

УДК 57.065

ПОЛИФАЗНЫЙ ПОДХОД В ТАКСОНОМИИ ГРИБОВ

© 2021 г. Ф. Б. Ганнибал*

*Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений
ш. Подбельского, 3, Санкт-Петербург, 196608 Россия*

**E-mail: fgannibal@vizr.spb.ru*

Поступила в редакцию 12.10.2020 г.

После доработки 26.11.2020 г.

Принята к публикации 17.12.2020 г.

Систематика микроскопических грибов всегда испытывала ряд специфических трудностей. Для систематики грибов важным достижением двух последних десятилетий явилось развитие молекулярной филогении. Использование мультилокусного секвенирования в связке с филогенетическим анализом технически наиболее удобно и методологически оправдано для определения границ видов в рамках эволюционной концепции вида, которая в настоящее время является наиболее популярной у микологов и, очевидно, будет оставаться таковой в ближайшем будущем. Наиболее подходящий инструмент для делимитации видов – филогенетическое распознавание. Однако этот уже хорошо отработанный подход не всегда дает возможность однозначно структурировать биоразнообразие и впоследствии с легкостью проводить идентификацию таксонов. Возникшая в 1970-е годы в среде бактериологов так называемая полифазная таксономия с конца 2000-х приобрела некоторую популярность и среди микологов. В настоящее время под ней подразумевают консенсусную таксономию – выделение таксономических групп в результате сравнительного анализа всевозможных доступных признаков. В статье рассмотрен процесс формирования полифазного подхода и практика его применения в современной микологии. Отдельный раздел обзора посвящен разнообразию признаков, доступных для миколога, и целесообразности их использования в таксономии, в частности в рамках полифазного подхода. Сделано заключение, что полифазный подход необходим в случаях, когда филогенетическое распознавание не дает удовлетворительного результата. Например, при небольшом количестве секвенированных генов или при анализе недавно дивергировавших видов. Кроме того, рассматриваемый подход пригоден для формирования таксономических гипотез, которые будут проверены филогенетическими методами и, опираясь на которые, могут быть сделаны подходящие выборки штаммов (образцов).

DOI: 10.31857/S0044459621020032

Идеологический и методический багаж биологической систематики весьма богат и разнообразен. Свой след в биологии оставил большой ряд таксономических практик, каждая из которых прошла через серию стадий преобразования: рождение, формирование, популярность и порой забвение. Постепенно менялся тип используемых данных (признаков), методы их получения (наблюдения) и представления о разрешенных способах их интерпретации (концепции).

Систематика микроорганизмов, и в том числе микроскопических грибов, всегда испытывала особенные трудности как теоретического, так и практического толка. Основными причинами являются, пожалуй, две. Во-первых, дефицит легко наблюдаемых стабильных признаков, в первую очередь из-за морфологической бедности микроорганизмов. Большинство же концепций формировалось с расчетом на более сложные многоклеточные организмы. Во-вторых, для многих мик-

роорганизмов, включая значительную часть видов грибов, характерно отсутствие полового размножения, самооплодотворение или технические трудности при изучении полового процесса, что делает биологическую концепцию вида (Dobzhansky, 1937; Mayr, 1963) для них неприменимой либо непродуктивной.

Для систематики грибов важным достижением двух последних десятилетий явилось развитие молекулярной филогении – дисциплины, позволяющей генерировать большое количество данных о молекулярных маркерах (признаках) и проводить их компьютерную обработку, нацеленную на реконструкцию филогенеза. Возможность оперировать большими объемами данных и свести к минимуму субъективность их интерпретации была сразу оценена микологами.

Молекулярная систематика (систематика, в основе которой лежит анализ молекулярной филогении) внесла и продолжает вносить колос-

сальный вклад в развитие знаний о таксономическом разнообразии грибов. Количество работ, вышедших с конца 1990-х годов и посвященных молекулярной систематике отдельных групп грибов, не поддается подсчету. Однако и этот подход быстро показал, что не представляет собой панацею, не всегда давая возможность однозначно структурировать биоразнообразие и впоследствии с легкостью проводить идентификацию таксонов.

Возникшая в 1970-е годы (Colwell, 1970) в среде бактериологов так называемая полифазная таксономия с конца 2000-х приобрела некоторую популярность и среди микологов. В последние полтора десятилетия появилось несколько десятков работ по таксономии грибов, апеллирующих к полифазному подходу. Наиболее интересные из них будут рассмотрены ниже. Многие работы по полифазной систематике грибов предваряются молекулярно-филогенетическим анализом и оканчиваются его надстройкой.

В данном обзоре предпринята попытка разобраться в сути полифазного подхода, рассмотреть уже имеющийся опыт его применения для систематики микроскопических грибов и оценить таксономическую ценность признаков, которые в настоящий момент могут быть использованы микологами.

ФОРМИРОВАНИЕ ПОЛИФАЗНОГО ПОДХОДА

Автор термина “полифазная таксономия” (polyphasic taxonomy) — американский микробиолог Рита Колвелл, которая ввела его в своей работе, посвященной нумерической таксономии бактерий р. *Vibrio* (Colwell, 1970). Первоначально термин использовался микробиологами (бактериологами) в значении, сходном с фенетической систематикой. Отличием являлось то, что полифазная таксономия стремилась объединить много уровней информации, от молекулярного до экологического. Всем дискретным признакам придавался примерно равный вес и равное значение при построении системы.

Впоследствии понятие полифазной таксономии приобрело несколько иной смысл. С определенных пор под ним подразумевают консенсусную таксономию — выделение таксономических групп в результате сравнительного анализа всевозможных доступных признаков (Vandamme et al., 1996). Суть подхода заключается в независимом анализе множества признаков и свойств у большого числа штаммов, по возможности полно представляющих изучаемую группу (например, род). По результатам анализа каждого признака строятся частные таксономические системы, которые затем сравниваются, и выделяются таксо-

ны, статус которых в большинстве частных систем оказался одинаков. Для штаммов с дискуссионным статусом продолжается анализ на основе новых признаков.

Методология использования данного подхода в таксономии и набор признаков, рекомендуемый для обязательного изучения, в бактериологии достаточно хорошо отработаны (Vandamme et al., 1996; Gillis et al., 2001; Prakash et al., 2007). В микологической литературе чаще аккуратно говорится не о полифазной таксономии, а о полифазном подходе к характеристике (Aveskamp et al., 2010), изучению (Cai et al., 2009) или идентификации (Frisvad, 2011) того или иного таксона. В некоторых работах (Schmidt et al., 2004, p. 341) авторы наряду с полифазной таксономией используют термин “интегрированная таксономия” (“integrated taxonomic study... based on the use of composite datasets”), подчеркивая комплексность подхода и разнообразие используемых данных.

В макросистематике полифазный подход не используется. Основной точкой приложения полифазного подхода является род с целью распознавания в нем отдельных видов. В связи с этим необходимо обратить внимание на важный семантический нюанс. Отмечают путаницу между понятием концепции вида, т.е. описанием типа сущности, представляющей собой вид, и понятием критериев вида, которые ограничивают отдельный вид, т.е. практическими стандартами распознавания принадлежности индивидуума к тому или иному виду (Cai et al., 2011). Ранее указывалось, что под многими видовыми концепциями на самом деле скрываются видовые критерии (Taylor et al., 2000; Hey, 2006; Queiroz, 2007). Несмотря на существующий плюрализм мнений относительно концепции вида, большинство биологов пользуются эволюционной концепцией (Cai et al., 2011), представляющей вид как сегмент эволюционной линии, который развивается независимо от других (Queiroz, 1998). Биологическая концепция тоже обладает популярностью, но из-за определенных сложностей, уже упомянутых выше, применение данной концепции в микологии сильно ограничено (Taylor et al., 2000). Тем более что предлагается ее рассматривать не как самостоятельную, а как один из способов распознавания видов в рамках эволюционной концепции (Avice, Wollenberg, 1997; Mayden, 1997), хотя эта позиция и дискуссионная.

Таким образом, на наш взгляд, имеет смысл говорить не о полифазной таксономии, а о полифазном подходе к определению критериев вида. Сутью подхода является практика использования всей имеющейся информации (филогенетической, гено- и фенотипической) для выделения консенсусных таксономических групп. Базовым принципом, апеллирующим к эволюционной

концепции вида, остается то, что деление на таксоны не должно противоречить филогении. Виды должны оставаться монофилетичными.

Если для построения филограмм при распознавании видов бактерий и архей с 1990-х годов неизменно используются в основном гены рибосомальной РНК (Ludwig, Schleifer, 1994; Maidak et al., 1996), то для грибов информативность анализа этого участка зачастую недостаточна. Секвенирование генов большой и малой субъединиц РНК часто и успешно выполняется для дифференциации на уровне родов и семейств, реже — групп видов. Секвенирование межгенных спейсеров ITS1 и ITS2 крайне популярно для исследований на видовом уровне. Недавно они были признаны основным баркодом для грибов (Seifert, 2009; Schoch et al., 2012).

Немало было сказано о том, что для надежной реконструкции филогении и идентификации необходим анализ нуклеотидных последовательностей нескольких генов, поскольку генеалогия любого одного гена может значительно отличаться от истории организма в целом, что справедливо для любых групп организмов (Nichols, 2001).

Для делимитации видов с использованием мультилокусной филогении применяют два основных метода (Matute, Sepúlveda, 2019). Наиболее распространен среди микологов метод, основанный на генеалогической согласованности — *genealogical concordance phylogenetic species recognition*, GCPSR (Taylor et al., 2000), или *strict genealogical concordance*, SGC (Matute, Sepúlveda, 2019). 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; Fujita et al., 2012) — использует группу методов для вероятностно-математического моделирования генеалогической истории индивидуумов (штаммов) назад к общему предку и также позволяет выявить эволюционно независимые линии.

Ряд авторов рассматривают возможность описания видов исключительно на основании сравнения сиквенсов (*sequence-based classification and identification*, SBCI), по крайней мере в будущем (Hibbett et al., 2016). Особенно это актуально для изучения некультивируемых и труднокультивируемых видов и для исследования сложных сообществ микроорганизмов, таких как почвенные, когда выделить в чистую культуру абсолютно все, даже только культивируемые виды, часто не представляется возможным. На настоящий момент этот подход не практикуется и не узаконен

международным кодексом номенклатуры водорослей, грибов и растений (ICN).

Использование общепризнанных баркодов или мультигенной филогении с GCPSR не дает полной гарантии получения надежного дерева с возможностью его непротиворечивого членения. Гомоплазия, неполнота выборки, гибридизация и горизонтальный перенос генов способны приводить к трудно интерпретируемым результатам и ошибочным выводам. Для разрешения дискуссионных вопросов необходимо применение альтернативных подходов или модификация существующих.

Один из возможных вариантов усовершенствования мультигенной филогении — геномная филогения. Бурное развитие технологий полногеномного секвенирования и методов биоинформатической обработки геномов не оставляет сомнений в том, что сравнение полных геномов через какое-то время станет рутиной для систематиков. Но исследователям придется решить ряд концептуальных вопросов, связанных с разной филогенетической информативностью разных частей генома. Но уже сейчас сравнительный анализ геномов позволяет усовершенствовать мультигенную филогению.

До момента расцвета полногеномного анализа (если таковой произойдет) для решения таксономических вопросов, оставшихся после реконструкции филогении, имеет смысл использовать полифазный подход. С его помощью могут быть получены дополнительные основания для установления видовых границ или определены границы для эволюционно молодых, недавно дивергировавших видов. В первую очередь помощь могут оказать признаки, подверженные влиянию естественного отбора либо сцепленные с таковыми.

Но еще раз необходимо подчеркнуть, что построение консенсусной таксономической системы в рамках полифазного подхода должно согласовываться с филогенией. То есть полифазный подход в его современном виде характеризуется комплексностью (разнотипностью рассматриваемых признаков), принципом консенсусности и ориентированностью на филогению.

Идея комплексного подхода, интегрирующего данные разных типов, для систематики грибов сама по себе не нова. Подобные идеи выдвигались еще с начала прошлого века, допуская возможность одновременного использования морфологических, физиологических, цитологических, биохимических, анатомических, серологических, экологических признаков, особенностей жизненного цикла и т.д. (Ячевский, 1927; Хохряков, 1955). Причем призывы к разностороннему экспериментальному исследованию грибов в целях систематики подкреплялись ссылками на микологов XIX в. — А. де Бари и М.С. Воронина (Хох-

ряков, 1951). Однако данный подход не часто нашел широкое применение и не всегда оказывался продуктивным, главным образом из-за инструментальной ограниченности проводимых тогда исследований. На наш взгляд, в последние годы можно наблюдать более перспективную попытку создания такой комплексной методологии, благодаря объединению филогенетических течений в систематику с полифазным подходом и использованием развитых молекулярных, биохимических и биоинформатических методов.

Существование полифазной таксономии не ограничивается микробиологией. Некоторыми систематиками-зоологами пропагандируется аналогичный подход, получивший название интегративной таксономии (*integrative taxonomy*) (Dayrat, 2005; Schlick-Steiner et al., 2010). Подход предполагает при выявлении границ видов объединение данных филогеографии, морфологии, популяционной генетики, экологии, онтогенетических и поведенческих характеристик. Использование разноплановых признаков можно обнаружить и в работах по систематике растений, но ботаники чаще не обозначают такой подход как-то специальным термином, иногда все же упоминая интегративную таксономию (Rouhan, Gaudeul, 2014; Erst et al., 2020).

УСПЕХИ ПОЛИФАЗНОЙ СИСТЕМАТИКИ ГРИБОВ

Первыми среди микологов полифазный подход стали использовать специалисты по базидиомицетным дрожжам. Сравнение филогении, реконструированной по сиквенсам двух локусов, ДНК-фингерпринтов, морфологических и физиологических признаков и свойств изолятов *Rhodotorula glutinis* привело к описанию нового вида — *Rhodosporidium azoricum* (Gadanhó et al., 2001). Впоследствии сходный набор данных (ДНК-фингерпринты, сиквенсы 26S и ITS областей рДНК, информация о типах спаривания, морфологические и физиологические характеристики) был использован для анализа более сотни изолятов предварительно идентифицированных как *Rh. glutinis* (Gadanhó, Samraio, 2002). Изоляты были переопределены, и часть из них оказалась представителями трех видов *Rhodosporidium*. Для вида *Rh. glutinis* были предложены новые критерии.

Одно из первых упоминаний полифазного подхода в исследованиях мицелиальных грибов было сделано Лю с соавторами (Liou et al., 2007), изучавшими комплекс *Rhizopus stolonifer*. Филогения, реконструированная с использованием одного локуса, была сравнена лишь с долей G + C в геноме и несколькими традиционными морфологическими признаками.

Работы по полифазной таксономии были успешно выполнены для ревизии подрода *Penicillium* рода *Penicillium* (Frisvad, Samson, 2004; Козловский и др., 2009). Были использованы микро- и макроморфологические признаки, рост при разной температуре, рост на питательных средах с высокими концентрациями хлорида натрия, сахарозы и пропионовой кислоты, рост на средах с мочевиной, нитритами и креатином, спектр вторичных метаболитов. При аналогичных ревизиях р. *Aspergillus* секций *Usti* (Houbraken et al., 2007) и *Sparsi* (Varga et al., 2010), помимо молекулярной филогении, учитывали морфологические признаки, рост при разных температурах на нескольких средах и профили вторичных метаболитов.

Наиболее основательным образом полифазный подход был применен для исследования р. *Colletotrichum* (Cai et al., 2009). Был составлен обзор различных подходов к изучению видовых комплексов этого рода, включая морфологию, патогенность, физиологию, культуральные свойства, вторичные метаболиты и филогению. Авторы убедились, что в идеале систематика *Colletotrichum* должна основываться на мультигенной филогении, а хорошо обособленные филогенетические линии должны совпадать с какими-либо другими наблюдаемыми характеристиками. Достоинства полифазного подхода в случае данного таксона были хорошо продемонстрированы, и он был рекомендован для дальнейших исследований. Следуя рекомендациям, данным Цаем с соавторами (Cai et al., 2009), было успешно выполнено более 10 работ по систематике *Colletotrichum* (Sharma, Shenoy, 2016).

В ходе исследований одной полиморфной видовой группы р. *Alternaria* (комплекс *A. infectoria*, ныне выделенный в секцию *Infectoriae*) было проведено сравнение структуры биоразнообразия с помощью разных методов и типов данных: молекулярной филогении, классического анализа морфологии и анализа метаболитных профилей (Andersen et al., 2009). Изучив 51 штамм, авторы пришли к заключению, что все три вида анализа подтверждают разделение выборки штаммов максимум на две группы. Надежных генетических, морфологических и хемотаксономических маркеров для распознавания видов выявлено не было. Также был сделан неутешительный вывод, что для данной группы грибов филогения не может быть инструментом для предсказания патогенности, субстратной специфичности и способности к синтезу тех или иных микотоксинов. Несмотря на другие работы (Gannibal, Yli-Mattila, 2007; Poursafar et al., 2018), посвященных этой группе, также продемонстрировали невозможность построения дерева с надежной топологией, что, очевидно, указывает на принадлежность всех исследованных штаммов к одному полиморфному виду,

который, вероятно, находится в состоянии дивергенции.

Другим коллективом (Stadler et al., 2014) была построена политетическая система для базидиомицетного р. *Daldinia*. Была показана сильная степень консенсуса между морфологическими признаками, в том числе выявленными при помощи сканирующей электронной микроскопии, и хемотаксономическими маркерами, изученными методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Исключение составили только пигменты, экстрагированные с участием КОН. Полноценный молекулярно-филогенетический анализ не был проведен. При помощи секвенирования ITS-областей удалось только дискриминировать род в целом и некоторые группы видов.

В одной из работ, посвященной внутривидовому разнообразию *Fusarium verticillioides* (Chang et al., 2016), был проведен одновременно классический морфологический анализ, ПЦР с видоспецифичными праймерами, анализ микросателлитных ISSR-профилей и белковых профилей, полученных посредством матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF).

РАЗНООБРАЗИЕ ПРИЗНАКОВ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Признаки и свойства организма, используемые в классификационных целях, разнообразны и разнородны. Традиционным является объединение их в две группы: фено- и генотипические. Фенотипические маркеры (морфологические, биохимические, экологические, “биологические”, т.е. связанные с особенностями жизненного цикла, и т.д.) составляют наиболее обширную и привычную группу. Априори считается, что фенотипические признаки связаны с приспособленностью организма к условиям окружающей среды, т.е. испытывают давление естественного отбора. Однако для большинства признаков, используемых в систематике микроскопических грибов, этот аспект не изучался и не является очевидным. Также чаще всего неизвестна генетическая детерминация признака. Признаки, считаемые равновеликими, могут кодироваться разным количеством генов, что сказывается на их изменчивости и, соответственно, на уровне таксономической значимости такой информации. Фенотипические признаки могут быть простыми либо комплексным (составными), потенциально делимыми на несколько более простых признаков. Целесообразно учитывать именно простые признаки, если известно, что наследуются они независимо.

Из числа генотипических признаков в микологии наиболее популярны молекулярно-генетиче-

ские маркеры, которые чаще всего используются аналогично фенотипическим. При их обработке учитывается изменение структуры молекулы ДНК без учета особенностей информации, кодируемой полиморфным участком. Используемые для целей реконструкции филогении и таксономии молекулярно-генетические признаки (маркеры) зачастую являются нейтральными. Они отражают полиморфизм нуклеотидной последовательности ДНК в некодирующих областях, таких как интроны и сателлитная ДНК, или представляют собой синонимичные замены, которые не влияют на аминокислотную последовательность белков. Поэтому первичную структуру ДНК вполне можно рассматривать не как информационный (генетический) сигнал, а как фенотипический биохимический признак. Отличием этого типа маркеров от иных биохимических оказывается именно их селективная нейтральность. Они не участвуют во взаимодействиях организма с окружающей средой и не сказываются на жизнеспособности. Эти признаки, используемые как молекулярные часы, идеальны для филогенетических исследований. Они подходят для нумерической таксономии и идентификации на основе идеи ДНК-штрихкодирования, но неинтересны для типологической систематики.

Характер наследования молекулярных маркеров очевиден. Напротив, тип наследования большинства фенотипических признаков грибов неясен. Множество признаков и свойств грибов, для которых описаны генетические детерминанты, систематиками не учитываются и имеют значение для внутривидовой дифференциации. Более того, похоже, что многие фенотипические признаки также селективно нейтральны. Понимание степени влияния признака на адаптированность организма, информация о количестве генов, отвечающих за проявление признаков, связь этих генов с другими жизненно важными признаками (плейотропия), принадлежность к универсальной (коровой) или вариабельной частям генома могли бы дать объективные данные для определения ценности и веса того или иного признака.

Хорошим примером таксономически ценного генетического признака может служить MAT-локус — фактор, содержащий гены, ответственные за спаривание. Описаны случаи, когда близкие виды аскомицетов представлены штаммами как с первой, так и со второй идиоморфой MAT-локуса или только штаммами, у которых участки MAT1-1 и MAT1-2 спаяны. В первом случае вид гетероталличен, во втором — гомоталличен, что обуславливает изоляцию и разные репродуктивные стратегии. Стоит упомянуть пару видов — *Dendryphion penicillatum* и *D. papaveris* (Inderbitzin et al., 2006), а также виды р. *Stemphylium* (Inderbitzin et al., 2005), у которых этот признак был удачно использован в целях таксономии.

В целом случаи использования фенотипических признаков с известной генетической детерминацией в систематике очень немногочисленны. В ближайшем будущем будут становиться более частыми и основательными попытки дифференциации видов на основе сравнительной геномики, каковые начались еще с прошлого десятилетия (Rokas et al., 2007). В этом случае, помимо простого увеличения массива данных, можно было бы “свести” ряд генотипических и фенотипических признаков. Но идеология и методология сравнительно-геномной систематики только начинают разрабатываться. На данный момент при сравнении геномов разных организмов используют традиционный мультилокусный (гиперлокусный) филогенетический анализ и относительно простые, сугубо статистические показатели: среднее нуклеотидное сходство (average nucleotide identity, ANI) (Figueras et al., 2014) и попарное сравнение частот k -меров (различных последовательностей с длиной k) (Hibbett et al., 2016; Cserhati et al., 2019).

Для реконструкции кладогенеза более интересны нейтральные маркеры, расположенные в той части генома, которая универсальна для крупной таксономической единицы. Для анализа анагенеза и очерчивания границ видов ценность приобретают другие признаки и другие части генома. Справится ли геномика в одиночку с определением значимости геномных маркеров для систематики или потребуются совместная работа молекулярных биологов и биоинформатиков со специалистами по морфологии, биохимии и экологии грибов — пока неясно. Очевидно, до полноценного применения геномного анализа в систематике предстоят серьезные дискуссии.

Фенотипические признаки

Морфологические признаки наиболее популярны для целей таксономии. К таковым относятся строение органов спороношения, внешний вид колоний при культивировании *in vitro* и иные признаки. Будучи использованы отдельно от других признаков и филогенетических реконструкций, они не предоставляют возможности получить непротиворечивую систему для многих групп грибов, особенно микромицетов. Тем не менее они остаются самыми важными и широко используемыми. Проблема заключается в недостаточном количестве таких признаков, относительной трудности их наблюдения и их нестабильности. Для наблюдения в чистой культуре часто используют разные питательные среды и условия культивирования. На примере многих родов было показано, что состав среды (субстрат), температура и другие параметры существенно влияют на морфологические признаки и культуральные свойства. Поэтому для микроми-

цетов предпочтительнее изучение морфологии в условиях чистой культуры по сравнению с полевыми гербарными образцами. При этом крайне необходима унификация условий проведения исследований, по крайней мере для видов одного рода. Подобные стандарты предложены для родов *Penicillium* (Frisvad, Samson, 2004), *Alternaria* (Simmons, 2007), *Colletotrichum* (Cai et al., 2009) и др.

Биохимические и физиологические признаки у микромицетов имеют большее адаптивное значение, чем морфологические, и поэтому потенциально должны реже приводить к выделению парии и полифилетических таксонов. Неоднократно совершались попытки найти надежные стабильные хемотаксономические маркеры, которые позволили бы разделить виды и впоследствии проводить идентификацию. В качестве возможных хемотаксономических признаков был предложен состав полисахаридов клеточной стенки (Leal et al., 2010), жирных кислот и стеролов (Müller et al., 1994; Weete et al., 2010). Образование лактонов похонинов было основанием для выделения р. *Pochonia* из р. *Verticillium* (Stadler et al., 2003). Микотоксины были использованы в систематике родов *Fusarium* (Ichinoe et al., 1983) и *Aspergillus* (Frisvad et al., 2007).

Метаболитные профили, включающие данные сразу о многих экзометаболических, полученные с помощью хроматографии (преимущественно ВЭЖХ), видятся наиболее простым способом получения объемных данных, которые можно использовать для целей таксономии грибов (Smedsgaard, Nielsen, 2005). Профили метаболитов неоднократно использовали в таксономии *Fusarium* (Schmidt et al., 2004), *Alternaria* (Andersen et al., 2005, 2008, 2009), *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* (Frisvad et al., 2007; Frisvad, 2015) и других грибов.

Проблема заключается в том, что синтез многих вторичных метаболитов, среди которых стоит искать видоспецифичные особенности, нестабилен. Появление одного метаболита зависит от нескольких генов, экспрессия которых может индуцироваться или модулироваться внешними факторами (Smedsgaard, Nielsen, 2005). Наблюдаемая в итоге сильная модификационная изменчивость не дает преимуществ метаболитным маркерам перед другими признаками, используемыми в систематике. Поиск отдельных стабильных хемотаксономических маркеров трудозатратен при невысокой информативности. Для выявления таких признаков необходимо провести сравнение большого количества штаммов разной степени родства, причем используя недешевые методы в надежде найти один или несколько маркеров без гарантии на успех.

Ряд таксономических микологических работ в 1990–2000-х гг. был выполнен на основе анализа состава жирных кислот методами газовой или га-

зожидкостной хроматографии. Несмотря на сообщения о потенциальной продуктивности данного подхода (например, Shiosaki et al., 2001; Fraga et al., 2008), он не стал популярным. Одной из сложностей является изменчивость жирнокислотного состава в зависимости от условий культивирования и возраста культуры (Stahl, Klug, 1996). При сравнении разных биохимических подходов, например, нескольких видов р. *Fusarium*, данный подход показал себя не самым информативным в сравнении с анализами профиля вторичных метаболитов и аминокислотного состава (Zain, 2010).

Более успешно используют протеомное профилирование, проводя сравнение микроорганизмов по белковым фингерпринтам с помощью матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS). Данный метод предоставляет возможность получить специфичные для конкретного штамма масс-спектры, что создает основу для его использования в целях идентификации и внутривидового типирования микроорганизмов (Aebersold, 2003; Domon, Aebersold, 2006; Pinel et al., 2011). В качестве достоинств метода отмечают простоту препаративных процедур, краткое время анализа (несколько минут) и невысокую стоимость (Dickinson et al., 2004). Проблемным моментом остается воспроизводимость результатов и, соответственно, их надежность. Данный метод используется преимущественно медицинскими микологами (Ranque et al., 2014), в том числе в нашей стране (Евстигнева и др., 2015; Шаров и др., 2018), для идентификации изолятов клинических мицелиальных и дрожжеподобных грибов. Метод позволяет давать правильное определение до уровня вида примерно для 90% изолятов (Putignani et al., 2011; Ranque et al., 2014). Единичные работы касаются фитопатогенных микромицетов (Santos et al., 2010). Широкого распространения метод не получает, так как требует создания базы данных со спектрами (библиотеки), что в отношении не клинических грибов сложно сделать из-за их большого видового разнообразия, а также из-за того, что пока не достигнута достаточная надежность и разрешающая способность. Так, при исследовании четырех видов р. *Alternaria* изоляты только одного вида оказалось возможным надежно идентифицировать (Brun et al., 2013).

К протеомным методам, используемым для внутривидовой дифференциации, также относят мультилокусный энзим-электрофорез (МЭЭ). На основании анализа электрофоретической подвижности аллелимов можно не только охарактеризовать фенотип, но и сделать предположение об особенностях наследования этих признаков. Метод использовался, например, для идентификации клинических дрожжеподобных грибов

р. *Candida* (Caugant, Sandven, 1993; Rosa et al., 2000).

Примерно полвека назад одним из инструментов систематики и популяционной генетики грибов стал изоферментный анализ (Micales et al., 1992). Метод основан на определении ферментов, кодируемых разными аллелями, по электрофоретической подвижности. Появление разных форм фермента связано с изменениями нуклеотидной последовательности в кодирующей части соответствующего гена. С массовым введением в лабораторную практику секвенирования изоферментный анализ утратил актуальность как сравнительно малоинформативный.

Помимо синтезируемых веществ, грибы могут быть дифференцированы по потребляемым источникам углеводов. Этот признак был использован для таксономии *Penicillium* (Bridge, 1985) и *Colletotrichum* (Waller et al., 1993; Prihastuti et al., 2009). Например, вид *C. kahawae* может быть идентифицирован по неспособности усваивать соли лимонной и винной кислот, в отличие от других видов *Colletotrichum*, паразитирующих на кофе.

Цвет колоний — стандартный признак, обычно используемый как морфологический, хотя в той же мере его можно считать и биохимическим. Колонии некоторых грибов имеют характерный запах, который может помочь при идентификации. Наиболее известными примерами являются грибы р. *Trichoderma* из клады *T. viride*, которые обладают запахом кокоса (Gams, Bissett, 2002), и фруктовый аромат *Fusarium poae* (Schmidt et al., 2004). Во многих случаях варибельность этих признаков оказывается высокой, поэтому ценность их не должна завышаться.

Для целей полифазной систематики могут быть использованы и физиологические параметры, несмотря на часто наблюдаемую их вариативность от штамма к штамму. Относительная скорость роста в культуре оказалась полезным критерием, например, для дифференциации отдельных видов *Alternaria* (Andersen et al., 2005), *Aspergillus* (Samson, Varga, 2007) и *Colletotrichum* (Sutton, 1992; Prihastuti et al., 2009).

Паразитизм. Патогенность, агрессивность и специализация — характеристики, которым, безусловно, всегда уделяют большое внимание при работе с фитопатогенными грибами. Ранее субстратное происхождение сильно переоценивалось. Многие грибы получили видовые эпитеты по названиям растений, на которых они были впервые обнаружены и, соответственно, подразумевалось, что такое видовое название гриба достоверно отражает субстратную приуроченность. Впоследствии у специалистов, проводящих идентификацию, подсознательно возникал соблазн считать информацию о субстрате ключевой и до-

статочной для идентификации. Например, вид гриба, обнаруженный на картофеле, мог быть идентифицирован как "*X. solani*", с яблони – как "*X. mali*" (при существовании в роде "*X*" видов с этими эпитетами) без тщательного анализа морфологии. Такое заблуждение стало причиной появления в литературе, в том числе отечественной, большого количества неверных данных по географии и экологии фитопатогенных микромицетов.

Тем не менее немалое число видов, в первую очередь биотрофных, имеет действительно относительно узкую специализацию. Поэтому патогенность вообще и специализация в частности могут быть пригодны для разграничения близкородственных видов. Субстратная (филогенетическая) и органотропная специализации могут отражать начальный этап дивергенции видов. Зачастую у некротрофных и гембиотрофных грибов такая специализация не является очень строгой. Поэтому эксперименты по изучению патогенных свойств грибов должны ставиться с большой аккуратностью.

Способность к скрещиванию. Тестирование штаммов на способность давать половое потомство потенциально могло бы быть идеальным для определения границ видов в рамках биологической концепции. Но практическая ценность этого способа делимитации в микологии, как уже упоминалось, низка из-за технической сложности выполнения этой задачи или отсутствия способности к половому размножению в принципе.

Генотипические признаки

ДНК-маркеры. В настоящее время для изучения биоразнообразия используется множество генетических маркеров, отличающихся информативностью. Для их изучения отсутствует необходимость наличия у исследователя специфических навыков, которыми обладают опытные классические систематики. ДНК-маркеры можно поделить на моно- и мультилокусные, на исследуемые с помощью блот-гибридизации, ПЦР и ДНК-чипов (Хлёткина, 2013). Полный перечень подходов и методов достаточно велик, чтобы его перечислять в данной статье. Ранее для дифференциации таксонов микроорганизмов, для характеристики которых недостаточно морфологически признаков, широко использовали методы, ставшие классикой: полиморфизм длин рестриционных фрагментов (RFLP), случайно (произвольно) амплифицируемую полиморфную ДНК (RAPD), полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP-PCR) и ДНК-фингер-принтинг. К настоящему моменту методический арсенал еще более расширился и стало очевидным, что многие методы хорошо подходят для изучения внутривидового разнообразия и популяционной биологии, но не эффективны для це-

лей систематики. Для разделения 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 (Bakkeren et al., 2000; Koopman, 2005).

Нуклеотидные последовательности

Как упоминалось выше, для дифференциации видов грибов и ДНК-баркодинга наиболее популярно секвенирование межгенных спейсеров ITS1 и ITS2 (Seifert, 2009; Schoch et al., 2012). Благодаря мультикопийности этот участок легко амплифицируется, а сравнительно высокая изменчивость делает его ценным и удобным источником информации. Накоплено много данных по последовательностям ITS-областей генома грибов, депонированных в базе данных GenBank, что предоставляет богатый материал для сравнительного анализа и делает наиболее привлекательным секвенирование этих же областей у всех новых объектов исследований. Однако при использовании рДНК как единственного источника филогенетической информации для грибов, полученные филогенетические деревья часто не имеют достаточного разрешения, характеризуются низкой бутстреп-поддержкой или политоимией, что было продемонстрировано еще более 20 лет назад (Verbee, 1996; Landvik et al., 1997; Silva-Hanlin, Hanlin, 1999). Убедительно было показано, что использование белок-кодирующих генов может существенно увеличить разрешение филогенетических реконструкций для грибов и усилить поддержку топологии для деревьев, полученных с использованием рДНК (Matheny et al., 2002; Tanabe et al., 2004; Cai et al., 2009). По этой причине в настоящее время нормальной практикой для распознавания видов и популяций грибов считается мультигенный филогенетический анализ, или мультилокусное секвенирование-типирование (multilocus sequence typing, MLST) (Taylor, Fisher, 2003). Для ряда таксонов ITS или другие области рДНК теперь не считаются основным филогенетическим маркером (Hibbett et al., 2016), а используются только в предварительных исследованиях и для приблизительной идентификации.

Любопытно и очень важно, что иногда, например, для грибов р. *Fusarium* (Schmidt et al., 2004), самые часто используемые наборы признаков – фенотипические признаки и сиквенсы ITS-областей – оказались наименее конгруэнтны остальным типам маркеров и абсолютно не согласовывались друг с другом (табл. 1). Но в данном случае набор фенотипических признаков был небольшим и включал только характеристики, которые

Таблица 1. Анализ согласованности дендрограмм, полученных с использованием разных наборов данных для 109 изолятов трех близкородственных видов *Fusarium* (по: Schmidt et al., 2004)

| Наборы признаков | Степень сходства топологий дендрограмм, % | | | | | | |
|------------------|---|------|-----|-----|-----|-------|-----|
| | Все признаки | AFLP | Tub | Tef | IGS | Хром. | ITS |
| AFLP | 74 | | | | | | |
| Tub | 63 | 56 | | | | | |
| Tef | 74 | 60 | 96 | | | | |
| IGS | 68 | 52 | 88 | 78 | | | |
| Хром. | 56 | 47 | 73 | 48 | 64 | | |
| ITS | 14 | 34 | 55 | 23 | 43 | 38 | |
| Фенотип | 57 | 1 | 16 | 29 | 14 | 8 | 0 |

Примечание. AFLP – AFLP-фингерпринты, включающие 20 фрагментов. Tub, Tef, IGS и ITS – сиквенсы генов бета-тубулина и фактора элонгации трансляции 1-альфа, IGS и ITS-областей рибосомальной ДНК соответственно. Хром. – метаболитные профили, включающие 18 вторичных метаболитов, определенных методами ВЭЖХ и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС). Фенотип – восемь качественных бинарных признаков (форма микроконидий, наличие/отсутствие макроконидий, монофалид, хламидоспор, мучнистых колоний, быстрого роста колоний, высокого воздушного мицелия и фруктового запаха).

могли быть зафиксированы в бинарной форме (+/–).

Еще одной важной проблемой является присутствие в GenBank некоторой доли сиквенсов неверно идентифицированных видов. Это касается любых участков генома, но в первую очередь наиболее популярных ITS-областей, которые секвенируются огромным количеством коллективов с разной квалификацией. Для отдельных таксономических групп процент ошибочно этикетированных последовательностей может быть очень большим. Например, по мнению Цая и соавторов (Cai et al., 2009) большинство сиквенсов р. *Colletotrichum* принадлежат неверно определенным видам. Поэтому в любых таксономических и филогенетических исследованиях предпочтительно использовать сиквенсы эталонных (желательно ex-type) штаммов, а ITS-области при идентификации посредством сравнения с сиквенсами Генбанка в норме пригодны для определения рода и лишь предварительного определения вида (Hibbett et al., 2016).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Очевидно, в ближайшее время наиболее востребованной концепцией вида у грибов останется эволюционная. Использование мультилокусного секвенирования в связке с филогенетическим анализом технически наиболее удобно и методологически оправдано для определения границ видов в рамках упомянутой концепции. Скорее всего, в среднесрочной перспективе анализ отдельных нуклеотидных последовательностей будет вытеснен полногеномным секвенированием. Для полноценного использования последнего необходимо значительно более детальное по сравне-

нию с тем, что существует сейчас, представление о структуре и эволюции генома грибов: понимание состава корового генома и его вариативной части, представление о скорости изменения разных частей генома и о границе внутри- и межвидового полиморфизма по признакам, связанным со структурой генома.

Наиболее подходящий инструмент для делимитации филовидов – филогенетическое распознавание с применением методов наложения генеалогий и коалесценции, поскольку последние имеют относительно четкие правила и математический аппарат для проведения формальной процедуры. Однако далеко не всегда филогенетическое распознавание дает удовлетворительный результат. Например, при небольшом количестве секвенированных генов или при анализе недавно дивергировавших видов. Именно в этих случаях целесообразно применение полифазного подхода. Кроме того, полифазный подход пригоден для формирования таксономических гипотез, которые будут проверены филогенетическими методами, и опираясь на которые, могут быть сделаны подходящие выборки штаммов (образцов).

В отдельных случаях полифазный подход может оказаться продуктивным для таксономических исследований на уровне рода, но это требует использования несколько иного спектра признаков.

Полифазный подход может занять свое место и в практике идентификации. Есть основания надеяться, что будут найдены признаки и технологии, которые позволят проводить определение видов быстрее и дешевле по сравнению с секвенированием ДНК или которые послужат хотя бы хорошим дополнением к определению генетического баркода. Но для этого необходимо продол-

жение масштабной скрупулезной работы по подбору информативных, надежных и удобных признаков, которые генетически закреплены и не связаны с онтогенетической, модификационной и комбинативной изменчивостью. Широкому использованию хроматографических и масс-спектрометрических методов в микологической систематике препятствует в первую очередь высокий уровень внутривидовых (штаммовых) отличий, сильное влияние среды и недостаточная изученность этого влияния. Классические морфологические признаки в этом плане остаются по-прежнему весьма востребованными, несмотря на недостаточно объективное отражение ими эволюционных событий.

В любом случае можно согласиться с тем мнением (Лухтанов, 2019), что для правильной интерпретации данных любого сорта и принятия обоснованного таксономического решения, как и раньше, необходим практикующий систематик, хорошо знающий свою группу.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект РНФ № 14-26-00067).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Евстигнеева Н.П., Аминова П.Г., Герасимова Н.А., Зильберберг Н.В., Кунгуров Н.В., 2015. Микробиота урогенитального тракта пациенток репродуктивного возраста, идентифицированная на основе масс-спектров рибосомальных белков // Успехи соврем. естествознания. № 2. С. 34–39.
- Козловский А.Г., Желифонова В.П., Антипова Т.В., 2009. Вторичные метаболиты в таксономии грибов под рода *Penicillium* // Микробиология. Т. 78. № 5. С. 684–689.
- Лухтанов В.А., 2019. Делимитация видов и анализ криптического видового разнообразия в XXI веке // Энтотомол. обозрение. Т. 98. № 2. С. 358–370.
- Хлёткина Е.К., 2013. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и селекции // Вавиловский журн. генетики и селекции. Т. 17. № 4/2. С. 1044–1054.
- Хохряков М.К., 1951. Некоторые вопросы систематики грибов // Тр. ВИЗР. Вып. 3. С. 222–234.
- Хохряков М.К., 1955. О виде у грибов // Бот. журн. Т. 40. № 1. С. 33–45.
- Шаров Т.Н., Маркин А.М., Липницкий А.В., Викторов Д.В., Топорков А.В., 2018. Особенности масс-спектров культур *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* // Проблемы мед. микологии. Т. 20. № 2. С. 128.
- Ячевский А.А., 1927. К филогенетике грибов, Юбилейный сборник, посвященный И.П. Бородину. Л.: Изд. Гос. русск. бот. об-ва. С. 142–179.
- Aebersold R., 2003. A mass spectrometric journey into protein and proteome research // J. Am. Soc. Mass. Spectrom. V. 14. № 685. P. 93–95.
- Andersen B., Hansen M.E., Smedsgaard J., 2005. Automated and unbiased image analyses as tools in phenotypic classification of small-spored *Alternaria* spp. // Phytopathology. V. 95. № 9. P. 1021–1029.
- Andersen B., Dongo A., Pryor B.M., 2008. Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani*, and *A. tomatophila* // Mycol. Res. V. 112. № 2. P. 241–250.
- Andersen B., Sørensen J.L., Nielsen K.F., Gerrits Van Den Ende B., Hoog S., de, 2009. A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group // Fungal Genet. Biol. V. 46. № 9. P. 642–656.
- Aveskamp M.M., Gruyter J., de, Woudenberg J.H.C., Verkley G.J.M., Crous P.W., 2010. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterize *Phoma* and related pleosporalean genera // Stud. Mycol. V. 65. P. 1–60.
- Avise J.C., Wollenberg K., 1997. Phylogenetics and the origin of species // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 94. № 15. P. 7748–7755.
- Bakkeren G., Kronstad J.W., Lévesque C.A., 2000. Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in Ustilaginomycetes // Mycologia. V. 92. № 3. P. 510–521.
- Berbee M.L., 1996. Loculoascomycete origin and evolution of filamentous ascomycete morphology based on 18S rRNA gene sequence data // Mol. Biol. Evol. V. 13. № 3. P. 462–470.
- Bridge P.D., 1985. An evaluation of some physiological and biochemical methods as an aid to the characterization of species of *Penicillium* subsection *Fasciculata* // J. Gen. Microbiol. V. 131. № 8. P. 1887–1895.
- Brun S., Madrid H., Gerrits Van Den Ende B., Andersen B., Marinach-Patrice C. et al., 2013. Multilocus phylogeny and MALDI-TOF analysis of the plant pathogenic species *Alternaria dauci* and relatives // Fungal Biol. V. 117. № 1. P. 32–40.
- Cai L., Hyde K.D., Taylor P.W.J., Weir B., Waller J. et al., 2009. A polyphasic approach for studying *Colleotrichum* // Fungal Divers. V. 39. P. 183–204.
- Cai L., Giraud T., Zhang N., Begerow D., Cai G., Shivas R.G., 2011. The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi // Fungal Divers. V. 50. № 1. P. 121–133.
- Caugant D.A., Sandven P., 1993. Epidemiological analysis of *Candida albicans* strains by multilocus enzyme electrophoresis // J. Clin. Microbiol. V. 31. № 2. P. 215–220.
- Chang S., Carneiro-Leão M.P., Oliveira B.F., de, Souza-Motta C., Lima N. et al., 2016. Polyphasic approach including MALDI-TOF MS/MS analysis for identification and characterisation of *Fusarium verticillioides* in Brazilian corn kernels // Toxins. V. 8. № 3. P. 54.
- Colwell R.R., 1970. Polyphasic Taxonomy of the genus *Vibrio*: Numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species // J. Bacteriol. V. 104. № 1. P. 410–433.
- Cserhati M., Xiao P., Guda C., 2019. K-mer-based motif analysis in insect species across *Anopheles*, *Drosophila*, and *Glossina* genera and its application to species classification // Comput. Math. Methods Med. V. 2019. P. 4259479.
- Dayrat B., 2005. Towards integrative taxonomy // Biol. J. Linn. Soc. V. 85. P. 407–415.

- Dickinson D.N., La Duc M.T., Satomi M., Winefordner J.D., Powell D.H., Venkateswaran K., 2004. MALDI-TOFMS compared with other polyphasic taxonomy approaches for the identification and classification of *Bacillus pumilus* spores // J. Microbiol. Methods. V. 58. № 1. P. 1–12.
- Dobzhansky T., 1937. Genetics and the Origin of Species. N.-Y.: Columbia Univ. Press. 364 p.
- Domon B., Aebersold R., 2006. Mass spectrometry and protein analysis // Science. V. 312. № 5771. P. 212–217.
- Erst A.S., Sukhorukov A.P., Mitrenina E.Yu., Skaptsov M.V. et al., 2020. An integrative taxonomic approach reveals a new species of *Eranthis* (Ranunculaceae) in North Asia // PhytoKeys. V. 140. P. 75–100.
- Figueras M.J., Beaz-Hidalgo R., Hossain M.J., Liles M.R., 2014. Taxonomic affiliation of new genomes should be verified using average nucleotide identity and multilocus phylogenetic analysis // Genome Announc. V. 2. № 6. P. e00927-14.
- Fraga M.E., Santana D.M.N., Gatti M.J., Direito G.M., Cavaglieri L.R., Rosa C.A.R., 2008. Characterization of *Aspergillus* species based on fatty acid profiles // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. V. 103. № 6. P. 540–544.
- Frisvad J., 2011. Rationale for a polyphasic approach in the identification of mycotoxigenic fungi // Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed / Ed. De Saeger S. Oxford: Woodhead Publishing. P. 279–297.
- Frisvad J., 2015. Taxonomy, chemodiversity, and chemocconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species // Front. Microbiol. V. 5. P. 773.
- Frisvad J.C., Samson R.A., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins // Stud. Mycol. V. 49. P. 1–174.
- Frisvad J.C., Larsen T.O., Vries R., de Meijer M., Houbraken J. et al., 2007. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins // Stud. Mycol. V. 59. P. 31–37.
- Fujita M.K., Leaché A.D., Burbrink F.T., McGuire J.A., Moritz C., 2012. Coalescent based species delimitation in an integrative taxonomy // Trends Ecol. Evol. V. 27. № 9. P. 480–488.
- Gadanhó M., Sampaio J.P., 2002. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. glutinis* sensu stricto and *Rh. dairenensis* comb. nov. // FEMS Yeast Res. V. 2. № 1. P. 47–58.
- Gadanhó M., Sampaio J.P., Spencer-Martins I., 2001. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporeidium*: *R. azoricum* sp. nov. // Can. J. Microbiol. V. 47. № 3. P. 213–221.
- Gams W., Bissett J., 2002. Morphology and identification of *Trichoderma* // *Trichoderma* and *Gliocladium*. V. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics / Eds Christian P.K., Gary E.H. L.: Taylor and Francis. P. 3–31.
- Gannibal Ph.B., Yli-Mattila T., 2007. Morphological and UP-PCR analyses and design of a PCR assay for differentiation of *Alternaria infectoria* species-group // Микол. и фитопатол. Т. 41. № 4. С. 313–322.
- Gillis M., Vandamme P., Vos P., de Swings J., Kersters K., 2001. Polyphasic taxonomy // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Eds Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. N.-Y.: Springer. P. 43–48.
- Hey J., 2006. On the failure of modern species concepts // Trends Ecol. Evol. V. 21. № 8. P. 447–450.
- Hibbett D., Abarenkov K., Kõljalg U., Öpik M., Chai B. et al., 2016. Sequence-based classification and identification of Fungi // Mycologia. V. 108. № 6. P. 1049–1068.
- Houbraken J., Due M., Varga J., Meijer M., Frisvad J.C., Samson R.A., 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Usti* // Stud. Mycol. V. 59. P. 107–128.
- Ichinoe M., Kurata H., Sugiura Y., Ueno Y., 1983. Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone // Appl. Environ. Microbiol. V. 46. № 6. P. 1364–1369.
- Inderbitzin P., Harkness J., Turgeon B.J., Berbee M.L., 2005. Lateral transfer of mating system in *Stemphylium* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 102. № 32. P. 11390–11395.
- Inderbitzin P., Shoemaker R.A., O'Neil N.R., Turgeon B.G., Berbee M.L., 2006. Systematics and mating systems of two fungal pathogens of opium poppy: The heterothallic *Crivellia papaveracea* with a *Brachycladium penicillatum* asexual state and homothallic species with a *Brachycladium papaveris* asexual state // Can. J. Bot. V. 84. № 8. P. 1304–1326.
- Koopman W.J.M., 2005. Phylogenetic signal in AFLP data sets // Syst. Biol. V. 54. № 2. P. 197–217.
- Landvik S., Egger K.N., Schumacher T., 1997. Towards a subordinal classification of the Pezizales (Ascomycota): Phylogenetic analysis of SSU rDNA sequences // Nord. J. Bot. V. 17. № 4. P. 403–418.
- Leal J.A., Prieto A., Bernabé M., Hawksworth D.L., 2010. An assessment of fungal wall heteromannans as a phylogenetically informative character in ascomycetes // FEMS Microbiol. Rev. V. 34. № 6. P. 986–1014.
- Liou G.-Y., Chen S.-R., Wei Y.-H., Lee F.-L., Fu H.-M. et al., 2007. Polyphasic approach to the taxonomy of the *Rhizopus stolonifer* group // Mycol. Res. V. 111. № 2. P. 196–203.
- Ludwig W., Schleifer K.H., 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis // FEMS Microbiol. Rev. V. 15. № 2–3. P. 155–173.
- Maidak B.L., Olsen G.J., Larsen N., Overbeek R., McCaughey M.J., Woese C.R., 1996. The Ribosomal Database Project (RDP) // Nucleic Acids Res. V. 24. № 1. P. 82–85.
- Matheny P.B., Liu Y.J., Ammirati J.F., Hall B.D., 2002. Using RPBI sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (Inocybe, Agaricales) // Am. J. Bot. V. 89. № 4. P. 688–698.
- Matute D.R., Sepúlveda V.E., 2019. Fungal species boundaries in the genomics era // Fungal Genet. Biol. V. 131. P. 103249.
- Mayden R.L., 1997. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem // Species: The Units of Biodiversity / Eds Claridge M.F., Dawah H.A., Wilson M.R. L.: Chapman and Hall. P. 381–424.
- Mayr E., 1963. Animal Species and Evolution. Cambridge: Harvard Univ. Press. 797 p.

- Micales J.A., Bonde M.R., Peterson G.L., 1992. Isozyme analysis in fungal taxonomy and molecular genetics // Handbook of Applied Mycology. V. 4: Fungal Biotechnology / Eds Arora D.K., Elander R.P., Mukerji K.G. N.-Y.: Marcel Dekker Inc. P. 57–79.
- Müller M.M., Kantola R., Kitunen V., 1994. Combining sterol and fatty acid profiles for the characterization of fungi // Mycol. Res. V. 98. № 6. P. 593–603.
- Nichols R., 2001. Gene trees and species trees are not the same // Trends Ecol. Evol. V. 16. № 7. P. 358–364.
- Pinel C., Arlotto M., Issartel J.-P., Berger F., Pelloux H. et al., 2011. Comparative proteomic profiles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus lentulus* strains by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) // BMC Microbiol. V. 11. P. 172.
- Poursafar A., Ghosta Y., Orina A.S., Gannibal Ph.B., Javan-Nikkhah M., Lawrence D.P., 2018. Taxonomic study on *Alternaria* sections *Infectoriae* and *Pseudoalternaria* associated with black (sooty) head mold of wheat and barley in Iran // Mycol. Prog. V. 17. № 3. P. 343–356.
- Prakash O., Verma M., Sharma P., Kumar M., Kumari K. et al., 2007. Polyphasic approach of bacterial classification – An overview of recent advances // Indian J. Microbiol. V. 47. № 2. P. 98–108.
- Prihastuti H., Cai L., Chen H., McKenzie E.H.C., Hyde K.D., 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand // Fungal Divers. V. 39. P. 89–109.
- Putignani L., Del Chierico F., Onori M., Mancinelli L., Argentieri M. et al., 2011. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi // Mol. Biosyst. V. 7. № 3. P. 620–629.
- Queiroz K., de, 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations // Endless Forms: Species and Speciation / Eds Howard D.J., Berlocher S.H. N.-Y.: Oxford Univ. Press. P. 57–75.
- Queiroz K., de, 2007. Species concepts and species delimitation // Syst. Biol. V. 56. № 6. P. 879–886.
- Ranque S., Normand A.-C., Cassagne C., Murat J.-B., Bourgeois N. et al., 2014. MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory // Mycoses. V. 57. № 3. P. 135–140.
- Rokas A., Payne G., Fedorova N.D., Baker S.E., Machida M. et al., 2007. What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*? // Stud. Mycol. V. 59. P. 11–17.
- Rosa E.A., Pereira C.V., Rosa R.T., Höfling J.F., 2000. Grouping oral *Candida* species by multilocus enzyme electrophoresis // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 50. № 3. P. 1343–1349.
- Rouhan G., Gaudeul M., 2014. Plant taxonomy: A historical perspective, current challenges, and perspectives // Molecular Plant Taxonomy. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). V. 1115 / Ed. Besse P. Totowa: Humana Press. P. 1–37.
- Samson R.A., Varga J., 2007. *Aspergillus* systematics in the genomic era // Stud. Mycol. V. 59. P. 1–203.
- Santos C., Paterson R.R., Venâncio A., Lima N., 2010. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // J. Appl. Microbiol. V. 108. № 2. P. 375–385.
- Schlick-Steiner B.C., Steiner F.M., Seifert B., Stauffer C., Christian E., Crozier R.H., 2010. Integrative taxonomy: A multisource approach to exploring biodiversity // Annu. Rev. Entomol. V. 55. P. 421–438.
- Schmidt H., Adler A., Holst-Jensen A., Klemsdal S.S., Logrieco A. et al., 2004. An integrated taxonomic study of *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* based on the use of composite datasets // Int. J. Food Microbiol. V. 95. № 3. P. 341–349.
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L. et al., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 109. № 16. P. 6241–6246.
- Seifert K.A., 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi // Mol. Ecol. Resour. V. 9. № s1. P. 83–89.
- Sharma G., Shenoy B.D., 2016. *Colletotrichum* systematics: Past, present and prospects // Mycosphere. V. 7. № 8. P. 1093–1102.
- Shiosaki R.K., Okada K., Gusmão N.B., de, Nigam P., Falcão P.S. et al., 2001. Biochemical markers in taxonomy of the genus *Cunninghamella* // Rev. Iberoam. Micol. V. 18. P. 123–127.
- Silva-Hanlin D.M.W., Hanlin R.T., 1999. Small subunit ribosomal RNA gene phylogeny of several loculoascomycetes and its taxonomic implications // Mycol. Res. V. 103. № 2. P. 153–160.
- Simmons E.G., 2007. *Alternaria*: An Identification Manual. Ser. 6. Utrecht: CBS Biodiversity. 775 p.
- Smedsgaard J., Nielsen J., 2005. Metabolite profiling of fungi and yeast: From phenotype to metabolome by MS and informatics // J. Exp. Bot. V. 56. № 410. P. 273–286.
- Stadler M., Tichy H.-V., Katsiou E., Hellwig V., 2003. Chemotaxonomy of *Pochonia* and other conidial fungi with *Verticillium*-like anamorphs // Mycol. Prog. V. 2. № 2. P. 95–122.
- Stadler M., Læssøe T., Fournier J., Decock C., Schmieschek B. et al., 2014. A polyphasic taxonomy of *Daldinia* (Xylariaceae) // Stud. Mycol. V. 77. P. 1–143.
- Stahl P.D., Klug M.J., 1996. Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition // Appl. Environ. Microbiol. V. 62. № 11. P. 4136–4146.
- Sutton B.C., 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* // *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control / Eds Bailey J.A., Jeger M.J. Wallingford: CAB International. P. 1–26.
- Tanabe Y., Saikawa M., Watanabe M.M., Sugiyama J., 2004. Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1 α and RPB1 sequences: Limitations and utility of alternative markers to rDNA // Mol. Phylogenet. Evol. V. 30. P. 438–449.
- Taylor J.W., Fisher M.C., 2003. Fungal multilocus sequence typing – it's not just for bacteria // Curr. Opin. Microbiol. V. 6. № 4. P. 351–356.
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M. et al., 2000. Phylogenetic species recognition and spe-

- cies concepts in fungi // *Fungal Genet. Biol.* V. 31. № 1. P. 21–32.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., Vos P., de Kersters K., Swings J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics // *Microbiol. Rev.* V. 60. № 2. P. 407–438.
- Varga J., Frisvad J.C., Samson R.A., 2010. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Sparsi* // *IMA Fungus*. V. 1. № 2. P. 187–195.
- Waller J.M., Bridge P.D., Black B., Hakiza G., 1993. Characterization of the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae* sp. nov. // *Mycol. Res.* V. 97. № 8. P. 989–994.
- Weete J.D., Abril M., Blackwell M., 2010. Phylogenetic distribution of fungal sterols // *PLoS One*. V. 5. № 5. P. e10899.
- Zain M.E., 2010. Biochemical markers in taxonomy of the genus *Fusarium* // *Res. J. Agric. Biol. Sci.* V. 6. № 1. P. 1–7.

Polyphasic approach in fungal taxonomy

Ph. B. Gannibal*

*All-Russian Institute of Plant Protection
Podbelskogo, 3, Saint Petersburg, 196608 Russia
e-mail: fgannibal@vizr.spb.ru

Taxonomy of micromycetes continuously experienced a number of specific difficulties. Advances in molecular phylogeny were an important achievement for fungal taxonomy during the last two decades. Usage of multilocus sequencing in combination with phylogenetic analysis is technically convenient and methodologically reasonable for species delimitation. They work within the frames of evolutionary species concept which is the most popular in mycology now and obviously will save popularity in the nearest future. The most proper tool to define species boundaries is phylogenetic species recognition. However, this well-developed approach sometimes gives no opportunity to clearly recover biodiversity structure and then perform easy taxa identification. Arising in the 1970th in bacteriology, polyphasic taxonomy became in 2000th fairly popular in mycology. Nowadays it is comprehended as consensus taxonomy performing definition of taxa extension based on comparative analysis of all available characters. This approach is not absolutely new. Similar concepts have been utilized in mycology and other biological disciplines earlier. In the article we review the modern practice of polyphasic approach application in the mycology. A special part of the review is dedicated to diversity of features available for a mycologist and to appropriateness of their usage in taxonomy in particular within the scope of the polyphasic approach. This approach is reasonable to apply when phylogenetic recognition gives no satisfactory results, for instance, in case of insufficient number of sequenced loci or in case of analysis of recently diverged species. Furthermore, polyphasic approach is proper for making the taxonomic hypotheses to test them with phylogenetic methods and to create appropriate sample strain sets.