

МИХАЙЛЮК Т.І.¹ (<https://orcid.org/0000-0002-7769-2848>)

ВИНОГРАДОВА О.М.¹ (<https://orcid.org/0000-0002-9243-8231>)

ГРОМАКОВА А.Б.² (<https://orcid.org/0000-0001-8007-9174>)

ГЛАЗЕР К.³ (<https://orcid.org/0000-0002-5962-3603>)

КАРСТЕН У.³ (<https://orcid.org/0000-0002-2955-0757>)

¹ Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,
вул. Терещенківська, 2, Київ 01601, Україна

² Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, кафедра ботаніки та екології
рослин, Майдан Свободи, 4, Харків 61022, Україна

³ Університет м. Росток, Інститут біологічних наук, відділ прикладної екології і фікології,
Альберт Ейнштейн штрассе, 3, Росток D-18057, Німеччина
t-mikhailyuk@ukr.net

НОВІ ДЛЯ ФЛОРИ УКРАЇНИ ТАКСОНИ НАЗЕМНИХ ЦІАНОБАКТЕРІЙ, ВИВЧЕНІ З ВИКОРИСТАННЯМ КОМПЛЕКСНОГО ПІДХОДУ

Реферат. В наземних місцезростаннях декількох локацій Харківської обл. (біологічні ґрунтові кірочки) та околицях м. Києва (обростання стіни) знайдені морфотипи нитчастих ціанобактерій, ідентифікація яких за морфологічними ключами не дала результатів. Молекулярно-філогенетичний аналіз за послідовностями гена 16S рРНК показав, що виділені штами є представниками нових для флори України родів, описаних в останнє десятиліття з використанням комплексного підходу. Це *Wilmottia* Strunecký, Elster et Komárek, *Pycnacronema* M.D. Martins et Branco, *Myxacorys* Pietrasiak et J.R. Johansen та *Tildeniella* Mai, J.R. Johansen et Pietrasiak. Для видової ідентифікації були використані результати морфологічних досліджень, а також аналізу р-відстаней, нуклеотидної послідовності ділянки 16S-23S ITS і вторинної структури найбільш інфор-

Надійшла до редакції 03.07.2023. Після доопрацювання 11.07.2023. Підписана до друку 30.08.2023.
Опублікована 20.09.2023

Ц и т у в а н н я : Михайлюк Т.І., Виноградова О.М., Громакова А.Б., Глазер К., Карстен У. 2023. Нові для флори України таксони наземних ціанобактерій, вивчені з використанням комплексного підходу. *Альгологія*. 33(3): 185–212. <https://doi.org/10.15407/alg33.03.185>

мативних її спіралей. Показано, що оригінальні штами належать до видів *Wilmottia murrayi* (W. et G.S. West) Strunecký, Elster et Komárek, *Pycnacronema* cf. *caatingensis* M.D. Martins et Branco, *Tildeniella* cf. *torsiva* Mai, J.R. Johansen et Pietrasiak та *Myxacorys* sp. Наведено описи нових для України видів, ілюстровані мікрофотографіями, та деталі їхнього поширення.

Ключові слова: cyanobacteria, *Myxacorys*, *Pycnacronema*, *Tildeniella*, *Wilmottia*, 16S рРНК, 16S-23S ITS, вторинна структура

Вступ

На сучасному етапі розвитку систематики ціанобактерій важливу роль відіграє застосування комплексного підходу, що поєднує вивчення генетичних, цитоморфологічних та екологічних ознак (Komárek, 2016). Завдяки цьому підходу значно розширилися наші знання щодо генетичного й таксономічного різноманіття ціанобактерій і зроблені важливі кроки на шляху до створення їхньої філогенетичної системи (Hauer et al., 2014; Komárek et al., 2014, 2020; Mai et al., 2018; Johansen et al., 2021; Bertold et al., 2022; Strunecký et al., 2023). Численні дослідження представників поліфілетичних родів дозволили виділити з їхнього складу монофілетичні клади та описати нові для науки таксони (Chatchawan et al., 2012; Strunecký et al., 2013, 2014, 2017; Mühlsteinová et al., 2014; Pietrasiak et al., 2019, 2021; Skouřpý et al., 2022).

Дослідження терестріальних ціанобактерій України з використанням комплексного підходу дозволило суттєво поповнити відомості щодо різноманіття ціанофлори та зробити низку флористичних знахідок. Зокрема, були виявлені представники родів *Oculatella* Zammit, Billi et Albertano, *Nodosilinea* Perkerson et Casamatta, *Roholtiella* Bohunická, Pietrasiak et Johansen, *Timaviella* Sciuto et Moro, *Tenebriella* Hauerová, Hauer et Kaštovský та рідкісного пантропічного роду *Brasilonema* Fiore et al. (Mikhailyuk et al., 2016, 2018; Romanenko et al., 2020; Mikhailyuk, Vinogradova, 2022).

Продовження цього напрямку досліджень приносить все нові цікаві знахідки. Так, з біологічних ґрунтових кірочок, відібраних в декількох локаціях Харківської обл. та околицях м. Києва, були виділені штами ціанобактерій, комплексне вивчення яких засвідчило, що вони є представниками нещодавно описаних родів *Tildeniella* Mai, J.R. Johansen et Pietrasiak (*Oculatellales*, *Oculatellaceae*), *Myxacorys* Pietrasiak et J.R. Johansen (*Leptolyngbiales*, *Leptolyngbyaceae*), *Pycnacronema* M.D. Martins et Branco та *Wilmottia* Strunecký, Elster et Komárek (*Coleofasciculales*, *Wilmottiaceae*). Нижче представлені результати цього дослідження.

Матеріали та методи

Місця дослідження, відбір проб. Штами для дослідження були виділені з біологічних ґрунтових кірочок, відібраних у місцях виходу крейдових відслонень на схилах із розрідженим рослинним покривом (Харківська обл.) та на стіні зруйнованого доту часів Другої світової війни в НПП «Голосіївський» у Києві (табл. 1). Місця збору розташовані в лісостеповій зоні України.

Таблиця 1. **Коротка характеристика місць відбору зразків, з яких було виділено досліджені штами ціанобактерій**

Штам	Місцезнаходження	GPS-координати	Дата відбору	Опис місця відбору зразка
Vin 4-4-2	Харківська обл., Куп'янський р-н, окол. с. Петро-Іванівка	49°55'09" N 37°40'45" E	28.05. 2012	Крейдові схили на правому березі р. Верхня Дворічна, водоростево-ціанобактеріальні розростання на ґрунті з мохами
Mel 10-33-1	Харківська обл., Куп'янський р-н, окол. смт Дворічна. Ботанічний заказник «Коробочкине»	49°50'08" N 37°40'31" E	28.05. 2012	Крейдові схили на правому березі р. Оскіл, лишайниково-ціанобактеріальні кірочки на ґрунті
Vin 5-3-8	Харківська обл., Ізюмський р-н, с. Протопопівка. Геологічний заказник «Протопопівський»	49°14'33" N 36°54'48" E	20.05. 2014	Кірочки на схилі балки, вкритому степовою рослинністю
Les 4-8	м. Київ, Голосіївський НПП, заказник «Лісники»	50°17'29" N 30°34'13" E	22.03.2015	Дот № 107 Київського укріпленого району часів Другої світової війни, водоростеве розростання на бетонній стіні, у дубово-сосновому лісі

Макроскопічні кірочки темного, майже чорного кольору, площею до 10 см² відбирали з поверхні ґрунту та моховин, темно-зелені розростання на бетонній стіні зішкрібали скальпелем. Матеріал зберігали в паперових пакетах.

Виділення штамів, умови культивування, мікроскопічні дослідження. Зразки вивчали шляхом прямого мікроскопіювання та методом культур. Для отримання накопичувальних культур фрагменти кірочок або розростань висівали на поверхню агаризованого середовища Болда (1N BBM) (Bischoff, Bold, 1963). Культури вирощували в стандартних лабораторних умовах: з 12-годинним чергуванням світлової та темної фаз і освітленням $25 \text{ мкмоль фотонів} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ при температурі $+20 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Дослідження накопичувальних культур починали з другого тижня культивування. Альгологічно чисті культури виділяли з використанням стереомікроскопу Olympus ZS40 (Токіо, Японія) і очищали від інших організмів шляхом багаторазових пересівів. Очищені штами ціанобактерій культивували на середовищі BG-11 (Stanier et al., 1971) при умовах, вказаних вище. Мікроскопічне вивчення зразків, а також виділених культур здійснювали за допомогою світлових мікроскопів Olympus BX51 та BX53 з диференційною інтерференційною оптикою Номарського (DIC). Мікрофотографії отримані з використанням камер ColorView II і Olympus UC30, приєднаних до мікроскопів, і опрацьовані за допомогою програмного забезпечення analySIS і cellSens Entry.

Екстракція ДНК, ПЦР, секвенування, філогенетичний аналіз. Геномна ДНК штамів ціанобактерій була екстрагована за допомогою спеціального набору NucleoSpin Plant II mini kit (Macherey Nagel, Düren, Germany), з використанням інструкції виробника. Нуклеотидні послідовності гена 16S рРНК разом з 16S-23S ITS регіоном (від 1700 до 2300 основ) ампліфіковані за допомогою праймерів SSU-4-forw та ptLSU C-D-rev (Marin et al., 2005) в термоциклері T gradient Thermoblock (Biometra, Germany). ПЦР включала 30 циклів: початкова денатурація – 3 хв при $96 \text{ }^{\circ}\text{C}$, циклічна денатурація, що повторюється, – 1 хв при $96 \text{ }^{\circ}\text{C}$, відпал – 2 хв при $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$, і подовження фрагменту – 3 хв при $68 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Потім слідувало фінальне подовження фрагменту – 7 хв при $68 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Продукти ПЦР були очищені та секвеновані на комерційній основі компанією GATC Sequencing Services (Eurofins Genomics Germany, Ebersberg, Germany), з використанням праймерів SSU-4-forw, Wil 6, Wil 12, Wil 14, Wil 5, Wil 9, Wil 16 та ptLSU C-D-rev (Wilmotte et al., 1993; Marin et al., 2005). Отримані послідовності зібрані та відредаговані за допомогою програмного забезпечення Geneious (версія 8.1.8; Biomatters). Вони депоновані в GenBank під інвентарними номерами OR288164-OR288167.

Для порівняння з чотирма оригінальними штамми було використано 68 нуклеотидних послідовностей представників порядків *Oculatellales*, *Coleofasciculales*, *Leptolyngbyales*, *Nostocales*, *Chroococcales* та ін. з бази даних GenBank (NCBI). Множинне вирівнювання нуклеотидних

послідовностей для філогенії за геном 16S рРНК здійснювали з використанням веб сервера Mafft (версія 7, Katoh, Standley, 2013) з наступним редагуванням вручну в програмі BioEdit (версія 7.2). Вирівнювання для філогенії по ділянці 16S-23S ITS виконували вручну в BioEdit, з урахуванням вторинної структури РНК цього регіону. Еволюційна модель, яка найбільше підходить до баз даних, що використовуються, була вибрана на основі найменшого індексу AIC (Akaike, 1974), вирахованого в програмі MEGA (версія 6, Tamura et al., 2013). Філогенетичні дерева побудовані в програмі MrBayes 3.2.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003) з використанням еволюційної моделі GTR+G+I з 5,000,000 генерацій. Два прогони з чотирьох марковських ланцюгів по методу Монте-Карло виконані одночасно, з деревами, що відбиралися кожні 500 генерацій. Розділення частот між прогонами в кінці обрахунку було нижче 0.01. Дерева, відібрані до того, як показник правдоподібності досяг насичення, були пізніше відбраковані. Надійність топології дерев підтверджена аналізом максимальної правдоподібності (ML), виконаним у програмі GARLI 2.1. Моделі вторинної структури РНК ділянки 16S-23S ITS оригінальних штамів *Русnacronema* та *Tildeniella* побудовані з урахуванням попередньо опублікованих даних (Mai et al., 2018; Martins et al., 2019). Спіралі були згорнуті за допомогою програми Mfold (Zuker, 2003), а їхня візуалізація здійснена в програмі Pseudoviewer (Byun, Han, 2009). Генетичні розбіжності між штамми та видами одного роду (р-відстань) вираховані в програмі MEGA (версія 6, Tamura et al., 2013).

Результати та обговорення

Результати морфологічного дослідження виділених штамів не дали однозначної відповіді стосовно їхньої видової чи навіть родової приналежності, за виключенням київського штаму, який морфологічно відповідав опису роду *Wilmottia*. Філогенетичний аналіз за ділянкою нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК підтвердив це припущення, а також засвідчив приналежність інших штамів до родів *Мухacorys*, *Tildeniella* та *Русnacronema* (рис. 1). Всі ці роди є новими для флори України, тому розглянемо їх детальніше.

Wilmottia Strunecký, Elster et Komárek

Встановлений у 2011 р. за результатами молекулярного дослідження низки переважно антарктичних штамів, морфологічно подібних до *Phormidium murrayi* (W. et G.S. West) Anagnostidis et Komárek, до яких приєдналися два штами з Бразилії та один з Нової Зеландії.

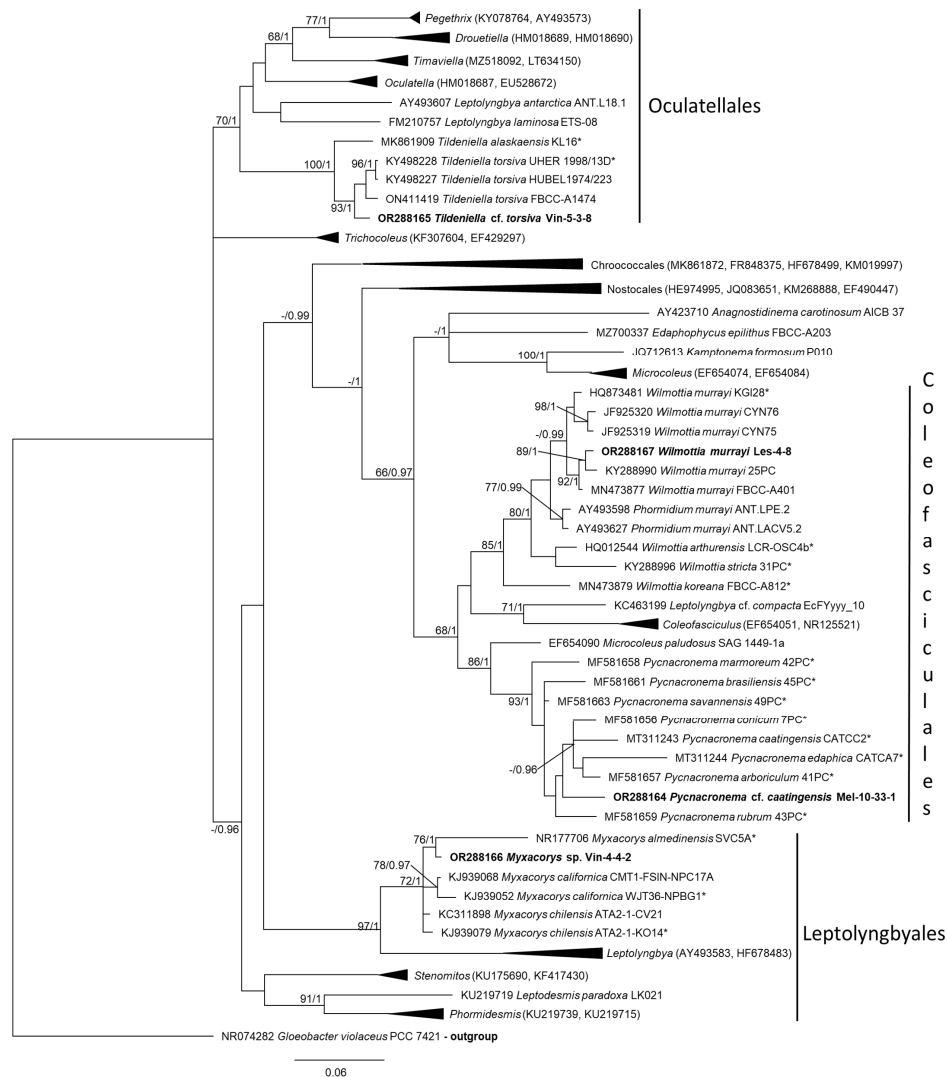


Рис. 1. Молекулярна філогенія Cyanobacteria (*Coleofasciculales*, *Leptolyngbyales* та *Oculatellales*) на основі порівняння нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК. Філогенетичні дерева на рис. 1 і 3 побудовані Байєсівським методом зі вказівкою значень Байєсівської вірогідності (Bayesian Posterior Probabilities (PP) та підтримки бутстрепа при аналізі максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood bootstrap support (BP)). Показані тільки значення PP вище 0.8 та BP вище 50%. Оригінальні послідовності штамів відмічені напівжирним шрифтом, автентичні штами – зірочкою

Цей вид, описаний більше ста років тому з Антарктиди як *Lyngbya murrayi* W. et G.S. West (1911). Anagnostidis і Komárek (1988) віднесли його до групи V роду *Phormidium* у своєму перегляді *Oscillatories*. Досить часто вид наводили з водойм (у т. ч. солоних) та ґрунтів полярних регіонів (Komárek, Anagnostidis, 2005). Новий рід деякий час мав у своєму складі лише типовий вид, *W. murrayi* (W. et G.S. West) Strunecký, Elster et 190

Komárek, який також був молекулярно підтверджений з водних та аерофітних місцезростань півдня Бразилії (Machado-de-Lima et al., 2017) та Республіки Корея (Lee et al., 2020).

Наразі включає чотири види: *W. murrayi*, *W. stricta* Machado-de-Lima, Martins et Branco, *W. koreana* N. Lee, Y. Seo, J. Ki et O. Lee та *W. arthurensis* (Novis et Visnovsky) Radzi et Merican (Guiry, Guiry, 2023). Всі види роду морфологічно дуже подібні, але достовірно відрізняються між собою філогенетично. За даними Radzi et al. (2021), генетичні розбіжності (р-відстань) між штамами *W. murrayi* та штамами інших видів *Wilmottia* були в межах 1,8–3%, тоді як усередині клади *W. murrayi* значення р-відстаней не перевищували 1,4%. Таксономічно рід наразі відносять до родини *Wilmottiaceae* порядку *Coleofasciculales* (Strunecký et al., 2023).

Із аерофітного розростання на бетонній стіні зруйнованого доту Київського укріпленого району часів Другої світової війни, у лісі в околицях м. Києва ми виділили *Wilmottia*-подібну ціанобактерію, що за морфологічними ознаками відповідала опису *W. murrayi*. Філогенетичний аналіз за послідовностями гена 16S рРНК підтвердив це припущення. Нижче наводимо опис нашої знахідки.

***Wilmottia murrayi* (W. et G.S. West) Strunecký, Elster et Komárek**

Тонкі розростання на агарі утворюють більш-менш паралельно розташовані, іноді переплетені, нитки оливково-зеленого кольору, 3,2–4,5 (5,0) мкм шир. Піхви тонкі, міцні, безбарвні, гомогенні, відкриті на кінцях (рис. 2, А). Трихоми прямі або злегка вигнуті, не перетягнуті або ледь перетягнуті біля клітинних перегородок, 2,5–3,8 мкм шир. (рис. 2, В). Клітини квадратної форми або довші, іноді коротші за ширину, (2,0)2,4–4,0 мкм завд., блідо-сині з зеленуватим відтінком, однорідним дрібно-зернистим вмістом, часто з розсіяними великими гранулами (рис. 2, С); клітинні перегородки іноді нечіткі. Тилакоїди пристінні. Термінальні клітини закруглені на кінцях.

Досліджений нами матеріал відрізняється від опису виду, наведеного Strunecký et al. (2011), відсутністю пучечків ниток до 50 мкм завш., оточених безбарвним, дуже тонким і розпливчастим слизом, меншою шириною трихомів та помітно меншим діапазоном довжини клітин (табл. 2). У той же час, пучечки ниток не були відмічені також у матеріалі інших авторів, які дослідили комплексним методом штами *W. murrayi* та навели їхній опис (Machado-de-Lima et al., 2017; Radzi et al., 2021).

Натомість, утворення пучечків було відмічено у *W. stricta* (Machado-de-Lima et al., 2017). За шириною трихомів київський штам подібний до двох штамів *W. murrayi* з острова Сігні (Південні Оркнейські острови, морська Антарктида), але довжина клітин у цих штамів суттєво відрізнялася (див. табл. 2).

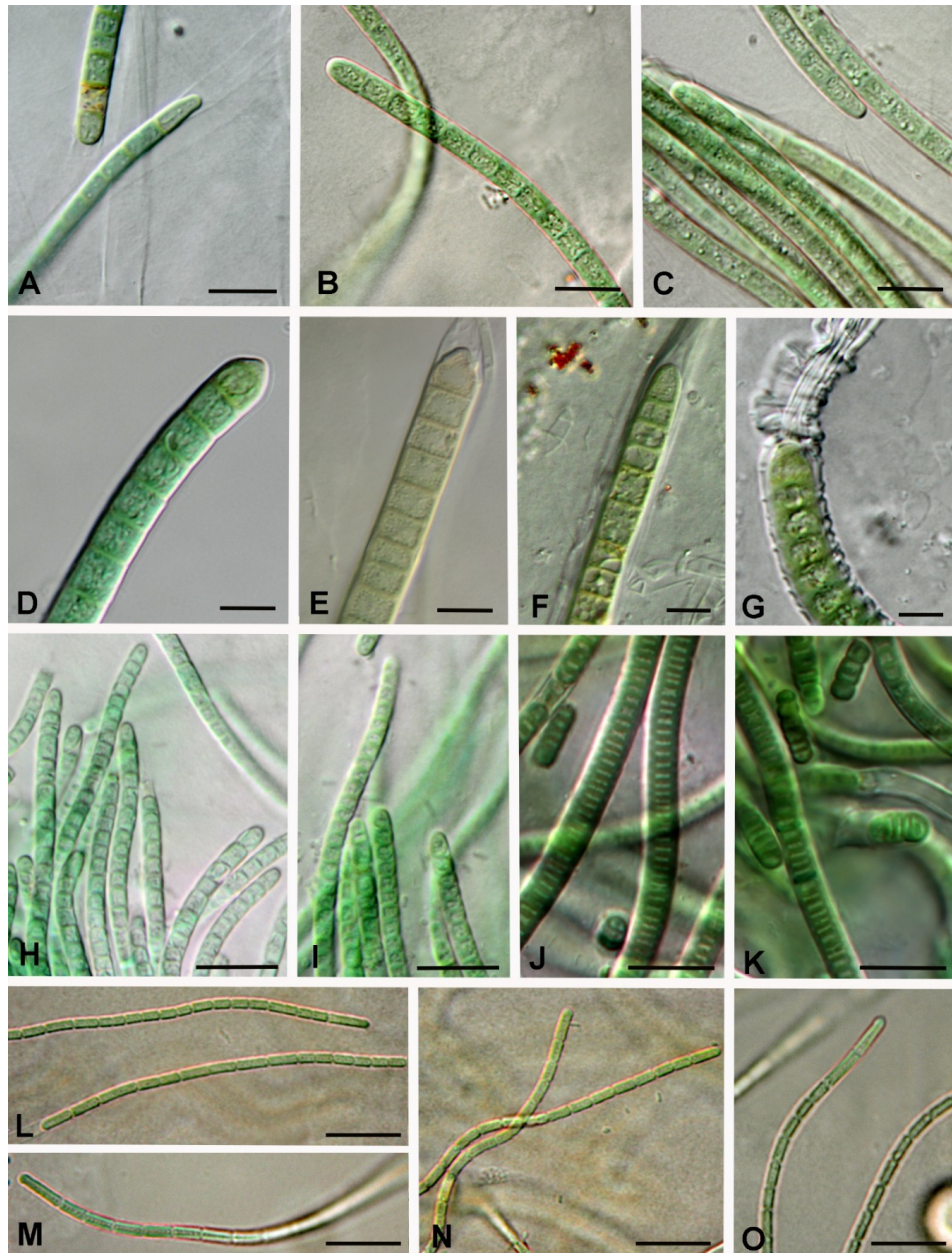


Рис. 2. Мікрофотографії нових таксонів флори України: A–C – *Wilmottia murrayi*, D–G – *Руснаcroneta* cf. *caatingensis*, H–K – *Мухacorys* sp., L–O – *Tildeniella* cf. *torsiva*. Шкала – 10 мкм

Аналіз наведених у табл. 2 розмірних ознак дозволяє припустити, що ширина трихомів та довжина клітин *W. murrayi* коливаються в більших межах, ніж зазначалося в описі типового виду роду *Wilmottia* (Strunecký et al., 2011).

Таблиця 2. Порівняльна таблиця морфологічних ознак штамів *Wilmottia murrayi*

Ознака	За даними					Оригіналь- ний штам Les 4-8
	Strunecký et al., 2011	Machado-de- Lima et al., 2017	Lee et al., 2020*	Radzi et al., 2021		
				USMFM S1	USMFMS2	
Утворення пучечків	Так	Ні	Ні	Ні	Ні	Ні
Ширина ниток, мкм	Дані відсутні	Дані відсутні	3,8–5,2	Дані відсутні	Дані відсутні	3,2–4,5 (5,0)
Піхви безбар- вні	Тонкі, міцні, відкриті на кінцях	Міцні, тонкі, факультати- вні, прилеглі до трихому	Дані відсутні	Тонкі, міцні	Тонкі, міцні	Тонкі, міцні, відкриті на кінцях
Трихоми	Непере- тягнуті або слабо перетяг- нуті	Слабо перетягнуті	Неперетяг- нуті або слабо перетягнуті	Чітко пере- тягнуті	Непере- тягнуті	Непере- тягнуті або слабо перетяг- нуті
Ширинат рихомів, мкм	(3,1)3,6– 5,4	3,2–5,6	3,7–5,1	(1,5) 2,5–4,4	(2,5)3,0– 4,0(4,5)	2,5–3,8
Довжина клітин, мкм	(2,6)3,4– 7,2(11)	2,4–8,8	2,8–8,0	(1,2) 3,1–3,3	3,0–5,0 (5,6)	(2,0)2,4– 4,0
Кінцеві клітини	Округлі	Округло- конічні	Округлі	Округлі	Округло- конічні	Округлі

* Узагальнені показники досліджених штамів *W. murrayi*: FBCC-A399, FBCC-A400, FBCC-A401, FBCC-A402.

На філогенетичному дереві, побудованому за послідовністю гена 16S рРНК (див. рис. 1), київський штам приєднався до клади роду *Wilmottia*, розмістившись серед інших штамів *W. murrayi*. Розрахунок генетичної розбіжності (р-відстані) між оригінальним штамом та штамми *Wilmottia* (табл. 3) підтвердив приналежність київського матеріалу до виду *W. murrayi*: показники дивергенції з іншими штамми цього виду були в межах 0,4–1,1%, тоді як з іншими видами роду *Wilmottia* розходження складало 2,1–2,9%, що вище за достовірний поріг розрізнення видів у прокариот (Stackebrandt, Ebers, 2006; Kim et al., 2014). У виділеному нами

генетичному матеріалі був відсутній регіон 16S–23S ITS, та хоча він і використовується при розмежуванні видів роду *Wilmottia* (Lee et al., 2020), також надійним генетичним маркером визнано послідовність гена 16S рРНК (Radzi et al., 2021). Тому визначення матеріалу до рівня виду лише на його основі, у випадку роду *Wilmottia*, слід вважати прийнятним.

Таблиця 3. Генетичне розходження (р-відстань, %) послідовності гена 16S рРНК оригінального штаму із іншими штамами *Wilmottia murrayi*

№	Штам	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	OR288167 <i>W. murrayi</i> Les-4-8										
2	MN473877 <i>W. murrayi</i> FBCC-A401	0.4									
3	KY288990 <i>W. murrayi</i> 25PC	0.7	0.5								
4	JF925320 <i>W. murrayi</i> CYN76	0.8	0.8	1.1							
5	JF925319 <i>W. murrayi</i> CYN75	0.8	0.8	1.1	0						
6	HQ873481 <i>W. murrayi</i> KGI28*	0.8	0.8	1.1	0.6	0.6					
7	AY493598 <i>W. murrayii</i> ANT.LPE.2	1.1	1.1	1.4	0.9	0.9	0.7				
8	AY493627 <i>W. murrayii</i> ANT.LACV5.2	1.1	1.1	1.4	0.9	0.9	0.7	0			
9	HQ012544 <i>W. arthurensis</i> LCR-OSC4b*	2.1	1.9	2.2	2.3	2.3	2.1	1.7	1.7		
10	KY288996 <i>W. stricta</i> 31PC*	2.6	2.6	2.9	2.5	2.5	2.4	2.7	2.7	2.0	
11	MN473879 <i>W. koreana</i> FBCC-A812*	2.9	2.8	3.1	2.9	2.9	2.7	2.8	2.8	3.1	3.7

* – Автентичні штами.

Київська популяція *W. murrayi* розвивалася в умовах атмосферного зволоження на поверхні старої бетонної стіни в лісі. Загалом, це вид широкої екологічної амплітуди: у світі його знахідки охоплюють різноманітні середовища існування, як водні (від прісних до солоних), так і позаводні (едафон і аерофітон) (Komárek, Anagnostidis, 2005). Географія поширення цього виду дуже широка й охоплює полярні, помірні та

тропічні регіони. Найбільше відомостей про трапляння *W. murrayi* в Антарктиді, також вид знаходили в Новій Зеландії, Південній Америці (Аргентина, Бразилія) та Азії (Республіка Корея) (Strunecký et al., 2011; Machado-de-Lima et al., 2017; Lee et al., 2020; Radzi et al., 2021). Наше дослідження є першою морфологічно та молекулярно підтвердженою знахідкою цього виду в Європі.

***Rusnacronema* M.D. Martins et Branco**

Ще один представник родини *Wilmottiaceae* був описаний за результатами комплексного вивчення штамів ціанобактерій із *Phormidium*-подібною морфологією, виділених із аерофітних місцезростань Бразилії (Martins et al., 2019). Філогенетичний аналіз на основі послідовностей гена 16S рРНК показав, що вони формують високо підтримувану кладу родового рівня, в якій вирізняються шість видів. Ці результати були підтверджені мультилокусним аналізом послідовностей генів 16S рРНК, *groC1* і *rbcL*, а також консервативних ділянок вторинних структур регіону 16S-23S ITS. Автори описали рід *Rusnacronema*, основними морфологічними ознаками якого є циліндричні, не звужені до кінців, слабо перетягнуті або не перетягнуті трихоми 4,8–8 мкм завш. у тонких міцних безбарвних піхвах, з клітинами, довжина яких дорівнює, менша або більша за ширину. Кінцеві клітини округлі або округло-конічні, без каліптри, з потовщеною клітинною стінкою.

Одночасно було описано шість видів, що мають деякі морфологічні відмінності та близьку екологію: тип роду *P. brasiliensis* знайдений на стовбурах дерев та вологих скелях, *P. arboriculum* M.D. Martins et Branco, *P. marmoreum* M.D. Martins et Branco, *P. conicum* M.D. Martins et Branco та *P. rubrum* M.D. Martins et Branco – на стовбурах дерев, *P. savannensis* M.D. Martins, Machado-de-Lima et Branco виділений з ґрунтової кірочки. Пізніше з біологічних ґрунтових кірочок, відібраних у напівпустельних регіонах Бразилії, було виділено два штами, після комплексного вивчення яких було описано ще два види: *P. caatingensis* Machado-de-Lima et Branco та *P. edaphica* Machado-de-Lima et Branco (Machado-de-Lima et Branco, 2020). Останній вид відрізняється від інших представників роду *Rusnacronema* нитками, що містять багато трихомів у спільній піхві.

Із біологічної ґрунтової кірочки, відібраної на крейдяних відслоненнях в околицях селища Двурічна Харківської обл., були виділені морфотипи, подібні до представників роду *Phormidium sensu lato*. Проте на філогенетичному дереві за геном 16S рРНК (див. рис. 1) український штам розмістився всередині кладу роду *Rusnacronema* з найближче розташо-

ваними штамми видів *P. caatingensis*, *P. conicum*, *P. arboriculum* та *P. edaphica*. Нижче подаємо опис нашої знахідки.

Розростання у вигляді розпростертих оливково-зелених плівок на агарі, утворених тісно переплетеними нитками 7–11 мкм шир. Піхви безбарвні, спочатку відсутні або тонкі, гомогенні (рис. 2, *D*, *E*), у зрілих нитках міцні, ширші за трихом (рис. 2, *F*, *G*). Трихоми ізоплярні, циліндричні по всій довжині, неперетягнуті або слабо перетягнуті біля клітинних перегородок, не звужені до кінців, 4,2–6,5 мкм шир. Клітини 3,5–6,5 мкм завд., переважно ізодіаметричні або їх довжина менша чи більша за ширину. Вміст клітин дрібнозернистий, іноді з розсіяними гранулами. Кінцеві клітини округлі або округло-конічні, без каліптри, з потовщеною клітинною стінкою.

Наш матеріал повністю відповідає морфологічним характеристикам роду *Русnacronema*, проте має певні відмінності від відомих видів. Зокрема, український штам відрізняється від усіх видів, описаних Martins et al. (2019), розширеними піхвами, ширина яких помітно більша за ширину трихомів. Подібні піхви можна побачити на фотографіях *P. caatingensis* (Machado-de-Lima, Branco, 2020, Fig. 1, a, b). Про наявність розширених піхов у цього виду свідчить також різниця в розмірному діапазоні ширини ниток (7–11 мкм) та трихомів (5,5–8,0 мкм), однак у описі *P. caatingensis* це не відзначено. Морфологічне порівняння оригінального штаму з описами *P. caatingensis* та видами, з якими наш матеріал групується на філогенетичному дереві за геном 16S рРНК (табл. 4), показало, що від *P. arboriculum* та *P. conicum* український штам відрізняється більшим діапазоном ширини ниток та меншим – ширини трихомів і коротшими клітинами. *Русnacronema edaphica* характеризується розташуванням кількох трихомів у спільній піхві й коротшими клітинами, а *P. caatingensis* має дещо ширші трихоми.

Детальніший філогенетичний аналіз за геном 16S рРНК разом із регіоном 16S–23S ITS відомих штамів *Русnacronema* (рис. 3) показав, що український штам має найбільшу подібність з *P. caatingensis* та *P. arboriculum*. Аналіз вторинної структури РНК інформативних спіралей регіону 16S–23S ITS – D1-D1', Vох-В та V3 ділянки, українського штаму та автентичних штамів близьких до нього видів показав більшу подібність загальної конфігурації спіралей штаму Mel 10-33-1 та *P. caatingensis* (рис. 4).

Таблиця 4. Порівняльна таблиця обраних видів *Pycnacronema* та оригінального штаму

Ознака	<i>P. arboriculum</i>	<i>P. conicum</i>	<i>P. edaphica</i>	<i>P. caatingensis</i>	Mel 10-33-1
Ширина ниток, мкм	7–8	7.2–8.8	8–32 (кілька трихомів у піхві)	7–11	7–11
Піхви безбарвні	Міцні, тонкі, гомогенні	Міцні, тонкі, гомогенні	Міцні, тонкі, гомогенні	Міцні, тонкі, гомогенні	Тонкі, гомогенні, у зрілих нитках міцні, ширші за трихом
Трихоми	Слабо перетягнуті	Неперетягнуті або слабо перетягнуті	Перетягнуті	Перетягнуті	Неперетягнуті або слабо перетягнуті
Ширина трихомів, мкм	6.5–7.5	6.4–7.6	4.8–6.4	5.5–8.0	4.2–6.5
Довжина клітин, мкм	4.0–7.5	4.0–9.9	3.2–8.8	3.0–7.5	3.5–6.5

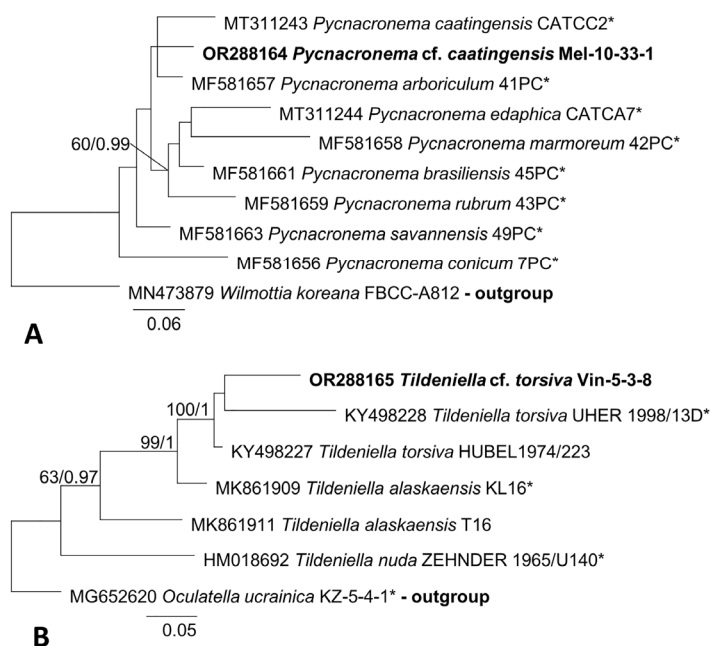


Рис. 3. Молекулярна філогенія родів *Pycnacronema* (A) та *Tildeniella* (B) за геном 16S рРНК та ділянкою 16S–23S ITS. При аналізі сиквенсів роду *Tildeniella* через високу варіабельність регіону 16S–23S ITS використані лише ділянки інформативних спіралей

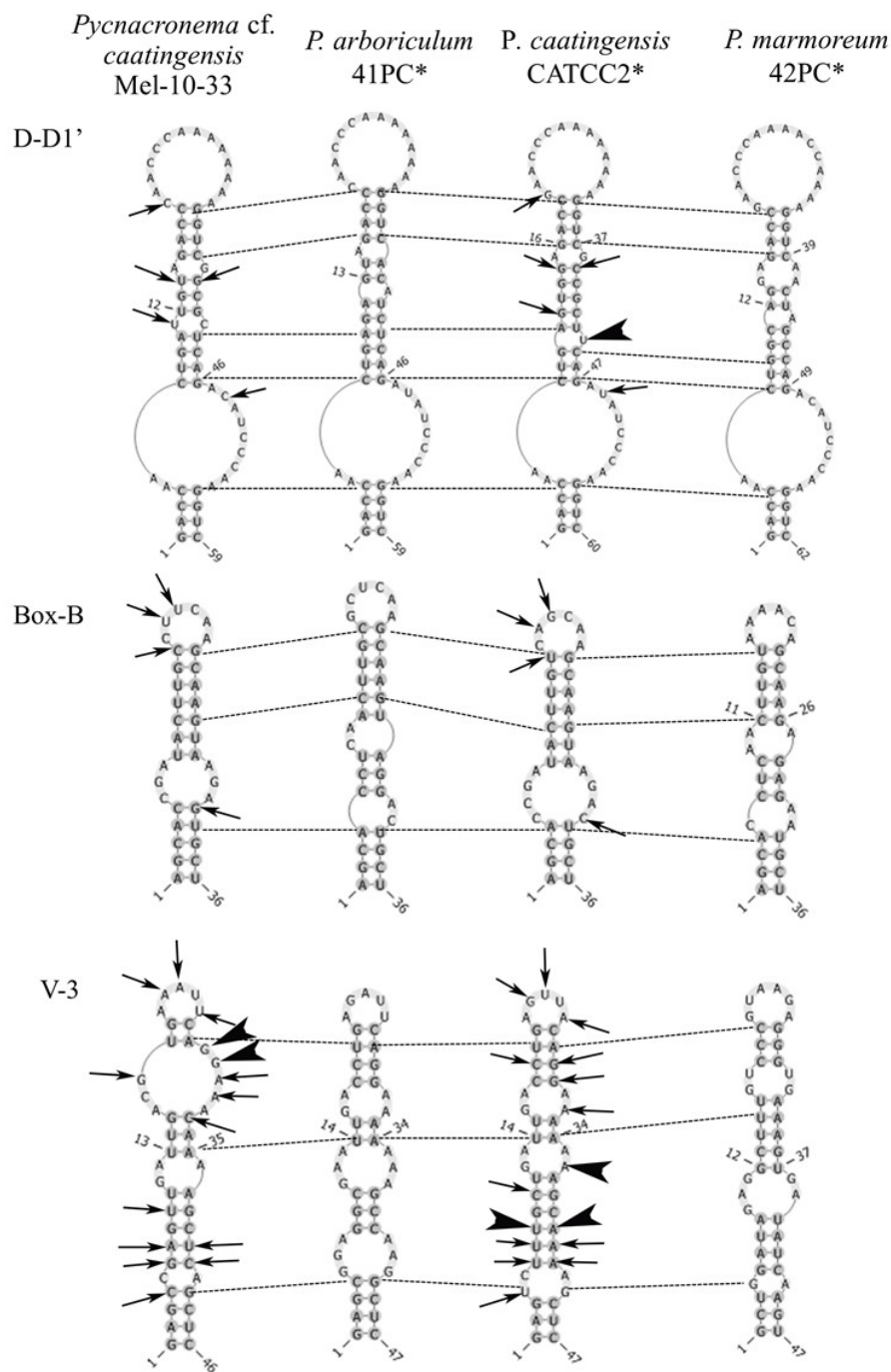


Рис. 4. Вторинна структура РНК основних інформативних спіралей регіону 16S–23S ITS оригінального штаму та найбільш подібних штамів *Русnacronema*. Гомологічні ділянки відмічені пунктирними лініями. Стрілки та головки стрілок вказують на заміну нуклеотидів (стрілки) та вставки нуклеотидів (головки стрілок) у найбільш подібних видів

Проте детальніший розгляд вторинних структур вказує на значну кількість відмінностей між цими штамми, серед яких заміни (у т. ч. в консервативних спарених регіонах) та вставки/видалення нуклеотидів. За результатами морфологічного й молекулярного вивчення штаму Mel 10-33-1, впевнено ідентифікувати його не вдалося, проте простежується явна подібність українського матеріалу з *P. caatingensis*. Схожість деяких унікальних морфологічних ознак (розширені піхви, відзначені на мікрофотографіях *P. caatingensis* (Machado-de-Lima, Branco, 2020, 1, a, b) та екологічна подібність (мешкання в біологічних ґрунтових кірочках) дозволили ідентифікувати український штам як *Русnacroneta* cf. *caatingensis*.

***Мухacorys* Pietrasiak et J.R. Johansen**

Рід описаний за результатами комплексного вивчення великої добірки морфологічно подібних штамів, виділених із пустельних ґрунтів Північної та Південної Америки (Pietrasiak et al., 2019). Морфологічно ці штами відповідають опису широко поширеного ґрунтового виду *Pseudophormidium hollerbachianum* (Elenkin) Anagnostidis, також добре відомого в Україні (Kostikov et al., 2001; Vinogradova, Mikhailyuk, 2009; Mikhailyuk et al., 2018). З появою даних молекулярно-філогенетичних досліджень виникли сумніви стосовно таксономічної приналежності штамів цього виду, оскільки на філогенетичних деревах, побудованих за геном 16S рРНК, штами під такою назвою розмішувались у кладі порядку *Synechococcales*, а не *Oscillatoriales* (Osorio-Santos et al., 2014; Mikhailyuk et al., 2019). Ґрунтове дослідження Pietrasiak et al. (2019) поставило крапку в цьому питанні.

Рід *Мухacorys* має морфологічні відмінності від усіх близько-споріднених клад ціанобактерій: це схильність мати один або два трихоми в піхві та формувати виразний слизовий ковпачок на кінцях ниток. За сучасною філогенетичною системою (Strunecký et al., 2023) рід належить до родини *Leptolyngbyaceae* порядку *Leptolyngbyales*. Було описано два види – *Мухacorys chilensis* Pietrasiak et J.R. Johansen (типовий вид роду) та *M. californica* Pietrasiak et J.R. Johansen. Вони є морфологічно криптичними. *Мухacorys chilensis* відрізняється від *M. californica* наявністю помітного слизового ковпачка в зрілих культурах, нечастою присутністю інволюційних клітин, а також довшими клітинами; діагностичною ознакою для їх розрізнення є чотири розбіжні нуклеотиди у спіралі 21 гена 16S рРНК (Pietrasiak et al., 2019). У тому ж році із застосуванням комплексного підходу було описано ще один вид роду – *M. almediensis* Tiago et Portugal

(Soares et al., 2019). Штам було виділено з аерофітних біоплівки, що розвивалися на вапняковій стіні собору в Іспанії. Крім філогенетичних відмінностей за геном 16S рРНК, 16S–23S ITS регіоном та місцезростанням, цей вид відрізняється від двох інших за морфологічними ознаками: чітко перетягнутими трихомами та меншими розмірами клітин.

Вивчаючи біологічні ґрунтові кірочки в районі поширення крейдианих відслонень у Харківській обл. України, ми виявили тонконитчасту гомоцитну ціанобактерію, що за морфологічними ознаками відповідала опису *P. hollerbachianum*. За результатами філогенетичного аналізу послідовностей гена 16S рРНК виділений нами штам приєднався до штамів роду *Muxacorys*, розташувавшись досить відокремлено між відомими видами даного роду (див. рис. 1). Ймовірно, для його визначення до видового рівня необхідне проведення поглибленого аналізу регіону 16S–23S ITS та його вторинної структури, проте послідовність цієї ділянки оригінального штаму отримати не вдалося. Український штам може також являти собою новий вид роду *Muxacorys*, для опису якого потрібні детальніші дослідження. Нижче наводимо його опис, позначивши дану ціанобактерію як *Muxacorys* sp.

Розростання на агарі розпростерте, оливково-зеленого кольору, утворене переплутаними, часто вигнутими нитками, що поширюються від центру. Нитки в молодих культурах без піхов (рис. 2, *H, I*), пізніше – з одним або зрідка з двома трихомами в піхвах, 3,2–4,1 мкм шир. Внаслідок розриву піхви іноді спостерігається утворення псевдогілок. Піхви безбарвні, м'які, тонкі, в зрілих трихомах чіткі, досить міцні (рис. 2, *J, K*). Трихоми іноді скручені всередині піхов, слабо перетягнуті біля клітинних перегородок, з меристематичними зонами, з некридіями (рис. 2, *K*), 1,8–2,8 мкм шир. Довжина клітин 1,2–2,1(3,0) мкм, зазвичай менше ширини, іноді більша за неї. Апікальні клітини від округлої до округло-конічної форми (рис. 2, *H, I*). Термінальний слизовий ковпачок не спостерігався.

Представники роду *Muxacorys* досить подібні морфологічно (табл. 5). Досліджений нами матеріал відрізняється від *M. chilensis* та *M. californica* дещо ширшими нитками, неподовженими кінцевими клітинами та відсутністю слизового ковпачка на кінцях ниток. Термінальний слизовий ковпачок є діагностичною ознакою роду, яка відбита в його назві (Pietrasiak et al., 2019). Однак ця ознака чітко виражена лише у *M. chilensis*; у *M. californica* слизовий ковпачок слабо виражений, а у першоописі *M. almediensis* згадка про нього відсутня. Вірогідно, це факультативна ознака, поява якої може залежати від умов культивування.

Таблиця 5. Порівняльна таблиця видів *Muxacorys* та оригінального штаму

Ознака	<i>M. chilensis</i>	<i>M. californica</i>	<i>M. almediensis</i>	Vin 4-4-2
Ширина ниток, мкм	(1,6) 2–3,2	1,6–3,6	Дані відсутні	3,2–4,1
Піхви безбарвні	М'які, тонкі, містять 1–2 трихоми	М'які, тонкі, містять 1–2 трихоми	Тонкі, віддалені від трихомів, закриті на кінцях	М'які, тонкі, в зрілих трихомах чіткі, досить міцні
Трихоми	Слабо перетягнуті	Слабо перетягнуті	Чітко перетягнуті	Слабо перетягнуті
Ширина трихомів, мкм	1,6–3,0	1,6–3,2 (3,4)	0,7–1,5	1,8–2,8
Довжина клітин, мкм	1–3	1,2–5	1,3–1,7	1,2–2,1(3,0)
Вміст клітин	Гранульований	Гранульований	Дані відсутні	Гранульований
Кінцеві клітини	Видовжені, до 5,4 мкм завд.	Видовжені, до 4 мкм завд.	Округлі до злегка конічних	Округлі до злегка конічних
Місце зростання	Біологічна ґрунтова кірка на дрібному піску в пустелі	Біологічна ґрунтова кірочка на крупнозернистому піщаному ґрунті	На поверхні вапнякових стін собору в Іспанії	Біологічна ґрунтова кірочка з мохами

***Tildeniella* Mai, J.R. Johansen et Pietrasiak**

Описаний за результатами таксономічного дослідження з використанням комплексного підходу великої вибірки тонконитчастих штамів, що морфологічно відповідали *Leptolyngbyaceae* sensu lato (Mai et al., 2018). Філогенетичний аналіз за генами 16S рРНК і *groC1* показав, що частина досліджених штамів формує сестринську до *Leptolyngbyaceae* кладу, яка містить різноманітні субаерофітні таксони з вологих скель і ґрунтів. Ця кладка була описана як нова родина *Oculatellaceae* з типовим родом *Oculatella* та 6 новими родами, в т. ч. родом *Tildeniella*. Автори зазначили, що нові роди та види *Oculatellaceae* були виділені на основі комбінації порогових значень 16S рРНК (94,5% для родів та 98,7% для

видів), конфігурації, послідовності та (для видів) довжини вторинних структур 16S–23S ITS, а також морфологічних ознак. У випадку роду *Tildeniella* основний акцент зроблено на філогенетичній відмінності від усіх інших родів *Oculatellaceae*, оскільки морфологічно його представники не мають яскравих діагностичних ознак.

Наразі відомо три види *Tildeniella*. Штами двох з них виділені з субаерофітних місцезростань Європи. *Tildeniella torsiva* (типовий вид роду) та *T. nuda* молекулярно дуже подібні, маючи за геном 16S рРНК подібність 99,1%; розбіжності у вторинних структурах регіону 16S–23S ITS стосуються D1-D1' та Box В спіралей, а також наявності чи відсутності спіралі V2 (Mai et al., 2018). Третій вид, *T. alaskaensis*, описано пізніше за трьома штамами, виділеними з перифітону прісних водойм на Алясці. За геном 16S рРНК штами з Аляски мали подібність з *T. torsiva* 95,1–98,1%, а з *T. nuda* – лише 91,3%, вторинні структури не досліджували (Strunecky et al., 2020).

Із біологічної ґрунтової кірочки, що розвивалася на схилі зі степовою рослинністю на крейдяних відслоненнях, було виділено штамп, що морфологічно нагадував представника роду *Leptolyngbya sensu lato*, проте не відповідав опису жодного виду. Його особливістю було те, що у зрілих культурах розростання на агарі мали характерний буруватий відтінок і складалися з дуже тонких викривлено переплєтених ниток. Філогенетичний аналіз послідовностей гена 16S рРНК показав, що наш штамп приєднався до клади роду *Tildeniella*, розмістившись поряд зі штамами *T. torsiva* (див. рис. 1). Проте морфологічно він має деякі відмінності від даного виду. Опис нашої знахідки подано нижче.

Розростання у вигляді плівок на агарі утворені різноманітно викривленими та переплутаними нитками, які в молодому віці яскраво-синьо-зелені, а з віком стають оливково-зеленими з буруватим відтінком. Нитки 1,4–1,7 мкм шир., в молодих культурах не мають піхів. Піхви безбарвні, тонкі, часто непомітні. Трихоми прямі або вигнуті, іноді спіральньо закручені (рис. 2, *L–O*), 1,2–1,4 мкм шир., слабо перетягнуті біля клітинних перегородок, до кінців не звужені. Вміст клітин однорідний. Довжина клітин 2,0–3,5(4,2) мкм, часто в 2–3 рази більша за ширину. Кінцеві клітини витягнуті, 3,8–5,5 мкм завд., округлі до округло-конічних, часто з потовщенням на кінчику клітини (рис. 2, *M, O*). Гормогонії та некридії відсутні.

Таблиця 6. Порівняльна таблиця видів *Tildeniella* та оригінального штаму

Ознака	<i>T. torsiva</i>	<i>T. nuda</i>	<i>T. alaskaensis</i>	Vin 5-3-8
Форма ниток	Прямі, вигнуті, іноді спірально закручені	Прямі, вигнуті	Неправильно вигнуті	Прямі, вигнуті, іноді спірально закручені
Несправжнє галуження	Іноді у зрілих нитках	Відсутнє	Відсутнє	Іноді у зрілих нитках
Ширина ниток, мкм	1,7–2,5	1,0–1,4	1,0–2,2	1,4–1,7
Піхви безбарвні	Тонкі, до 0,7 мкм шир., часто непомітні	Тонкі, міцні, часто відсутні	Тонкі, міцні	Тонкі, часто непомітні
Трихоми	Слабо перетягнуті	Чітко перетягнуті	Не перетягнуті	Слабо перетягнуті
Ширина трихомів, мкм	1,4–1,9	1,0–1,2	1,1–1,6	1,2–1,4
Довжина клітин, мкм	1,5–2,7	2,0–4,3(5,1)	1,6–3,0	2,0–3,5(4,2)
Вміст клітин	Однорідний	Однорідний, іноді з дрібними гранулами	Однорідний	Однорідний
Кінцеві клітини	Округлі	Циліндрично-округлі, інколи апікально роздуті	Округлі	Витягнуті, 3,8–5,5 мкм завд., округлі до округло-конічних, часто з потовщенням на кінчику клітини
Місцезростання	Аерофітно на вапняку, Національний парк «Словацький рай», Словачія	На вологій кам'яній стіні, Швейцарія	В перифітоні гляціальних водойм, Аляска	Ґрунтова кірочка на схилі (крейдяні відслонення) зі степовою рослинністю, Україна

Порівняння морфологічних ознак нашого штаму з відомими видами *Tildeniella* (табл. 6) засвідчило певні відмінності. Від усіх трьох видів наш матеріал відрізняється формою, довжиною кінцевих клітин та екологією. Від *T. nuda* та *T. alaskaensis* – ще й факультативною спіральною закрученістю ниток та наявністю несправжнього галуження. Додатково, від *T. nuda* – більшою шириною ниток та трихомів і слабо вираженою перетягнутістю останніх, від *T. alaskaensis* – наявністю перетяжок біля клітинних перегородок. Від *T. torsiva* український штам відрізняється меншою шириною ниток та трихомів, а також більшою довжиною клітин.

На філогенетичному дереві, побудованому за результатами аналізу нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК та регіону 16S–23S ITS (рис. 3, В), оригінальний штам приєднався до клади, утвореної штамами *T. torsiva*. Натомість, аналіз вторинної структури 16S–23S ITS виявив відмінності між оригінальним та опублікованими штамами *T. torsiva* (рис. 5). Так, спіраль D1-D1' досить подібна у різних штамів і має відмінності з оригінальним штамом лише у верхній частині (дві заміни нуклеотидів у спарених ділянках) та петлях. А от спіралі Box В та V3 оригінального штаму суттєво відрізняються від уже відомих штамів *T. torsiva* (див. рис. 5) як за довжиною та конфігурацією, так і за послідовністю нуклеотидів. Гомологічні ділянки простежуються лише в нижній частині спіралей, проте й вони містять численні заміни нуклеотидів та вставки/видалення. Верхні частини цих спіралей кардинально різняться між собою (див. рис. 5).

Таким чином, досліджений нами штам *Tildeniella*, хоча й приєднується до опублікованих штамів виду *T. torsiva* за результатами філогенетичних аналізів, має деякі морфологічні особливості та відмінності у вторинних структурах регіону 16S–23S ITS. Тому ми вважаємо його видову ідентифікацію попередньою та позначаємо як *Tildeniella* cf. *torsiva*.

Отже, проведене дослідження штамів ціанобактерій з використанням комплексного підходу дало досить неоднозначні результати, незважаючи на кілька методів, в т. ч. новітніх, застосованих до їхньої ідентифікації. З чотирьох вивчених штамів лише один вдалося ідентифікувати до видового рівня без суттєвих сумнівів – *Wilmottia murrayi*. Два штами попередньо ідентифіковані до видів, найближчих до цих представників – *Pseudonocardia* cf. *caatingensis* та *Tildeniella* cf. *torsiva*, один з них було визначено лише до рівня роду – *Mycobacterium* sp. Така ситуація пояснюється, з одного боку, ймовірною недостатністю отриманих нами генетичних даних (відсутність регіону 16S–23S ITS у випадку *Mycobacterium* sp.), з іншого – відсутністю потрібної інформації в Генбанку. Це свідчить про те, що генетичне різно-

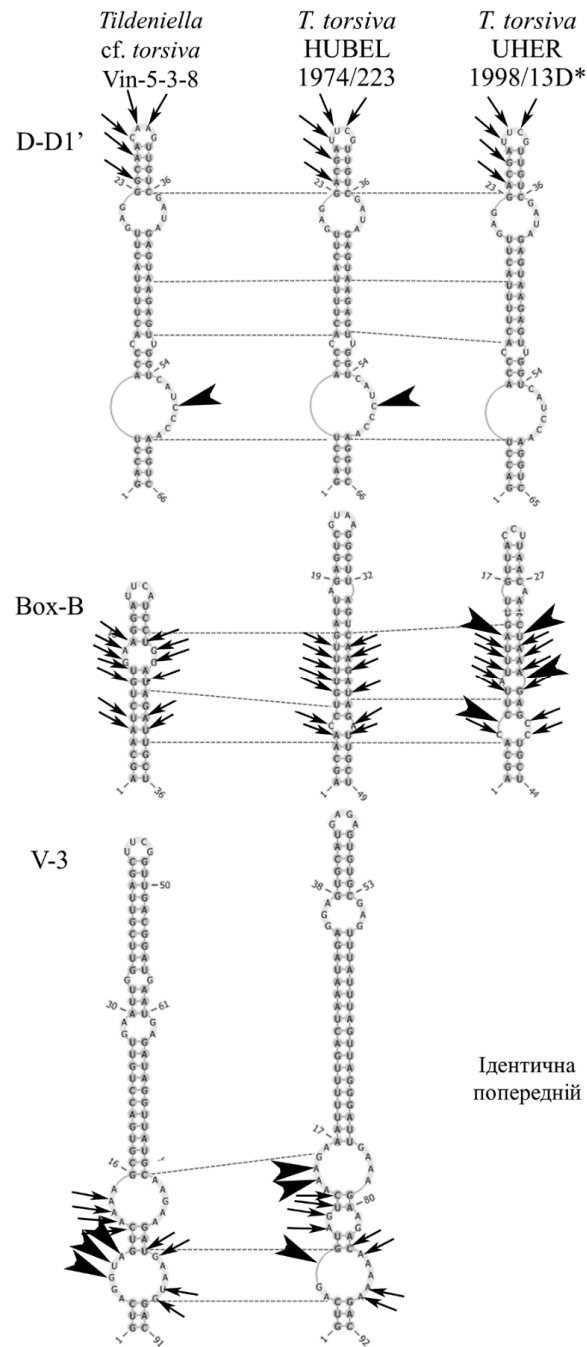


Рис. 5. Вторинна структура РНК основних інформативних спіралей регіону 16S–23S ITS оригінального штаму та найбільш подібних штамів *Tildeniella*. Гомологічні ділянки відмічені пунктирними лініями. Стрілки та головки стрілок вказують на заміну нуклеотидів (стрілки) та вставки нуклеотидів (головки стрілок) у найбільш подібних видів. Відміни наведені лише для гомологічних ділянок регіону 16S–23S ITS

маніття ціанобактерій, незважаючи на активні дослідження останніх років, вивчено дуже слабо. Зокрема, це стосується насамперед криптичного різноманіття, що у випадку ціанобактерій є дійсно високим. Саме тому штами з України, що не були залучені до проведених таксономічних ревізій родів *Rusnacronea*, *Muxacorys* та *Tildeniella*, ймовірно, є новими видами, які можуть бути описані при умові їхнього поглибленого вивчення. Схожа ситуація спостерігалася при вивченні представників роду *Oculatella* з Казантипського заповідника, які не вдалося визначити до видового рівня та які пізніше були нами описані як два нових види (Mikhailyuk et al., 2016; Vinogradova et al., 2017).

Проте ідентифікація до рівня роду для всіх чотирьох представників є безсумнівною та підтвердженою як морфологічними, так і молекулярними даними. Застосований генетичний маркер (послідовність гена 16S рРНК) є надійним засобом для розмежування родів у ціанопрокаріот. Завдяки йому вдалося отримати нові дані щодо поширення чотирьох згаданих родів у межах України, для території якої вони не наводилися. В той же час ідентифікація ціанобактерій до видового рівня донині є дискусійним і непростим питанням, яке можливо прояснити при наявності більшого обсягу інформації щодо їхнього генетичного різноманіття на недостатньо вивчених територіях та біотопах.

Висновки

1. Дослідження ціанобактерій деяких наземних місцезростань України (Харківська обл. та околиці м. Києва) з використанням комплексного підходу, заснованого на морфологічно-культуральному підході та молекулярно-філогенетичному вивченні окремих штамів, дозволило виявити представників чотирьох нових для флори родів: *Wilmottia*, *Rusnacronea* (*Coleofasciculales*), *Tildeniella* (*Oculatellales*) та *Muxacorys* (*Leptolynbyales*).

2. Застосування філогенетичного аналізу за послідовністю гена 16S рРНК дало змогу безсумнівно ідентифікувати досліджені штамми до рівня роду. Проте ідентифікація матеріалу до видового рівня, проведена на основі аналізу послідовності гена 16S рРНК та ділянки 16S-23S ITS і вторинної структури найбільш інформативних її спіралей, дала неоднозначні результати.

3. До видового рівня було визначено лише *Wilmottia murrayi*. Це перша морфологічно й молекулярно підтверджена знахідка даного виду в Європі.

4. Попереднє визначення було здійснено для *Русnacronema* cf. *caatingensis* і *Tildeniella* cf. *torsiva*, тоді як штам роду *Мухасорус* визначити точніше не вдалося.

5. Всі згадані представники є криптичними таксонами, ідентифікація яких лише класичними морфологічними методами є неможливою. Попередня ідентифікація низки представників до рівня виду, незважаючи на різноплановий підхід до їхнього визначення, є результатом наявності високого криптичного різноманіття серед ціанобактерій, яке на сьогодні залишається недослідженим.

6. Попередньо визначені види з території України, ймовірно, являють собою нові таксони, опис яких можливий у разі детальнішого вивчення.

Список літератури

- Anagnostidis K., Komárek J. 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. *Oscillatoriales*. *Arch. Hydrobiol.*, Suppl. 80(1–4). *Algol. Stud.* 50–53: 327–472.
- Bertold D.E., Lefler F.W., Laughinghouse H.D. 2022. Recognizing novel cyanobacterial diversity in marine benthic mats, with description of *Sirenicapillariaceae* fam. nov., two new genera, *Sirenicapillaria* gen. nov. and *Tigrinifilum* gen. nov., and seven new species. *Phycologia*. 61(2): 146–165. <https://doi.org/10.1080/00318884.2021.2006589>
- Bischoff H.W., Bold H.C. 1963. Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Univ. Texas Publ.* 6318: 1–95.
- Byun Y., Han K. 2009. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. *Bioinformatics*. 25(11): 1435–1437. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp252>
- Chatchawan T., Komárek J., Strunecký O., Smarda J., Peerapornpisal Y. 2012. *Oxynema*, a new genus separated from the genus *Phormidium* (Cyanophyta). *Cryptogam. Algol.* 33: 41–59. <https://doi.org/10.7872/crya.v33.iss1.2011.041>
- Guiry M.D., Guiry G.M. 2021. *AlgaeBase*. World. electron. publ. Nat. Univ. Ireland, Galway. Available from: <http://www.algaebase.org> (accessed 9 June 2023)
- Hauer T., Bohunická M., Johansen J.R., Mareš J., Berrendero-Gomez E. 2014. Reassessment of the cyanobacterial family *Microchaetaceae* and establishment of new families *Tolypothrichaceae* and *Godleyaceae*. *J. Phycol.* 50: 1089–1100. <https://doi.org/10.1111/jpy.12241>
- Johansen J.R., González-Resendiz L., Escobar-Sánchez V., Segal-Kischinevsky C., Martínez-Yerena J., Hernández-Sánchez J., Hernández-Pérez G., León-Tejera H. 2021. When will taxonomic saturation be achieved? A case study in *Nunduva* and *Kyrtuthrix* (Rivulariaceae, Cyanobacteria). *J. Phycol.* 57(6): 1699–1720. <https://doi.org/10.1111/jpy.12201>
- Katoh K., Standley D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30: 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>. Epub 2013 Jan 16.

- Kim M., Oh H.S., Park S.Ch., Chun J. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 346–351. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059774-0>
- Komárek J. 2016. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *Eur. J. Phycol.* 51(3): 346–353. <https://doi.org/10.1080/09670262.2016.1163738>
- Komárek J., Anagnostidis K. 2005. *Cyanoprokaryota. 2. Oscillatoriales. Süßwasserflora von Mitteleuropa*. München: Elsevier Spectr. Bd 19/2. 759 p.
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen J.R. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014 using a polyphasic approach. *Preslia*. 86(4): 295–235.
- Komárek J., Johansen J.R., Šmarda J., Strunečky O. 2020. Phylogeny and taxonomy of *Synechococcus*-like cyanobacteria. *Fottea*, Olomouc. 20(2): 171–191. <https://doi.org/10.5507/fot.2020.006>
- Kostikov I.Yu., Romanenko P.O., Demchenko E.M., Darienko T.M., Mikhailyuk T.I. Rybchinskiy O.V., Solonenko A.M. 2001. *The soil algae from Ukraine (history and methods of investigation, classification system, floristics)*. Kyiv: Phytosociocenter. 300 p. [Костіков І.Ю., Романенко П.О., Демченко Е.М., Дарієнко Т. М., Михайлюк Т.І., Рибчинський О.В., Солоненко А.М. 2001. *Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, конспект флори)*. Київ: Фітосоціоцентр. 300 с.].
- Lee A.-J., Seo Y., Ki J.-S., Lee O.-M. 2020. Morphology and molecular description of *Wilmottia koreana* sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria) isolated from the Republic of Korea. *Phytotaxa*. 447(4): 237–251. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.447.4.2>
- Mai T., Johansen J.R., Pietrasiak N., Bohunická M., Martin M.P. 2018. Revision of the *Synechococcales* (Cyanobacteria) through recognition of four families including *Oculatellaceae* fam. nov. and *Trichocoleaceae* fam. nov. and six new genera containing 14 species. *Phytotaxa*. 365(1): 1–59. doi.org/10.11646/phytotaxa.365.1.1
- Machado-de-Lima N.M., Martins M.D., Branco L.H.Z. 2017. Description of a tropical new species of *Wilmottia* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) and considerations about monophyly of *W. murrayi*. *Phytotaxa*. 307(1): 43–54. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.307.1.4>
- Machado de Lima N.M., Branco L.H.Z. 2020. Biological soil crusts: new genera and species of Cyanobacteria from Brazilian semi-arid regions. *Phytotaxa*. 470(4): 263–281. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.470.4.1>
- Marin B., Nowack E.C.M., Melkonian M. 2005. A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist*. 156: 425–432. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.09.001>
- Martins M.D., Machado-de-Lima N.M., Branco L.H.Z. 2019. Polyphasic approach using multilocus analyses supports the establishment of the new aerophytic cyanobacterial genus *Pynacronema* (Coleofasciculaceae, Oscillatoriales). *J. Phycol.* 55: 146–159. <https://doi.org/10.1111/jpy.12805>

- Mikhailyuk T.I., Vinogradova O.M. 2022. First record of the representative of genus *Tenebriella* (Cyanobacteria, Oscillatoriales) on Cape Kazantip (the Sea of Azov, Ukraine). *Algologia*. 32(3): 264–270. [Михайлюк Т.І., Виноградова О.М. 2022. Перша знахідка представника роду *Tenebriella* (Cyanobacteria, Oscillatoriales) на мисі Казантип (Азовське море, Україна). *Альгологія*. 32(3): 264–270]. <https://doi.org/10.15407/alg32.03.264>
- Mikhailyuk T.I., Vinogradova O.N., Glaser K., Karsten U. 2016. New taxa for the flora of Ukraine, in the context of modern approaches to taxonomy of Cyanoprokaryota/ Cyanobacteria. *Int. J. Algae*. 18(4): 301–320. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v18.i4.10>
- Mikhailyuk T.I., Vinogradova O., Glaser K., Demchenko E., Karsten U. 2018. Diversity of Terrestrial algae of Cape Kazantip (the Sea of Azov, Ukraine) and some remarks on their phylogeny and ecology. *Int. J. Algae*. 20(4): 313–338. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v20.i4.10>
- Mikhailyuk T., Glaser K., Tsarenko P., Demchenko E., Karsten U. 2019. Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast, in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria. *Eur. J. Phycol.* 54: 263–290. <https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1557257>
- Moreira-Fernandes V., Giraldo-Silva A., Roush D, Garcia-Pichel F. 2021. *Coleofasciculaceae*, a monophyletic home for the *Microcoleus steenstrupii* complex and other desiccation-tolerant filamentous cyanobacteria. *J. Phycol.* 57(5): 1563–1579. <https://doi.org/10.1111/JPY.13199>
- Mühlsteinová R., Johansen J.R., Pietrasiak N., Martin P.M. 2014. Polyphasic characterization of *Kastovskya adunca* gen. nov. et comb. nov. (Cyanobacteria: Oscillatoriales), from desert soils of the Atacama Desert, Chile. *Phytotaxa*. 163(4): 216–228. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.163.4.2>
- Osorio-Santos K., Pietrasiak N., Bohunická M., Miscoe L.H., Kováčik L., Martin M. P., Johansen J. R. 2014. Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification. *Eur. J. Phycol.* 49(4): 450–470. <https://doi.org/10.1080/09670262.2014.976843>
- Pietrasiak N., Osorio-Santos K., Shalygin S., Martin M.P., Johansen J.R. 2019. When is a lineage a species? A case study in *Myxocorys* gen. nov. (Synechococcales: Cyanobacteria) with the description of two new species from the Americas. *J. Phycol.* 55: 976–996. <https://doi.org/10.1111/jpy.12897>
- Pietrasiak N., Reeve Sh., Osorio-Santos K., Lipson D.A., Johansen J.R. 2021. *Trichotorquatus* gen. nov. – a new genus of soil cyanobacteria discovered from American drylands. *J. Phycol.* 57(3):886–902. <https://doi.org/10.1111/jpy.13147>
- Romanenko P.A., Vinogradova O.N., Romanenko E.A., Mikhailyuk T.I., Babenko L.M., Ivannikov R., Scherbak N.N. 2020. Morphological and molecular characterisation of the representative of *Brasilonema* (Scytonemataceae, Cyanoprokaryota) from the tropical greenhouse in Kyiv (Ukraine). *Algologia*. 30(2): 113–133. [Романенко П.А., Виноградова О.Н., Романенко Е.А., Михайлюк Т.І., Бабенко Л.М., Іванников Р., Щербак Н.Н. 2020. Морфологічна і молекулярна характеристика представителя *Brasilonema*

- Fiore et al. (*Scytonemataceae*, Cyanoprokaryota) из тропической оранжерии в Кieve. *Альгология*. 30(2): 113–133]. <https://doi.org/15.407/alg30.02.113>
- Radzi R., Merican F., Broady P., Convey P., Muangmai N., Omar W.M.W., Lavoué S. 2021. First record of the cyanobacterial genus *Wilmottia* (*Coleofasciculaceae*, *Oscillatoriales*) from the South Orkney Islands (Antarctica). *Algae*. 36(2): 111–121. <https://doi.org/10.4490/algae.2021.36.5.6>
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19: 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Skoupý S., Stanojković A., Pavlíková M., Poulickova A., Dvořák P. 2022. New cyanobacterial genus *Argonema* is hiding in soil crusts around the world. *Sci. Rep.* 12: 7203. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11288-4>
- Soares F., Tiago I., Trovão J., Coelho C., Mesquita N., Gil F., Catarino L., Cardoso S.M., Portugal A. 2019. Description of *Myxacorys almediensis* sp. nov. (*Synechococcales*, Cyanobacteria), isolated from limestone walls of the Old Cathedral of Coimbra, Portugal (UNESCO World Heritage Site). *Phytotaxa*. 419(1): 77–90. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.419.1.5>
- Stackebrandt E., Ebers J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today*. 33: 152–155.
- Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol. Rev.* 35: 171–205.
- Strunecký O., Elster J., Komárek J. 2011. Taxonomic revision of the freshwater cyanobacterium „*Phormidium*“ *murrayi* = *Wilmottia murrayi*. *Fottea*. 11(1): 57–71. <https://doi.org/10.5507/fot.2011.007>
- Strunecký O., Komárek J., Johansen J.R., Lukešová A., Elster J. 2013. Molecular and morphological criteria for revision of the genus *Microcoleus* and its relation to *Phormidium autumnale*, Cyanobacteria. *J. Phycol.* 49: 1167–1180. <https://doi.org/10.1111/jpy.12128>
- Strunecký O., Komárek J., Smarda J. 2014. *Kamptonea* (*Microcoleaceae*, Cyanobacteria), a new genus derived from the polyphyletic *Phormidium* on the basis of combined molecular and cytomorphological markers. *Preslia*. 86(3): 197–207.
- Strunecký O., Bohunická M., Johansen J.R., Čapková K., Raabová L., Dvořák P., Komárek J. 2017. A revision of the genus *Geitlerinema* and a description of the genus *Anagnostidinema* gen. nov. (*Oscillatoriothycidae*, Cyanobacteria). *Fottea*, Olomouc. 17(1): 114–126. <https://doi.org/10.5507/fot.2016.025>
- Strunecký O., Ivanova A.P., Mareš J. 2023. An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis. *J. Phycol.* 59(1): 12–51. <https://doi.org/10.1111/jpy.13304>
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. 2013. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Vinogradova O.N., Mikhailuk T.I. 2009. Algoflora of caves and grottoes of the National Nature Park "Podilsky Tovtry" (Ukraine). *Int. J. Algae*. 11(3): 809–819.

- <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v11.i3.80>
- Vinogradova O.N., Mikhailyuk T.I., Glaser K., Holzinger A., Karsten U. 2017. New species of *Oculatella* (*Synechococcales*, Cyanobacteria) from terrestrial habitats of Ukraine. *Ukr. Bot. J.* 74(4): 451–465. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj74.06.509>
- West W., West G.S. 1911. Pt VII. Freshwater algae. In: *British Antarctic Expedition 1907-9*. Vol. 1. Biology. Ed. J. Murray. Pp. 264–298.
- Wilmotte A., Van der Auwera G., De Wachter R. 1993. Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF') strain PCC75 18, and phylogenetic analysis. *FEBS Lett.* 317: 96–100. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81499-P](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81499-P)
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl. Acids Res.* 31: 3406–3416.

Mikhailyuk T.I.¹ (<https://orcid.org/0000-0002-7769-2848>)
Vinogradova O.M.¹ (<https://orcid.org/0000-0002-9243-8231>)
Gromakova A.B.² (<https://orcid.org/0000-0001-8007-9174>)
Glaser K.³ (<https://orcid.org/0000-0002-5962-3603>)
Karsten U.³ (<https://orcid.org/0000-0002-2955-0757>)

¹ M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine,
2 Tereshchenkivska Str., Kyiv 01601, Ukraine

² V.N. Karazin Kharkiv National University, Department of Botany and Plant Ecology,
4 Svobody Sq., Kharkiv 61022, Ukraine

³ University of Rostock, Institute of Biological Sciences, Department of Applied Ecology and Phycology,
3 Albert-Einstein-Strasse, Rostock D-18057, Germany

A POLYPHASIC APPROACH LEADING TO THE DISCOVERY OF NEW TAXA OF TERRESTRIAL CYANOBACTERIA FOR THE FLORA OF UKRAINE

Several morphotypes of filamentous cyanobacteria were found in the terrestrial habitats of the Kharkiv Region (biological soil crusts) and in the vicinity of Kyiv (old concrete wall in the forest). Morphological and molecular characterization of four original strains revealed that they belong to recently described genera *Wilmottia* Strunecký, Elster et Komárek, *Pysnacronema* M.D. Martins et Branco, *Myxacorys* Pietrasiak et J.R. Johansen and *Tildeniella* Mai, J.R. Johansen et Pietrasiak. All of them are new to the flora of Ukraine. Besides the analysis of p-distances, the nucleotide sequence of the 16S-23S ITS region and the secondary structures of its most informative helices, we used in our phylogenetic analyses sequences of the 16S rRNA gene. All Ukrainian strains joined the clades of the corresponding genera with a high degree of support in the Bayesian and

Maximum Likelihood analyses. However, their species-level identification gave ambiguous results. Reliable result was obtained only for the strain of genus *Wilmottia*. It was identified as *Wilmottia murrayi* (W. et G.S.West) Strunecký, Elster et Komárek. This is the first morphologically and molecularly confirmed record of this species in Europe. Two strains were identified as *Pycnacronema* cf. *caatingensis* and *Tildeniella* cf. *torsiva* due to their deviations from these species both in morphology and the 16S–23S ITS secondary structures. In the 16S rRNA gene-based phylogenetic analysis, original strain of the genus *Myxacorys* took separate position among the known species of this genus and also had a number of morphological differences from them. Therefore, it might represent a new species, but this cannot be proven due to the lack of a 16S-23S ITS sequence of the original strain. Detailed description of morphology of the studied strains with tabular review of corresponding species are given.

Key words: Cyanobacteria, *Myxacorys*, *Pycnacronema*, *Tildeniella*, *Wilmottia*, 16S rRNA, 16S-23S ITS, secondary structures, Ukraine, new floristic records

Citation: Mikhailiuk T.I., Vinogradova O.M., Gromakova A.B., Glaser K., Karsten U. 2023. A polyphasic approach leading to the discovery of new taxa of terrestrial cyanobacteria for the flora of Ukraine. *Algologia*. 33(3): 185–212. <https://doi.org/10.15407/alg33.03.185>