecular identification of *Neopestalotiopsis clavispora* causing flower blight on *Anthurium andraeanum* in Thailand. *Hortic. Plant J.*, 2021, 7(6), 573–578.
<https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.10.004>
 37. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2013, 17(4/2), 1044–1054.
<https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.10.004.2.2022>
 38. Bakkeren G., Kronstad J., Levesque C. Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in *Ustilaginomycetes*. *Mycologia*, 2000, 92(3), 510–521.
<https://doi.org/10.2307/3761510>
 39. Tsykun T., Rellstab C., Dutech C., Sipos G., Prospero S. Comparative assessment of SSR and SNP markers for inferring the population genetic structure of the common fungus *Armillaria cepistipes*. *Heredity*, 2017, 119(5), 371–380.
<https://doi.org/10.1038/hdy.2017.48>
 40. Mahfooz S., Singh S.P., Rakh R., Bhattacharya A., Mishra N., Singh P.C., Chauhan P.S., Nautiyal C.S., Mishra A.A. Comprehensive characterization of simple sequence repeats in the sequenced *Trichoderma* genomes provides valuable resources for marker development. *Front Microbiol.*, 2016, 7.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00575>
 41. Steimel J., Chen W., Harrington T.C. Development and characterization of microsatellite markers for the poplar rust fungi *Melampsora medusae* and *Melampsora larici-populina*. *Mol. Ecol. Notes.*, 2005, 5(3), 484–486.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.00964.x>
 42. Galovic V., Orlovic S., Pap P., Kovacevic B., Markovic M. Specificity of SSR loci for *Melampsora* species on poplars. *Genetika*, 2010, 42(3), 513–520.
<https://doi.org/10.2298/GENSR1003513G>
 43. Iqbal M.A., Jaiswal S., Mishra V.K., Jasrotia R.S., Anagadi U.B., Singh B.P., Passari A.K., Deka P., Prabha R., Singh D.P., Gupta V., Tomar R., Oberoi H., Rai A., Kumar D. Fungal genomic resources for strain identification and diversity analysis of 1900 fungal species. *J. Fungi*, 2021, 7(4), 288.
<https://doi.org/10.3390/jof7040288>
 44. Matute D.R., Sepúlveda V.E. Fungal species boundaries in the genomics era. *Fungal Genet. Biol.*, 2019, 131, 103249.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103249>
 45. Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbett D.S., Fisher M.C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 2000, 31(1), 21–32.
<https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1228>
 46. Fujita M.K., Leaché A.D., Burbrink F.T., McGuire J.A., Moritz C. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends Ecol. Evol.*, 2012, 27(9), 80–88.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.04.012>

47. Harrington T.C., Rizzo D. M. In: Structure and Dynamics of Fungal Populations [Ed. Worrall, J. J.], Kluwer Press, Dordrecht. The Netherlands, 1999, 43–71.
48. Geiser D.M. In: Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine. [Ed. Jan S.T., Lene L.], Springer, 2004, 3–14.
49. Houbaken J., Kocsubé S., Visagie C.M., Yilmaz N., Wang X.C., Meijer M., Kraak B., Hubka V., Bensch K., Samson R.A., Frisvad J.C. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud. Mycol.*, 2020, 95, 5–169. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>
50. Ганнибал Ф.Б. Полифазный подход в таксономии грибов. *Журнал общей биологии*, 2021, 82(3), 175–187. <https://doi.org/10.31857/S0044459621020032>
51. Andersen B., Sørensen J.L., Nielsen K.F., Gerrits van den Ende B., de Hoog S. A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group. *Fungal Genet. Biol.*, 2009, 46(9), 642–656. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.05.005>
52. Vieira M.L., Santini L., Diniz A.L., Munhoz Cde F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet. Mol. Biol.*, 2016, 39(3), 312–328. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>
53. Araujo R. Towards the Genotyping of Fungi: Methods, Benefits and Challenges. *Curr. Fungal Infect. Rep.*, 2014, 8(3), 203–210. <https://doi.org/10.1007/s12281-014-0190-1>
54. Xu J. Fungal species concepts in the genomics era. *Genome*, 2020, 63(9), 459–468. <https://doi.org/10.1139/gen-2020-0022>
55. Mandal K., Dutta S., Upadhyay A., Panda A., Tripathy S. Comparative genome analysis across 128 *Phytophthora* isolates reveal species-specific microsatellite distribution and localized evolution of compartmentalized genomes. *Front. Microbiol.*, 2022, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.806398>
56. Walkowiak S., Rowland O., Rodrigue N., Subramaniam R. Whole genome sequencing and comparative genomics of closely related *Fusarium* head blight fungi: *Fusarium graminearum*, *F. meridionale* and *F. asiaticum*. *BMC Genomics*, 2016, 17(1), 1014. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3371-1>
57. Hu T., Chitnis N., Monos D., Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol.*, 2021, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
58. Arbefeveille S., Harris A., Ferrieri P. Comparison of sequencing the D2 region of the large subunit ribosomal RNA gene (MicroSEQ®) versus the internal transcribed spacer (ITS) regions using two public databases for identification of common and uncommon clinically relevant fungal species. *J. Microbiol. Methods*, 2017, 140, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.06.015>
59. Schmitt I., Barker F.K. Phylogenetic methods in natural product research. *Nat. Prod. Rep.*, 2009, 26(12), 1585–1602. <https://doi.org/10.1039/b910458p>
60. Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbett D.S., Fisher M.C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.*, 2000, 31(1), 21–32. <https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1228>
61. Taylor J.W., Fisher M.C. Fungal multilocus sequence typing – it's not just for bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2003, 6(4), 351–356. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(03\)00088-2](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(03)00088-2)
62. Gostincar C. Towards genomic criteria for delineating fungal species. *J. Fungi*, 2020, 6(4), 246. <https://doi.org/10.3390/jof6040246>
63. Pattemore J.A., Hane J.K., Williams A.H., Wilson B.A.L., Stodart B.J., Ash G.J. The genome sequence of the bio-control fungus *Metarhizium anisopliae* and comparative genomics of *Metarhizium* species. *BMC Genomics*, 2014, 15(1), 660. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-660>
64. Mead M.E., Steenwyk J.L., Silva L.P., de Castro P.A., Saeed N., Hillmann F., Goldman G.H., Rokas A. An evolutionary genomic approach reveals both conserved and species-specific genetic elements related to human disease in closely related *Aspergillus* fungi. *Genetics*, 2021, 218(2), iyab066. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab066>
65. Fedorova N., Khaldi N., Joardar V., Maiti R., Amedeo P., Anderson M., Crabtree J., Silva J., Badger J., Albarraq A., Angiuoli S., Bussey H., Bowyer P., Cotty P., Dyer P., Egan A., Galens K., Fraser-Liggett C., Haas B., Inman J., Kent R., Lemieux S., Malavazi I., Orvis J., Roemer T., Ronning C., Sundaram J., Sutton G., Turner G., Venter J., White O., Whitty B., Youngman P., Wolfe K., Goldman G., Wortman J., Jiang B., Denning D., Nierman W. Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet.*, 2008, 4(4), e1000046. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000046>
66. Lear G., Dickie I., Banks J., Boyer S., Buckley H., Buckley T., Cruickshank R., Dopheide A., Handley K.M., Hermans S., Kamke J., Lee C., Mac Diarmid R., Morales S., Orlovich D., Smissen R., Wood J., Holdaway R. Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples. *N. Z. J. Ecol.*, 2018, 42(1), 10–50. <https://doi.org/10.20417/nzjecol.42.9>
67. Bell K.L., Burgess K.S., Okamoto K.C., Aranda R., Brosi B.J. Review and future prospects for DNA barcoding methods in forensic palynology. *Forensic Sci. Int. Genet.*, 2016, 21, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.12.010>
68. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, 2010, 7(5), 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
69. Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van Horn D.J., Weber C.F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing

- microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75(23), 7537–7541.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
70. Kumar S., Carlsen T., Mevik B.H., Enger P., Blaallid R., Shalchian-Tabrizi K., Kausarud H. CLOTU: an online pipeline for processing and clustering of 454 amplicon reads into OTUs followed by taxonomic annotation. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1), 182.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-182>
 71. Gweon H.S., Oliver A., Taylor J., Booth T., Gibbs M., Read D.S., Griffiths R.I., Schonrogge K. PIPITS: An automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods Ecol. Evol.*, 2015, 6(8), 973–980.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12399>
 72. Gdanetz K., Benucci G.M.N., Vande Pol N., Bonito G. CONSTAX: a tool for improved taxonomic resolution of environmental fungal ITS sequences. *BMC Bioinformatics*, 2017, 18(1), 538.
<https://doi.org/10.1186/s12859-017-1952-x>
 73. Fosso B., Santamaria M., Marzano M., Alonso-Aleman D., Valiente G., Donvito G., Monaco A., Notarangelo P., Pessole G. BioMaS: a modular pipeline for Bioinformatic analysis of Metagenomic Amplicons. *BMC Bioinformatics*, 2015, 16(1), 203.
<https://doi.org/10.1186/s12859-015-0595-z>
 74. Soverini M., Turroni S., Biagi E., Brigidi P., Candela M., Rampelli S. Human Mycobiome Scan: a new bioinformatics tool for the characterization of the fungal fraction in metagenomic samples. *BMC Genomics*, 2019, 20(1), 496.
<https://doi.org/10.1186/s12864-019-5883-y>
 75. Yahr R., Schoch C.L., Dentinger B.T.M. Scaling up discovery of hidden diversity in fungi: impacts of barcoding approaches. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.*, 2016, 371(1702), 20150336.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0336>

Development of Methodology for Molecular Genetic Taxonomic Identification of Micromycetes

A. A. Bavtushny^a, Yu. A. Rybakov^a, E. V. Patrusheva^a, #, and S. P. Sineoky^a

^aKurchatov Complex of Genetic Research, NRC “Kurchatov Institute”, Bioresource Center
 Russian National Collection of Industrial Microorganisms, Moscow, 123182 Russia

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

Abstract—Fungi represent one of the most numerous groups of eukaryotic organisms. They play an important role in all ecosystems, are pathogens of humans, animals and plants, as well as destructors and/or producers of various biologically active compounds. In modern laboratory practice in recent decades, many methods have appeared that allow the identification of representatives of the kingdom of fungi. However, the question remains unsolved for a number of genera of micromycetes: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium* and others. The use of molecular methods of DNA barcoding, multilocus typing, microsatellite DNA does not provide a full guarantee of unambiguous identification. An effective solution to this problem is possible with the use of full-genome sequencing. This review provides a comparative analysis of different methods of fungi identification

Keywords: bioinformatics, genomic data analysis, marker genes, micromycetes, species identification, whole genome sequencing