

Πανεπιστήμιο Κρήτης Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών Τμήμα Βιολογίας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών»

Διατριβή Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης

Μελέτη της ακραιόφιλης συμπεριφοράς του λειχήνα *Pleurosticta acetabulum* με αστροβιολογικές εφαρμογές

Αθηνά Παρασύρη

Εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Φωτοβιολογίας

Επιβλέπων Καθηγητής: Καθ. Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Ηράκλειο 2016

Πανεπιστήμιο Κρήτης Τμήμα Βιολογίας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών

Επιβλέπων: Καθηγητής Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Καθ. Κυριάκος Κοτζαμπάσης, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης Αναπλ. Καθ. Στέργιος Πυρίντσος, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης Αναπλ. Καθ. Ιωάννης Βόντας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθήνας

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία διεκπεραιώθηκε με τη βοήθεια και απαραίτητη συμβολή πολλών ατόμων, τα οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση, ο οποίος με δέχτηκε στην ομάδα του εργαστηρίου του, με καθοδηγούσε καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής και με εμπιστεύτηκε, όχι μόνο στο θέμα της παρούσας εργασίας, αλλά και σε επιπλέον πειράματα που μου ανατέθηκαν, ενώ με δίδαξε και ο ίδιος πολύ σημαντικές τεχνικές. Επίσης, ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Στέργιο Πυρίντσο, αλλά και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Βόντα, που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Στέργιο Πυρίντσο για τις γνώσεις και τη μεθοδολογία που μας παρείχε, όσον αφορά στους χειρισμούς των λειχήνων, αλλά και για τις επανειλημμένες δειγματοληψίες λειχήνων που πραγματοποίησε.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Αικατερίνη Παπαζή, η οποία με δίδαξε και μου έδωσε όλες τις απαραίτητες βάσεις για να μπορώ να δουλεύω στο εργαστήριο, το Δρ. Νικόλαο Σταμάτη από το ΙΝ.ΑΛ.Ε για την αμέριστη βοήθειά του στις ποσοτικές και ποιοτικές αναλύσεις των λιπαρών οξέων σε ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων και τον υποψήφιο Διδάκτορα Σωτήρη Ζερβέα για τις εκχυλίσεις και τις ποσοτικές εκτιμήσεις των σακχάρων. Φυσικά ευχαριστώ και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, ιδιαίτερα το Γιάννη και το Φώτη, για τη βοήθειά τους και το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο. Επιπλέον, ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου της Καθ. Κ.Α. Ρουμπελάκη για όσα μου έμαθαν και που μου επέτρεπαν να χρησιμοποιώ το εργαστήριό τους όποτε το χρειαζόμουν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα που με βοήθησαν σε προσωπικό επίπεδο. Κυρίως την οικογένειά μου, που εμπιστεύεται τις επιλογές μου και με στηρίζει όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και τους φίλους μου και τον Αποστόλη, που ήταν πάντα δίπλα μου. Δε θα μπορούσα να παραλείψω τους συναδέλφους στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών – Μοριακή Βιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών, ιδιαίτερα τη Δανάη, την Ιουλιέττα και τη Λένα, για την υποστήριξη και τις συμβουλές που μου έδωσαν μέσα σε αυτά τα δύο χρόνια.

Περιεχόμενα

Περίλη	ψη		- 6 -
Abstra	ct		- 8 -
Εισαγα	ογή		-9-
1.1 0	ι Λειχ	ήνες	-9-
1.1. 1	1 I	Η Φωτοσυνθετική Διαδικασία	10 -
1.	1.1.1	Η Δομική Συγκρότηση του Χλωροπλάστη	11 -
1.	1.1.2	Η Δομή και Λειτουργεία του Φωτοσυνθετικού Μηχανισμού	11 -
1.	1.1.3	Μη Κυκλική Ροή Ηλεκτρονίων	13 -
1.	1.1.4	Κυκλική Ροή Ηλεκτρονίων - Κυκλική Φωσφορυλίωση	14 -
1.	1.1.5	Η Φωτοσυνθετική Παραγωγή Υδρογόνου από Χλωροφύκη	15 -
1.	1.1.6	Η Φωτοσυνθετική Παραγωγή Υδρογόνου από Λειχήνες	16 -
1.1.2	2 1	Η Αναπνευστική Διαδικασία	18 -
1.2 A	νθεκτι	ικότητα σε Καταπονήσεις	19 -
1.2.1	1 (Ο Ρόλος των Πολυαμινών	19 -
1.2.2	2 1	Η Διατήρηση της Κυτταρικής Ομοιοστασίας σε Συνθήκες Καταπόνησης	22 -
1.3 H	Ακρα	αοφιλία των Λειχήνων και Αστοβιολογικές Προεκτάσεις	23 -
1.3.1	1 (Οι Προϋποθέσεις Κατοικησιμότητας σε ένα Διαστημικό Περιβάλλον	24 -
1.3.2	2 1	Η Θεωρία της Πανσπερμίας	26 -
1.4 O	σκοπ	ός της παρούσας εργασίας	29 -
Υλικά ι	και Μ	έθοδοι	30 -
2.1	Οργα	νισμοί	30 -
2.1.1	1 (Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum	30 -
2.1.2	2]	Γα Μονοκύτταρα Χλωροφύκη <i>Trebouxia crenulata</i> και Scenedesmus obliquus	31 -
2.2	Πειρο	αματικοί Χειρισμοί	33 -
2.3	Μέτρ	ηση Επαγωγικού Φθορισμού	34 -
2.4	Προσ	διορισμός Χλωροφύλλης a και b	37 -
2.5	Προσ	διορισμός Εργοστερόλης	37 -
2.6	Πολα	ρογραφική Μέτρηση Φωτοσυνθετικής και Αναπνευστικής Δραστηριότητας	38 -
2.7	Προσδιορισμός των Πολυαμινών 38 -		
2.8	Απομ	όνωση και Ποσοτικοποίηση Ολικών Πρωτεϊνών	39 -
2.9	Αποδιατακτική Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Ακρυλαμίδης 40 -		
2.10	Ανοσοεντοπισμός με Στύπωμα Western 41 -		
2.11	Ποσο	στική Εκτίμηση Η₂ με τη Χρήση GC-TCD	42 -

2.12 Προσδιορισμός των σακχάρων	42 -
2.13 Προσδιορισμός των λιπαρών οξέων	43 -
Αποτελέσματα	44 -
3.1 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του λειχήνα σε απόλυτη ξηρασία και ακραία χαμηλη θερμοκρασία	í 44 -
 3.1.1 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του χλωροφύκους 	44 -
3.1.1.1 Φωτοσυνθετικές Χρωστικές - Χλωροφύλλες	48 -
3.1.2 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του μύκητα	50 -
3.1.3 Επίπεδο καταπόνησης στο λειχήνα - Πολυαμίνες ως δείκτης καταπόνησης	52 -
3.1.4 Διαφοροποίηση του επιπέδου των λιπαρών και σακχάρων σε συνθήκες καταπόνη	σης - 54 -
3.2 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από το λειχήνα μετά την έκθεσή του σε ακραί θερμοκρασία.	α χαμηλή 59 -
3.2.1 Ακραιοφιλία και παραγωγή υδρογόνου	59 -
3.2.1.1 Έλεγχος της κατάστασης του φωτοβιώτη	62 -
3.2.1.2 Έλεγχος της κατάστασης του μυκοβιώτη	69 -
3.2.1.3 Φωτοσυνθετική δραστηριότητα και αναπνοή του λειχήνα	71 -
3.2.1.4 Πολυαμίνες ως δείκτης καταπόνησης στο λειχήνα	73 -
3.2.1.5 Τα επίπεδα των λιπιδίων σε συνθήκες καταπόνησης	74 -
3.3 Συγκριτική μελέτη ανθεκτικότητας του χλωροφύκους του γένους <i>Trebouxia</i> όταν δε συμβιωτική κατάσταση	: βρίσκεται σε 83 -
3.3.1 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του χλωροφύκους <i>Trebouxia crenulata</i>	83 -
3.3.2 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus	85 -
Συζήτηση	87 -
4.1 Είναι ο λειχήνας ανθεκτικός στην ξηρασία και στην ακραία χαμηλή θερμοκρασία επικρατούν εκτός βιόσφαιρας;	(-196°C) που 87 -
4.2 Είναι δυνατόν να συνδεθεί η ακραιοφιλία του λειχήνα με βιοτεχνολογικές εφαρμο ικανότητα παραγωγής H_2 ;	γές, όπως η 91 -
4.3 Είναι η συμβίωση μυκοβιώτη και φωτοβιώτη το κλειδί της ακραιόφιλης συμπερι λειχήνα ή πρόκειται για δύο ανεξάρτητα ακραιόφιλους οργανισμούς;	φοράς του 95 -
4.4 Λειχήνες και η θεωρία της πανσπερμίας	96 -
Βιβλιογραφία	98 -

Περίληψη

Στα πλαίσια μελέτης μιας συνδυαστικής ακραιοφιλίας, η παρούσα εργασία με τη χρήση μιας σειράς βιοχημικών και φυσικοχημικών αναλύσεων και φυσιολογικών/λειτουργικών προσεγγίσεων, απέδειξε την ανθεκτικότητα ενός ιδιαίτερου οργανισμού, του λειχήνα, σε τρεις ακραίες καταστάσεις, την απόλυτη και παρατεταμένη ξηρασία, την ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196°C) και την έλλειψη οξυγόνου. Ο λειχήνας Pleurosticta acetabulum επανήλθε πλήρως μετά την έκθεσή του σε παρατεταμένη ξηρασία. Η μετάβασή του σε ξηρή μορφή, όχι μόνο δεν τον καταπόνησε, αλλά το βοήθησε να επιβιώσει δομικά και λειτουργικά όταν βρέθηκε στους -196°C και μάλιστα αποδείχθηκε, με τεχνικές επαγωγικού φθορισμού – JIP-test και HPLC αναλύσεις του επιπέδου της εργοστερόλης, ότι επιβίωσαν και οι δύο συμβιώτες του. Αντίθετα, η θερμοκρασία αυτή αποτέλεσε ισχυρή καταπόνηση για το συμβιωτικό χλωροφύκος Trebouxia, χωρίς να καταρρεύσει ολοκληρωτικά, όταν ο λειγήνας ήταν μεταβολικά ενεργός, αλλά ο μύκητας παρέμεινε ανέπαφος. Το γλωροφύκος μόνο του, σε μη συμβιωτική κατάσταση, φάνηκε να μην επηρεάζεται δομικά και λειτουργικά από την ξηρασία και την ακραία χαμηλή θερμοκρασία των -196°C, δείχνοντας ότι αποτελεί έναν εξίσου ανθεκτικό οργανισμό σε ακραίες συνθήκες. Αυτό επιβεβαιώνει ότι η ανθεκτικότητα του λειχήνα δεν είναι άμεσα λειτουργικό αποτέλεσμα της συμβίωσης του φωτοβιώτη με το μυκοβιώτη, σε αντίθεση με τη μέχρι τώρα επικρατούσα αποδοχή, αλλά πρόκειται για δύο ανεξάρτητα ανθεκτικούς οργανισμούς, που ενδεχομένως αυτή η ακραιοφιλία να αναπτύχθηκε στην πορεία της εξέλιξης μέσω της συμβίωσής τους στο λειχήνα. Μετά την έκθεση του λειχήνα σε αυτές τις δύο ακραίες συνθήκες, μεταφέρθηκε σε ανοξικό περιβάλλον, όπου παρέμεινε λειτουργικός, επανα-οργανώνοντας το μεταβολισμό του και ιδιαίτερα το φωτοσυνθετικό του μηχανισμό, έτσι ώστε μέσω της φωτοανεξάρτητης ζύμωσης (dark fermentation), που συνδέει το μονοπάτι βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων με τη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, να παράγονται υψηλές ποσότητες μοριακού H₂. Η έκθεση του λειχήνα σε απόλυτη ξηρασία και ταυτόχρονα σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία δεν επηρέασε ούτε στο ελάχιστο την ικανότητα του οργανισμού να παράγει μεγάλες ποσότητες υδρογόνου, όταν βρέθηκε σε ανοξικές συνθήκες, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο με μεγάλη απόδοση για την κάλυψη ενεργειακών αναγκών. Η διεξοδική ανάλυση της διαφοροποίησης του επιπέδου των λιπαρών και της σύστασής τους σε επιμέρους λιπαρά οξέα, καθώς επίσης και του επιπέδου των σακχάρων σε όλους τους χειρισμούς, αποτέλεσε τη βάση συζήτησης για την κατανόηση του μηγανισμού της ακραιόφιλης συμπεριφοράς του λειγήνα. Η πρωτοφανής ανθεκτικότητα και λειτουργική πλαστικότητα αυτού του οργανισμού σε τρεις ακραίες καταστάσεις. που προσομοιάζουν συνθήκες διαστήματος, σε συνδυασμό με τη φυσική ακινητοποίηση του φωτοβιώτη στο μυκοβιώτη, εξασφαλίζοντας τη βιωσιμότητα και τη λειτουργικότητα των

ακινητοποιημένων κυττάρων του χλωροφύκους και περιορίζοντας την ανάπτυξή τους, τον καθιστά ιδανικό οργανισμό για διαστημικές αποστολές και αστροβιολογικές/ αστροβιοτεχνολογικές εφαρμογές. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, ανοίγει η συζήτηση όσον αφορά τη θεωρία της πανσπερμίας και προτείνεται ο λειχήνας ως οργανισμός που, αφενός θα μπορούσε να συνοδεύσει μια διαστημική αποστολή παρέχοντας ενέργεια με μηδενικό κόστος και αφετέρου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μια Αντίστροφη Υποβοηθούμενη Πανσπερμία μεταφέροντας τη ζωή σε άλλα αστρικά συστήματα.

Abstract

The purpose of this work is to demonstrate the resistance of lichen under prolonged drought stress, extremely low temperature (-196°C) and oxygen depleted conditions, using a series of biochemical and physicochemical analyses and physiological/ functional approaches. The lichen Pleurosticta acetabulum is revived after exposure to a long period of drought. In fact, the transition to the dry state, not only did not stress the lichen, but also contributed to its structural and functional maintenance, when incubated at -196°C. Fluorescence induction measurements (JIP test) and HPLC analyses of ergosterol levels confirmed the maintenance of both symbionts. On the contrary, the incubation of metabolically active lichen at extremely low temperature stressed the photobiont Trebouxia, without leading to collapse and the mycobiont partner remained intact. The isolated green algae, Trebouxia, in a non-symbiotic state, was not stressed at all when exposed at drought stress and the extremely low temperature of -196°C, proving the fact that the isolated algae is as resistant as the whole lichen thalli at extreme conditions. The above results confirm that the resistance of the lichen is not directly an effect of the symbiosis between the photobiont and the mycobiont, in contrast to the hitherto predominant acceptance, but they are two equal resistant organisms. The incubation of the lichen in absolute dry conditions and extremely low temperature was followed by incubation in oxygen depleted conditions. In this state, the lichen remained functional and its metabolism, and especially its photosynthetic activity, was reorganized, leading to the production of high amount of molecular hydrogen (H₂) through the dark fermentation pathway, which combines the lipid biosynthesis pathway with the electron transport chain of photosynthesis. Neither the drought nor the extremely low temperature affected the ability of lichen to produce high amounts of hydrogen in oxygen depleted conditions, which can be used as fuel to meet energy demands and has high efficiency. The thorough analysis of differentiation in the level of fats and their fatty acids composition, as well as the level of sugar in all treatments contributed to the understanding of the extremophilic behavior of lichen. The unprecedented resistance and functional plasticity of this organism in three extreme conditions that simulate space conditions, makes it the ideal organism for space missions and astrobiological/astrobiotechnological applications. Based on the results of this study, the theory of panspermia can be further analyzed and lichens are suggested as the organisms that could both accompany a space mission by providing energy at zero cost and also be used in a Reverse Assisted Panspermia, carrying life in other star systems.

Εισαγωγή

1.1 Οι Λειχήνες

Οι λειχήνες είναι οργανισμοί που προκύπτουν από τη συμβίωση ενός μύκητα (μυκοβιώτης), που συνήθως ανήκει στους Ascomycota και πιο σπάνια στους Brasidiomycota, και ενός χλωροφύκους ή/και ενός κυανοβακτηρίου (φωτοβιώτης) (Honegger, 1998). Πρόσφατες έρευνες έχουν προσθέσει και έναν τρίτο οργανισμό σε αυτή τη συμβίωση, ένα ζυμομύκητα (Spribille et al, 2016). Ο ζυμομύκητας, όμως, δεν εξαρτάται από τη συμβίωση για την επιβίωσή του. Υπάρχει σε κάποια είδη λειχήνων και πιθανόν να δικαιολογεί την προέλευση ιδιαίτερων χημικών ενώσεων που έχουν εντοπισθεί σε αυτούς τους οργανισμούς. Η μορφολογία των λειχήνων παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση ως προς το χρώμα, το μέγεθος και τις δομές που σχηματίζονται. Ανάλογα με τη φυσιολογία και την ανάπτυξή τους κατηγοριοποιούνται σε τρεις κλάσεις: Crustose ή Crustaceous, Fruticose ή Filamentous και Foliose ή Foliaceous (Bendre, 2010) (Εικόνα 1). Ο μύκητας παρουσιάζει μεγάλη εκλεκτικότητα ως προς το είδος του φωτοβιώτη που θα συμβιώσει, καθώς αυτός καθορίζει τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του λειχήνα και εξασφαλίζει την πηγή άνθρακα για την επιβίωσή του (Richardson et al., 1968; Komiya and Shibata, 1971). Από την άλλη μεριά, ο μύκητας προσφέρει ένα κατάλληλο μικροπεριβάλλον για την επιβίωση του χλωροφύκους (Wang et al., 2014).

Οι λειχήνες φαίνεται να έχουν μεγάλη ανθεκτικότητα και συναντώνται ακόμα και σε περιοχές με ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, κυριαρχώντας στο 10% των χερσαίων οικοσυστημάτων του πλανήτη. Διακρίνονται τρία προσαρμοστικά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην τόσο επιτυχημένη επιβίωσή τους (Jänchen, 2015). Αυτά είναι η μορφολογία και η ανατομία τους (Meeßen



Εικόνα 1: Οι τρεις κατηγορίες λειχήνων και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους. Σε κάθε περίπτωση το χλωροφύκος φαίνεται να περιβάλλεται από δομές του μυκοβιώτη, ώστε να προστατεύεται από περιβαλλοντικές καταπονήσεις.

- 9 -

et al., 2013), ένα μεγάλο εύρος δευτερογενών ενώσεων που συναντώνται σε λειχήνες (Meeßen et al., 2014) και η ικανότητά τους να μεταβαίνουν σε μια μεταβολικά ανενεργή κατάσταση (Kranner et al., 2005), ώστε να προστατευτούν από δυσμενείς θερμοκρασίες, ξηρασία και υψηλά επίπεδα ηλιακής και UV ακτινοβολίας. Λόγω των προσαρμογών τους έχουν καταφέρει να αντέξουν και να επιβιώσουν σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας, ξηρασίας και UV ακτινοβολίας (de Vera et al., 2003) και μάλιστα κυριαρχούν σε αυτά τα περιβάλλοντα. Το γεγονός ότι πρόκειται για τη συμβίωση οργανισμών σημαίνει ότι οι προσαρμογές τους κατά των καταπονήσεων αφορούν επιμέρους μηχανισμούς που υπάρχουν στο φωτοβιώτη και στο μυκοβιώτη. Αυτό είναι λογικό, καθώς ο φωτοβιώτης διαθέτει φωτοσυνθετικό και αναπνευστικό μηχανισμό παρόμοιο με αυτό των ανώτερων φυτών, επομένως έχει διαφορετικές μεταβολικές λειτουργίες. Από την άλλη μεριά, ο μυκοβιώτης διαθέτει μόνο μηχανισμό αναπνοής.

Το πιο κοινό είδος φωτοβιώτη που συναντάται σε λειχήνες, ακόμη και σε ακραία περιβάλλοντα, όπως αυτά της Ανταρκτικής και των Άλπεων, ανήκει στο γένος *Trebouxia* (Tschermak-Woess, 1988). Αυτό το είδος φωτοβιώτη δεν είναι αρκετά ανταγωνιστικό για να επιβιώσει στη μη-συμβιωτική κατάσταση. Μαζί με το μύκητα, όμως, μπορεί να αποικίσει οικοσυστήματα που θα ήταν αδύνατο να βρεθεί μόνο του. Οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν δείξει ότι όταν τα δύο μέρη βρίσκονται σε συμβίωση είναι πιο ανθεκτικά σε σχέση με το αν ο μύκητας ή το χλωροφύκος/κυανοβακτήριο βρίσκονταν μόνα τους σε ακραίες συνθήκες (de Vera, 2012).

1.1.1 Η Φωτοσυνθετική Διαδικασία

Η μελέτη της φωτοσύνθεσης αποτελεί ένα ερευνητικό πεδίο που συγκεντρώνει το ενδιαφέρον, διότι σ' αυτή τη διαδικασία στηρίζεται, είτε άμεσα είτε έμμεσα, η διατήρηση της ζωής στον πλανήτη, αφού μέσω της φωτοσύνθεσης επιτυγχάνεται η μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική και με τη σειρά της επενδύεται στη μετατροπή της ανόργανης ύλης σε οργανική. Στα φυτά, καθώς και σε ορισμένα βακτήρια (Frenkel, 1954), η φωτοσυνθετική διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση μοριακού οξυγόνου και τη δέσμευση ατμοσφαιρικού CO₂, το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση υδατανθρακικών ενώσεων (οξυγονική φωτοσύνθεση). Η φωτοσύνθεση στα φυτά έχει δύο διακριτά στάδια (Arnon, 1954; Arnon, 1971). Το πρώτο στάδιο είναι οι φωτεινές αντιδράσεις, στις οποίες λαμβάνει χώρα η απορρόφηση του φωτός, η μεταφορά της ενέργειας στα κέντρα αντίδρασης, καθώς και οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων και πρωτονίων, οι οποίες περιλαμβάνουν την αναγωγή του CO₂ και τη σύνθεση υδατανθράκων, χρησιμοποιώντας το NADPH και το ATP που παράγεται κατά τις φωτεινές αντιδράσεις.

1.1.1.1 Η Δομική Συγκρότηση του Χλωροπλάστη

Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός εντοπίζεται χωροταξικά στους χλωροπλάστες. Πρόκειται για οργανίδια που συναντώνται σε φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. υποκυτταρικά Δομικά, περιβάλλονται από μια διπλή μεμβράνη, που ονομάζεται πλαστιδιακός φάκελος (Εικόνα 2). Οι μεμβράνες αυτές παρουσιάζουν διαφορετική διαπερατότητα σε διάφορες οργανικές και ανόργανες ουσίες. Πιο συγκεκριμένα, η εξωτερική μεμβράνη είναι διαπερατή κυρίως από μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους, ενώ η εσωτερική είναι πιο επιλεκτική για τις περισσότερες ουσίες. Βέβαια και οι δύο μεμβράνες είναι διαπερατές από το CO2, που αποτελεί το υπόστρωμα για τη σύνθεση των υδατανθράκων κατά τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Ο χώρος που δημιουργείται μεταξύ των δύο αυτών μεμβρανών ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος, ενώ ο χώρος που περικλείεται από την εσωτερική μεμβράνη καλείται στρώμα.



μεμβράνες, το στρώμα, τα θυλακοειδή και τα grana.

Στο στρώμα υπάρχει ένα ανεπτυγμένο σύστημα μεμβρανών, το οποίο αποτελεί συνέχεια της εσωτερικής μεμβράνης του πλαστιδιακού φακέλου. Οι δομές αυτές ονομάζονται ελασμάτια διαπλατύνονται, και δημιουργώντας μεμβρανώδεις σάκους, τα θυλακοειδή, που περιέχουν έναν εσωτερικό χώρο, γνωστό ως μικροχώρο. Επιπλέον, στο στρώμα απαντώνται τα Εικόνα 2: Η δομή του χλωροπλάστη. Διακρίνονται οι περισσότερα ένζυμα που καταλύουν τις σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Τέλος τα

θυλακοειδή οργανώνονται σε μεμβρανικές στοιβάδες, οι οποίες ονομάζονται grana. Οı φωτοσυνθετικές μονάδες βρίσκονται στις μεμβράνες των θυλακοειδών και αποτελούνται από πρωτεΐνες και φωτοσυνθετικές χρωστικές (χλωροφύλλες και καροτενοειδή), οργανωμένες σε σύμπλοκα.

1.1.1.2 Η Δομή και Λειτουργεία του Φωτοσυνθετικού Μηχανισμού

Η φωτοσυνθετική μονάδα αποτελείται από τρία διακριτά σύμπλοκα (Εικόνα 3). Αυτά είναι το Φωτοσύστημα II (PSII), το Φωτοσύστημα I (PSI) και το κυτόχρωμα b_6/f (cyt b_6/f), ενώ διακρίνεται και μία ATP-συνθάση. Το PSII είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, που αποτελείται από δύο διακριτά ενζυμικά σύμπλοκα (Εικόνα 4), το σύμπλοκο συλλογής φωτός (Light Harvesting Complex, LHCII) και τον πυρήνα του φωτοσυστήματος (PSII core). Το LHCII περιέχει πρωτεΐνες και μόρια χλωροφύλλης a, χλωροφύλλης b και καροτενοειδών και εντοπίζεται περιφερειακά του PSII, συνδέοντας τις μεμβράνες των θυλακοειδών και ελέγχοντας την κατανομή της ενέργειας μεταξύ του

PSII και του PSI. Έχει τη δυνατότητα να αποσπαστεί από το PSII σε ειδικές καταστάσεις και να διοχετεύσει ενέργεια στο PSI. Ο πυρήνας του PSII είναι ένα πολυπεπτιδικό σύμπλοκο που περιλαμβάνει το κέντρο αντίδρασης, όπου πραγματοποιείται ο πρωτογενής διαχωρισμός φορτίου, καθώς και το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου. Το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου φωτολύει το μόριο του νερού και πέραν της παραγωγής οξυγόνου, τροφοδοτεί το μικροχώρο με πρωτόνια, τα οποία δημιουργούν μια διαβάθμιση με το στρώμα, που τη χρησιμοποίει ως κινητήρια δύναμη η ATP-συνθάση.



Εικόνα 4: Δομική περιγραφή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, με τα τρία κύρια σύμπλοκα και την ATPσυνθάση. Με τα βέλη φαίνονται τα μονοπάτια μεταφοράς ενέργειας, καθώς και η μεταφορά ηλεκτρονίων και πρωτονίων (Anna et al., 2013).



Εικόνα 3: Η δομή και λειτουργία του PSII. Διακρίνεται το LHC, που διαχειρίζεται την ηλιακή ενέργεια και ο πυρήνας του PSII, στον οποίο γίνεται η φωτόλυση του νερού.

Όσον αφορά στο δεύτερο σύμπλοκο, το PSI απαρτίζεται από το σύμπλοκο συλλογής φωτός (LHCI) και τον πυρήνα του PSI. Το σύμπλοκο LHCI δρα ως βοηθητική κεραία, η οποία συγκεντρώνει το φως και μεταφέρει την ενέργειά του στο P700, που είναι ο πρωτογενής ηλεκτρονιοδότης του κέντρου αντίδρασης και βρίσκεται στον πυρήνα. Εκτός από P₇₀₀, το πρωτεϊνικό σύμπλοκο περιέχει επίσης και τις χρωστικές και τους οξειδοαναγωγικούς παράγοντες που είναι απαραίτητοι για να επιτευχθεί η μεταφορά των ηλεκτρονίων στο PSI. Τέλος, το cyt b₆/f αποτελεί ενδιάμεσο πρωτεϊνικό σύμπλοκο μεταξύ του PSII και του PSI στη μη κυκλική μεταφορά ηλεκτρονίων. Αποτελείται από τέσσερις πρωτεΐνες, το κυτόχρωμα b6, το κυτόχρωμα f, την υπομονάδα IV και μια πρωτεΐνη Fe-S. Τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν από την απορρόφηση ενέργειας στο PSII μέσω της πλαστοκινόνης αποδίδονται στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο του cyt b₆/f, έπειτα στην πλαστοκυανίνη και από εκεί στο PSI.

1.1.1.3 Μη Κυκλική Ροή Ηλεκτρονίων

Η μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων περιλαμβάνει τα PSII και PSI του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Walker, 2002; Zerges, 2002; Allen, 2003). Η φωτεινή ενέργεια απορροφάται από τις χλωροφύλλες του LHCII και τις διεγείρει. Η διέγερση αυτή μεταφέρεται μέχρι τον πυρήνα του PSII, όπου βρίσκεται το κέντρο αντίδρασης P₆₈₀, με αποτέλεσμα τελικά την ενεργειακή του διέγερση (P₆₈₀*) (Εικόνα 5). Αυτό με τη σειρά του μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο στη φαιοφυτίνη (Pheo a). Το ηλεκτρόνιο αυτό αναπληρώνεται από το νερό, το οποίο οξειδώνεται για να παραχθεί μοριακό οξυγόνο και ιόντα υδρογόνου. Η ανηγμένη φαιοφυτίνη δίνει ένα ηλεκτρόνιο στην κινόνη Q_A και αυτή στην κινόνη Q_B, η οποία μετατρέπεται σε ημικινόνη Q⁻_B. Μετά από την απορρόφηση ενός δεύτερου φωτονίου και αφού πάρει δύο πρωτόνια από το στρώμα, η κινόνη Q_B ανάγεται σε πλαστοκινόνη PQH₂. Η οξειδωμένη μορφή του P₆₈₀* θα αναχθεί από τα ηλεκτρόνια που θα προκύψουν από τη φωτόλυση του νερού, ενώ τα κατιόντα υδρογόνου θα κατευθυνθούν στο



Εικόνα 5: Η μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων. Η φωτονιακή ενέργεια διεγείρει τον πυρήνα του PSII και το κέντρο αντίδρασης P680. Στη συνέχεια, ακολουθεί κατά σειρά η μεταφορά ενός ηλεκτρονίου προς τη φαιοφυτίνη, την κινόνη Q_A , την κινόνη Q_B και η τελευταία θα αναχθεί, με την απορρόφηση ενός δεύτερου φωτονίου, σε πλαστοκινόνη PQH₂. Η μεταφορά ηλεκτρονίου συνεχίζεται στο κυτόχρωμα b6/f, στην πλαστοκυανίνη και στο PSI, ο πυρήνας του οποίου έχει ήδη διεγερθεί και μεταφέρει το ηλεκτρόνιο στη φερρεδοζίνη για την αναγωγή του NADP⁺ σε NADPH.

μικροχώρο. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο κυτόχρωμα b6/f και στη συνέχεια στην πλαστοκυανίνη, ενώ τα H⁺ μεταφέρονται στο μικροχώρο. Τα ηλεκτρόνια τελικά καταλήγουν στο PSI, όπου προηγήθηκε διέγερση του κέντρου αντίδρασης P₇₀₀*, που του επέτρεψε να μεταφέρει ηλεκτρόνια στη φερεδοξίνη και από εκει στο NADP⁺, που το ανάγει σε NADPH. Η διαφορά πρωτονιακής συγκέντρωσης που δημιουργείται μεταξύ στρώματος και μικροχώρου, από τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, είναι η κινητήρια δύναμη pmf (proton motive force) που θα ενεργοποιήσει την ΑΤΡαση και θα δημιουργήσει ΑΤΡ.

1.1.1.4 Κυκλική Ροή Ηλεκτρονίων - Κυκλική Φωσφορυλίωση

Ορισμένες φορές, ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός απαιτεί περισσότερο ATP απ' ότι NADPH. Σε αυτή την περίπτωση, παράλληλα με τη μη κυκλική ροή ηλεκτρονίων, ενεργοποιείται και η κυκλική ροή. Στην κυκλική ροή ηλεκτρονίων συμμετέχει το PSI (Walker, 2002; Zerges, 2002; Allen, 2003). Σε αυτή τη διαδικασία τα e⁻ που θα φτάσουν από το P₇₀₀ στη φερρεδοξίνη έχουν τη δυνατότητα, αντί να προωθηθούν στο NADP⁺ μέσω της πλαστοκινόνης, του κυτοχρώματος b₆/f, της πρωτεΐνης Rieske και της πλαστοκυανίνης, να καταλήξουν πάλι στο κέντρο αντίδρασης του PSI, το P₇₀₀ (Εικόνα 6). Και σε αυτή τη διαδικασία, λόγω της συμμετοχής της δεξαμενής της πλαστοκινόνης, δημιουργείται διαφορά δυναμικού μεταξύ μικροχώρου και στρώματος που οδηγεί σε σχηματισμό ATP (κυκλική φωσφορυλίωση), χωρίς τη δημιουργία του οξειδοαναγωγικού παράγοντα NADPH.



Εικόνα 6: Η κυκλική ροή ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια, αντί για τη μεταφορά στη φερρεδοζίνη για το σχηματισμό NADPH, καταλήγουν μέσω της δεζαμενής της πλαστοκινόνης και πάλι στο PSI και προωθείται ο σχηματισμός ATP.

1.1.1.5 Η Φωτοσυνθετική Παραγωγή Υδρογόνου από Χλωροφύκη

Τα χλωροφύκη μπορούν υπό αναερόβιες συνθήκες να καταλύουν την αντίδραση αναγωγής των ιόντων υδρογόνου σε μοριακό υδρογόνο, χρησιμοποιώντας φωτονιακή ενέργεια και με τη βοήθεια ενζύμων, που ονομάζονται υδρογενάσες (Dubini, 2014). Η διαδικασία αυτή είναι απόλυτα συνδεδεμένη με το φωτοσυνθετικό μηχανισμό, μιας και χρησιμοποιεί ένζυμα και σύμπλοκα αυτού (Εικόνα 7). Η σύγχρονη αντίληψη για την ύπαρξη αυτού του μηχανισμού υποστηρίζει πως πρόκειται για ένα εξελικτικό απομεινάρι, που επιτρέπει στα μικροφύκη να επιβιώνουν ακόμη και σε αναερόβιες συνθήκες. Βασικός ρόλος του μηχανισμού είναι η διατήρηση της φωτοσυνθετικής αλυσίδας σε μια οξειδωμένη κατάσταση, ώστε αυτή να μπορεί να λειτουργεί φυσιολογικά. Υπό αναερόβιες συνθήκες τα κύτταρα ενεργοποιούν τη σύνθεση μιας Fe-υδρογενάσης (Happe and Naber, 1993), η οποία ανάγει τα πρωτόνια που βρίσκονται στο χλωροπλάστη και παράγει αέριο υδρογόνο. Η υδρογενάση είναι συνδεδεμένη με την φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο επίπεδο της φερρεδοξίνης, από την οποία λαμβάνει τα απαραίτητα ηλεκτρόνια που χρειάζονται για την αναγωγή των πρωτονίων (Florin et al., 2001). Επειδή το οξυγόνο αποτελεί ισχυρός αναστολέας των ενζύμων αυτών, η παραγωγή του υδρογόνου συντηρείται μόνο σε αυστηρά αναερόβιες συνθήκες



Εικόνα 7: Φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου στο μικροφύκος Chlamydomonas reinhardtii. Υπό αερόβιες συνθήκες, τα ηλεκτρόνια από την φωτόλυση του νερού στο PSII μεταφέρονται μέσω της πλαστοκινόνης (PQ) στο κυτόχρωμα b_6f (Cyt b_6), στο PSI, στη φερρεδοζίνη(Fd), και τελικά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή NADPH και αμύλου. Η απελευθέρωση πρωτονίων από το PSII και τον κύκλο PQ/PQH2 (ροη H⁺ διακεκομμένη γραμμή) οδηγεί στη δημιουργία μιας διαβάθμισης πρωτονίων, η οποία οδηγεί σε παραγωγή ATP, μέσω της ATP-συνθάσης. Υπό αναερόβιες συνθήκες ενεργοποιείται η υδρογενάση για να παράγει H₂.(Nguyen et al., 2008)

(Benemann et al., 1973; Ghirardi et al., 1997). Τα ηλεκτρόνια που είναι απαραίτητα για την παραγωγή υδρογόνου προέρχονται από την υδρόλυση του νερού. Αυτό είναι το PSII εξαρτώμενο μονοπάτι, όπου τα ηλεκτρόνια από τη φωτόλυση του νερού καταλήγουν, μέσω μορίων-μεταφορέων στο PSII, στη φερρεδοξίνη και τελικά στην υδρογενάση, όπου παράγεται το H₂. Ένα δεύτερο μονοπάτι χαρακτηρίστηκε από τους Melis and Happe (2001) και Antal et al. (2003), το οποίο είναι ανεξάρτητο από το PSII μιας και τα απαραίτητα ηλεκτρόνια παρέχονται από τον καταβολισμό των οργανικών αποθεμάτων του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, η αλυσίδα τροφοδοτείται από ηλεκτρόνια στο επίπεδο της δεξαμενής της πλαστοκινόνης. Τη σύζευξη του καταβολισμού των οργανικών υποστρωμάτων με την πλαστοκινόνη και κατά συνέπεια την εισαγωγή τους στη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, την κάνει μια NAD(P)Η οξειδοαναγωγάση της πλαστοκινόνης. Η δυνατότητα των μικροφυκών να ενεργοποιούν τέτοιους μηχανισμούς σε συνθήκες ανοξίας, όπως η παραγωγή υδρογόνου, είτε είναι PSII εξαρτώμενη είτε όχι, πιθανότατα συνεισφέρει στη διατήρηση μιας μερικώς οξειδωμένης κατάστασης της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και επομένως στην παραγωγή της ελάχιστης ενέργειας που χρειάζεται, ώστε να αποφευχθεί η κατάρρευση της χλωροπλαστικής και μιτοχονδριακής δραστηριότητας (Melis and Happe, 2001).

1.1.1.6 Η Φωτοσυνθετική Παραγωγή Υδρογόνου από Λειχήνες

Οι λειχήνες αποτελούνται από ένα μύκητα και ένα φωτοσυνθετικό οργανισμό. Σε πρόσφατη έρευνα των Papazi et al. (2015) αποκαλύφθηκε η δυνατότητα των λειχήνων να παράγουν μεγάλες ποσότητες μοριακού υδρογόνου, μέσω του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του φωτοβιώτη. Το υδρογόνο θεωρείται το καύσιμο του μέλλοντος, καθώς έχει μεγάλη απόδοση και ταυτόχρονα κατά την καύση του δίνει νερό, περιορίζοντας τα τοξικά παραπροϊόντα (Antal et al., 2011). Περιοριστικοί παράγουτες στη διαδικασία της φωτοσυνθετικής παραγωγής υδρογόνου είναι η ευαισθησία του ενζύμου υδρογενάση στο οξυγόνο, ο ανταγωνισμός για την πρόσληψη ηλεκτρονίων ανάμεσα στο μονοπάτι δέσμευσης άνθρακα και παραγωγής υδρογόνου, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της υδρογενάσης, καθώς και το γεγονός ότι η υδρογενάση μπορεί να δράσει αντίστροφα και να καταναλώσει το υδρογόνο (Ghirardi et al., 1997; Dubini, 2014). Η καινοτομία στη χρήση λειχήνων έγκειται στο γεγονός ότι, όταν βρεθούν σε ένα κλειστό σύστημα, ο μύκητας καταναλώνει άμεσα το οξυγόνο μέσω της αναπνευστικής δραστηριότητας και ταυτόχρονα το χλωροφύκος παράγει υδρογόνο μέσω της φωτοσύνθεσης (Εικόνα 8). Έτσι περιορίζεται το πρόβλημα της ευαισθησίας του ενζύμου στο οξυγόνο (Papazi et al. 2015).

A. Lichens after regeneration stage



Εικόνα 8: Τα προτεινόμενα μοντέλα για την παραγωγή υδρογόνου από λειγήνες από τους Papazi et al., 2015. A. PSII εξαρτώμενο μονοπάτι: Η φωτόλυση του νερού στο PSII και η αναγωγή της γλυκόζης τροφοδοτούν με ηλεκτρόνια τη δεξαμενή της πλαστοκινόνης και από εκεί καταλήγουν στη φερρεδοξίνη μέσω του PSI ή της PFOR για την παραγωγή NADPH και τη σύνθεση λιπιδίων. Σε αυτή τη διαδικασία η συγκέντρωση του οζυγόνου παραμένει υψηλή, απενεργοποιώντας την υδρογενάση. Β. PSII ανεξάρτητο μονοπάτι: Όταν οι λειχήνες βρεθούν σε κλειστό σύστημα, το οξυγόνο καταναλώνεται από την αναπνευστική αλυσίδα, δημιουργώντας τελικά ανοξικές συνθήκες και παράλληλα το PSII απενεργοποιείται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα ηλεκτρόνια να μεταφέρονται από το PSI στη φερρεδοζίνη και τελικά στην υδρογενάση. Επιπλέον, ηλεκτρόνια μεταφέρονται στη φερρεδοζίνη μέσω της PFOR κατά τη βιοσύνθεση λιπιδίων. C. Μονοπάτι Φωτοανεξάρτητης Ζύμωσης: Σε συνθήκες έλλειψης φωτός, το PSII εξαρτώμενο και PSII ανεξάρτητο μονοπάτι απενεργοποιούνται και ενεργοποιείται αυτό της φωτοανεξάρτητης ζύμωσης (dark fermentation). Στο σκοτάδι, η PFOR κατά κύριο λόγο τροφοδοτεί τη φερρεδοζίνη με ηλεκτρόνια και γίνεται η παραγωγή Η2 από την υδρογενάση.

0,

Hyd

1.1.2 Η Αναπνευστική Διαδικασία

Η διαδικασία της αναπνοής εντοπίζεται χωροταξικά στα μιτοχόνδρια των κυττάρων (Εικόνα 9). Εκεί γίνεται κατανάλωση του οξυγόνου και παραγωγή του ATP, το οποίο χρησιμοποιείται από τα κύτταρα για την κάλυψη ενεργειακών αναγκών. Το ATP προκύπτει από τις αντιδράσεις του κύκλου του κιτρικού οξέος, που γίνεται στη μιτοχονδριακή μήτρα και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, που λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Η οξειδωτική φωσφορυλίωσης, που λαμβάνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το FADH₂ σε ένα μόριο οξυγόνου (O₂), μέσω μιας πρωτονιακής διαβάθμισης που δημιουργείται κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης. Στη διαδικασία αυτή εμπλέκονται τέσσερα διαμεμβρανικά σύμπλοκα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 10. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μεταξύ αυτών των συμπλόκων, με αποτέλεσμα την άντληση πρωτονίων έξω από τη μήτρα του μιτοχονδρίου, στο διαμεμβρανικό χώρο και τη δημιουργία της διαφοράς δυναμικού. Τα πρωτόνια επιστρέφουν στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου μέσω μιας ATP συνθάσης (F₀F₁-ATPase), παράγοντας ATP.

Η μεταφορά των ηλεκτρονίων γίνεται μέσω κινονών, φλαβινών, σύμπλοκα σιδήρου-θείου, ομάδες αίμης στο κυτόχρωμα c και ιόντα χαλκού. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH στην προσθετική ομάδα FMN της NADH-οξειδοαναγωγάσης (Σύμπλοκο I). Τα ηλεκτρόνια από το σύμπλοκο της αναγωγάσης του ηλεκτρικού (Σύμπλοκο

II) μεταφέρονται και ανάγουν

και

από

ουμπικινόνη (QH_2)



Εικόνα 9: Η δομική συγκρότηση του μιτοχονδρίου. την Διακρίνονται οι δύο μεμβράνες, τα cristae και η εκεί ^{μιτοχονδριακή μήτρα.}

μεταφέρονται στην οξειδοαναγωγάση του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο ΙΙΙ). Το τελευταίο ανάγει το κυτόχρωμα c και αυτό μεταφέρει ηλεκτρόνια στην οξειδάση του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο IV). Τελικά, η οξειδάση μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο O₂ και σχηματίζεται H₂O. Η ροή ηλεκτρονίων από τα Σύμπλοκα Ι, ΙΙΙ και ΙV οδηγεί στη μεταφορά πρωτονίων από τη μήτρα προς την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, δημιουργώντας μία κινητήρια δύναμη πρωτονίων pmf (proton-motive force) από τη διαβάθμιση pH και ένα δυναμικό μεμβράνης, που επάγει στην επιστροφή των πρωτονίων στη μήτρα μέσω της ATP συνθάσης, παράγοντας ATP. Παρουσία μορίων ATP ανά μόριο γλυκόζης.



Εικόνα 10: Τα τέσσερα σύμπλοκα μεταφοράς ηλεκτρονίων και η ATP συνθάση κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου κατά τη διαδικασία της αναπνοής (Rogov et al., 2014).

1.2 Ανθεκτικότητα σε Καταπονήσεις

1.2.1 Ο Ρόλος των Πολυαμινών

Το φυσικό περιβάλλον για τα φυτά και όλους τους οργανισμούς αποτελείται από ένα περίπλοκο σύνολο αβιοτικών πιέσεων και βιοτικών καταπονήσεων. Οι αποκρίσεις των φυτών στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις είναι εξίσου πολύπλοκες. Πειραματικές προσεγγίσεις ανέδειξαν μια σειρά ρυθμιστικών κόμβων σε ένα πολύπλοκο δίκτυο κυτταρικών συμβάντων, όπως αυτό παρατίθεται στο παρακάτω απλουστευμένο μοντέλο (Εικόνα 11).

Η σημασία της φωτοσύνθεσης για τη διατήρηση της ζωής στον πλανήτη ως ο μοναδικός ενδιάμεσος στη βιοχημική αξιοποίηση της ηλιακής ενέργειας στη βιόσφαιρα είναι γνωστή εδώ και πάρα πολλά χρόνια. Τα τελευταία χρόνια έχουν αποκαλυφθεί νέες πτυχές της μοριακής, βιοενεργητικής και φυσιολογικής λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, που καθορίζουν την προσαρμοστικότητα και την ανθεκτικότητα του φυτού στη περιβαλλοντική καταπόνηση. Το 1993 αποκαλύφθηκε η ύπαρξη πολυαμινών, και συγκεκριμένα της διαμίνης πουτρεσίνης (put), της τριαμίνης σπερμιδίνης (spd) και της τετραμίνης σπερμίνης (spm) στο χλωροπλάστη και στα κέντρα αντίδρασης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Kotzabasis et al., 1993) και φάνηκε να αποτελούν το βασικό ρυθμιστή αυτής της διαδικασίας. Οι πολυαμίνες είναι πολυκατιοντικά μόρια με αλειφατική

δομή, μικρού μοριακού βάρους, τα οποία συναντώνται σε όλους τους οργανισμούς, προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς (Cohen et al., 1998).



Εικόνα 11: Ένα απλοποιημένο μοντέλο της σηματοδότησης των φυτικών αποκρίσεων σε αβιοτικό στρες, από τους Cramer et al., 2011.

Οι φυτικές πολυαμίνες εμπλέκονται σε ποικίλες κυτταρικές διαδικασίες, όπως είναι η γονιδιακή έκφραση, η πρωτεϊνοσύνθεση, η σύνθεση του DNA, η ομοιοστασία του κυττάρου, η κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση, καθώς επίσης και σε αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως είναι η εμβρυογένεση, η οργανογένεση και η γήρανση (Kumar and Rajam, 2004; Moschou et al., 2008). Στον ώριμο χλωροπλάστη, η δυναμική και η πλαστικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στηρίζεται στους διακριτούς ρόλους της διαμίνης put από τις πολυαμίνες spd και spm. Η φωτοπροσαρμογή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού σε υψηλής (High Light, HL) ή χαμηλής (Low Light, LL) έντασης φωτισμό ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό από τη σχέση put/spm. Η μείωση αυτής της σχέσης προσομοιώνει τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, όπως θα ήταν με αντίστοιχη προσαρμογή σε χαμηλό φωτισμό, δηλαδή παρατηρείται αύξηση του μεγέθους της λειτουργικής κεραίας (ABS/RC) και του ολιγομερισμού του LHCII, μείωση των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CS), της σχέσης chl a/b, της φωτοσυνθετικής απόδοσης (Fv/Fm), της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, αλλά και της αναπνοής, ανεξάρτητα από το φωτονιακό

περιβάλλον. Αντίθετα, η αύξηση της σχέσης put/spm οδηγεί σε ένα φωτοσυνθετικό μηχανισμό με δομή και λειτουργία που αντιστοιχούν σε υψηλής έντασης φωτισμό (Kotzabasis et al., 1999). Κεντρικό ρόλο σε αυτό το μηχανισμό ρύθμισης της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού βρέθηκε ότι παίζει η αλληλεπίδραση των πολυαμινών με την αυτοπρωτεολυτική δράση του LHCII. Ρυθμίζοντας τον πολυμερισμό και τον αποπολυμερισμό του LHCII, ελέγχει τη δομική και λειτουργική πλαστικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στη διαδικασία της φωτοπροσαρμογής του.

Το εν λόγω εύρημα γίνεται πολύ πιο σημαντικό από τη στιγμή που έγινε κατανοητός ο κεντρικός ρόλος του LHCII στην αίσθηση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων και καταπονήσεων. Η δυνατότητα αίσθησης των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων και καταπονήσεων (αύξηση ή μείωση της PAR-ακτινοβολίας, έκθεση σε αυξημένες συγκεντρώσεις ατμοσφαιρικού όζοντος, UV-B θερμοκρασίας, αλατότητας, ακτινοβολίας, γαμηλής αυξημένης κ.α.) βασίζεται στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του PSII, η οποία ελέγχεται μεταξύ άλλων από το λειτουργικό μέγεθος του LHCII, που καθορίζει την πίεση διέγερσης του PSII (excitation pressure) και ως εκ τούτου την ένταση της υφιστάμενης καταπόνησης. Αφού αποδείχθηκε ότι είναι δυνατός ο έλεγχος του μεγέθους και της οργάνωσης του LHCII μέσω των πολυαμινών, φάνηκε ότι σε όλες τις μορφές αβιοτικών καταπονήσεων εμπλέκεται η διαφοροποίηση του μεγέθους και της οργάνωσης του LHCII, που ελέγχεται από τη σχέση put/spm.

Σε σειρά πειραμάτων που έγιναν σε θαλάμους περιβαλλοντικής προσομοίωσης (GSF-Μόναχο) ήταν δυνατόν υπερευαίσθητα στο όζον φυτά καπνού Bel W₃ να μετατραπούν σε ανθεκτικά και αντίστροφα, ανθεκτικά φυτά Bel B να μετατραπούν σε ευαίσθητα στο όζον, επεμβαίνοντας απλώς στο LHCII με πολυαμίνες (Navakoudis et al., 2003). Το ίδιο συμβαίνει και όταν τα φυτά εκτεθούν σε υψηλή UV-B ακτινοβολία, σε χαμηλή θερμοκρασία ή σε αυξημένη αλατότητα, αλλά και σε οποιαδήποτε μορφή αβιοτικής καταπόνησης (Lütz et al., 2005; Sfakianaki et al., 2006; Demetriou et al., 2007; Kotakis et al., 2013). Ως εκ τούτου, συνθήκες LL ή εξωγενής προσθήκη spm και αβιοτική καταπόνηση δρουν συνεργιστικά και αυξάνουν δραματικά την ευαισθησία του φωτοσυνθετικού μηγανισμού στην καταπόνηση. Αντίθετα συνθήκες HL ή εξωγενής προσθήκη put και αβιοτική καταπόνηση δρουν ανταγωνιστικά και αυξάνουν σημαντικά την ανθεκτικότητα του φωτοσυνθετικού μηγανισμού στην καταπόνηση. Η μελέτη του μηγανισμού ρύθμισης της φωτοσυνθετικής διαδικασίας από πολυαμίνες έδειξε διακριτούς ρόλους για την put σε σχέση με τις άλλες δύο πολυαμίνες (spd, spm), οι οποίοι επιβεβαιώθηκαν από in vitro και in vivo μελέτες. Η αύξηση της put προκαλεί αναστολή της ενεργοποίησης της μη-φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας (NPQ) και ταυτόχρονα παράταση του χρόνου αποφόρτισης της θυλακοειδούς μεμβράνης. Αυτό συνδέεται άμεσα με τις βιοχημικές ιδιότητες της put αλλά και την επαγωγή της φωτοχημικής

απόσβεσης της ενέργειας και της φωτοφωσφορυλίωσης. Η ικανότητα της put να αυξάνει τη χημειοωσμωτική σύνθεση ATP προτείνεται ως μια κεντρική αιτία γιατί η πολυαμίνη αυτή δρα ως παράγοντας αύξησης των κυττάρων αλλά και γιατί αυξάνεται η σχέση put/spm σε συνθήκες καταπόνησης, διαδικασίες με υψηλό ενεργειακό κόστος. Αντίθετα με την put, οι πολυαμίνες spd και spm προκαλούν επαγωγή της μη-φωτοχημικής απόσβεσης της ενέργειας (NPQ) εις βάρος της φωτοχημικής απόσβεσης ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς φωτοπροστασίας ακόμη και σε χαμηλής ένταση φωτισμό, δηλαδή «παρακάμπτουν» την φωτονιακή εντολή (Ioannidis and Kotzabasis, 2007).

Πρόσφατες δημοσιεύσεις εμπλέκουν ακόμα μία πολυαμίνη, την καδαβερίνη (cad), σε φυτικές λειτουργίες, όπως η αύξηση και η ανάπτυξη, η κυτταρική σηματοδότηση και η αντιμετώπιση βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Cona et al., 2006; Bunsupa et al., 2012b; Jancewicz et al., 2016). Μελέτες έχουν δείξει ότι η καδαβερίνη συσσωρεύεται στους φυτικούς ιστούς όταν υπάρχουν περιβαλλοντικά ερεθίσματα, όπως υψηλή θερμοκρασία ή αυξημένη αλατότητα (Shevyakova et al., 2001; Kuznetsov et al., 2007), αλλά και συνθήκες ξηρασίας (Sziderics et al., 2010), δηλαδή συνθήκες ισχυρής καταπόνησης.

1.2.2 Η Διατήρηση της Κυτταρικής Ομοιοστασίας σε Συνθήκες Καταπόνησης

Στην Εικόνα 11 φαίνεται η απόκριση ενός οργανισμού σε μια σειρά καταπονήσεων, σε κυτταρικό επίπεδο. Όταν στο περιβάλλον του οργανισμού υπάρξει κάποια βιοτική ή αβιοτική καταπόνηση ενεργοποιούνται μια σειρά από γεγονότα σηματοδότησης που θα οδηγήσουν στην ενεργοποίηση ή καταστολή μεταγραφικών παραγόντων στα κύτταρα, ώστε να αντεπεξέλθουν στις νέες συνθήκες (Cramer et al., 2011). Παραπάνω έγινε αναφορά στις πολυαμίνες, οι οποίες φαίνεται να έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην «ορθολογική» διαχείριση των ενεργειακών αποθεμάτων του κυττάρου προς όφελος της προστασίας του από την καταπόνηση. Σε αυτό το επίπεδο, σημασία έχει η διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας της αναπνευστικής διαδικασίας και του φωτοσυνθετικού μηγανισμού. Όσον αφορά στους λειχήνες, η λειτουργική του ακεραιότητα αφορά στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό του φωτοβιώτη και στον αναπνευστικό μηχανισμό πρωτίστως του μυκοβιώτη. Βέβαια, η λειτουργικότητα προϋποθέτει ότι η δομή αυτών των μηχανισμών έχει μείνει ανέπαφη. Όταν οι λειχήνες βρεθούν, για παράδειγμα, σε θερμοκρασία υπό το μηδέν, η δομή των γλωροπλαστών και των μιτογονδρίων κινδυνεύει από το σγηματισμό κρυστάλλων νερού. Άρα είναι απαραίτητοι μηχανισμοί πρόληψης ή καταπολέμησης τους (Hájek et al., 2012). Αντίθετα, σε πολύ υψηλή θερμοκρασία υπάρχει ο κίνδυνος έλλειψης νερού λόγω εξάτμισης. Αυτό θα αλλάξει το pH ενδοκυτταρικά, καθώς και την ιοντική ισχύ του κυτταροπλάσματος, οδηγώντας στο σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) που έχουν καταστροφικές συνέπειες για τις μεταβολικές διαδικασίες, αλλά και για όλο το κύτταρο (Kranner et al., 2008). Επομένως, σημαντικός δείκτης ανθεκτικότητας των λειχήνων σε μια καταπόνηση είναι η ύπαρξη μηχανισμών για τη διατήρηση της αναπνοής και της φωτοσύνθεσης, τόσο δομικά, όσο και λειτουργικά.

Ένας δείκτης διατήρησης της δομικής ακεραιότητας είναι τα επίπεδα των λιπαρών οξέων, καθώς αποτελούν συστατικά των μεμβρανών. Εάν γίνει διάτρηση των μεμβρανών των κυττάρων και των υποκυτταρικών οργανιδίων τότε αυτά θα καταρρεύσουν. Επιπλέον, αλλαγές στον τύπο των λιπαρών οξέων, δηλαδή αν θα είναι κορεσμένα ή ακόρεστα, αλλάζουν και τη ρευστότητα των μεμβρανών, ώστε να προσαρμοστούν στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες (Gigon et al., 2004). Στα παραπάνω πρέπει να προστεθεί και η ωσμωτική ρύθμιση, ιδίως όταν η καταπόνηση σχετίζεται με τη θερμοκρασία και τη διαθεσιμότητα του νερού. Σε περίπτωση που η διαθεσιμότητα του νερού περιοριστεί, είτε λόγω πολύ υψηλής ή πολύ χαμηλής θερμοκρασίας (υπό το μηδέν), ωσμωλύτες (πχ σάκχαρα) ενεργοποιούνται για να διατηρήσουν τα επίπεδα του νερού στο εσωτερικό των κυττάρων και να εξασφαλίσουν την επιβίωσή του, μέχρις ότου το νερό να γίνει και πάλι διαθέσιμο. Στην περίπτωση του λειχήνα, ωσμωλύτες εκφράζονται κυρίως από το μυκοβιώτη, αλλά και από το φωτοβιώτη (Hájek et al., 2009; Hájek et al., 2009).

1.3 Η Ακραιοφιλία των Λειχήνων και Αστοβιολογικές Προεκτάσεις

Παραπάνω έγινε αναφορά στην ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν οι λειχήνες σε ακραίες συνθήκες, που μπορούν να συσχετιστούν με τις συνθήκες που υπάρχουν σε άλλους πλανήτες. Στα πλαίσια ελέγχου της ανθεκτικότητας, δύο είδη λειχήνων, τα Rhizocarpon geographicum και Xanthoria elegans χρησιμοποιήθηκαν για το πείραμα LICHEN (Sancho et al., 2007), κατά το οποίο ο οργανισμός εκτέθηκε στις συνθήκες του πλανήτη Άρη. Οι λειχήνες παρέμειναν στο διάστημα για δύο εβδομάδες και στη συνέχεια ελέγχθηκε η βιωσιμότητά τους. Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα ταυτοποιήθηκε μέσω μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού, οι οποίες έδειξαν ότι ανακτήθηκε πλήρως μετά από 24 ώρες. Επιπλέον, με τη χρήση μικροσκοπίας και με την τεχνική χρώσης LIVE/DEAD BacLight kit φάνηκε ότι οι μεμβράνες των δύο συμβιωτών έμειναν ανέπαφες για το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων (Sancho et al., 2007). Μέχρι τώρα έχουν γίνει αναφορές για την ανθεκτικότητα προκαρυωτικών οργανισμών και Αρχαίων στις ακραίες συνθήκες του διαστήματος (de Vera, 2012). Ιδιαίτερα οργανισμοί που ζουν σε ακραίες συνθήκες, όπως την Ανταρκτική, έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να επιβιώσουν σε τέτοια περιβάλλοντα, δημιουργώντας κυτταρικά συσσωματώματα μέσω των οποίων ανταλλάσσουν θρεπτικά συστατικά (Berardelli, 2006). Τα αποτελέσματα από το πείραμα LICHEN είναι σημαντικά καθώς δείχνουν για πρώτη φορά ότι υπάρχουν και ευκαρυώτες που παρουσιάζουν τον ίδιο βαθμό ανθεκτικότητας, αν και φαίνεται ότι ρόλο-κλειδί έχει η συμβίωση (de Vera, 2012). Το ερώτημα που γεννάται μέσα από το παραπάνω

πείραμα είναι η δυνατότητα που θα είχε ένας οργανισμός, όπως είναι οι λειχήνες, να επιβιώσει μακροχρόνια σε έναν άλλο πλανήτη με το ενδεχόμενο αποίκισής του και από τι θα εξαρτιόταν αυτό.

1.3.1 Οι Προϋποθέσεις Κατοικησιμότητας σε ένα Διαστημικό Περιβάλλον

Ο όρος κατοικησιμότητα (habitability) αναφέρεται στη δυνατότητα που έχει ένα περιβάλλον να υποστηρίζει τη δραστηριοποίηση ενός, τουλάχιστον, γνωστού οργανισμού (Cockell et. al., 2016). Η έννοια δραστηριοποίηση σχετίζεται με τον ενεργό μεταβολισμό του οργανισμού, που θα επιτρέψει την επιβίωση, τη συντήρηση, την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή του. Η επιβίωση προϋποθέτει τη χρήση υλικών που παρέχονται από το περιβάλλον, ώστε ο οργανισμός να παραμείνει σε μια κατάσταση αδράνειας, στην οποία όμως ο ρυθμός της μοριακής καταστροφής είναι ίσος ή μικρότερος με το ρυθμό της μοριακής αποκατάστασης. Η συντήρηση περιλαμβάνει τη διεκπεραίωση των κυτταρικών λειτουργιών, χωρίς όμως να υπάρχει η δυνατότητα αναπαραγωγής. Η ανάπτυξη σχετίζεται με την αύξηση της βιομάζας και η αναπαραγωγή με τον πολλαπλασιασμό του οργανισμού (Cockell et. al., 2016). Ένα περιβάλλον θεωρείται κατοικήσιμο όταν μπορεί να υποστηρίζει τις δραστηριότητες ενός οργανισμού και να του παρέχει τα υλικά και τις συνθήκες που χρειάζεται σε όλη τη διάρκεια της ζωής του (Cockell et. al., 2016).



Εικόνα 12: Η περιοχή που ορίζεται ως ζώνης κατοικησιμότητας, με κριτήριο της απόσταση των πλανητών από το αντίστοιχο αστέρι τους, σύμφωνα με τους Kasting et al., 2014. Η απόσταση αυτή ορίζει την ηλιακή ενέργεια που φτάνει στον πλανήτη και κατά συνέπεια την ικανότητά του να διατηρήσει νερό σε υγρή μορφή.

Η Γη είναι ο μοναδικός γνωστός πλανήτης που πληροί τις προϋποθέσεις για ένα κατοικήσιμο περιβάλλον. Ένας πλανήτης θεωρείται κατοικήσιμος όταν βρίσκεται μέσα στη ζώνη κατοικησιμότητας που ορίζει το κοντινό του αστέρι (Εικόνα 12). Οπότε έχει την κατάλληλη απόσταση, δηλαδή είναι αρκετά μακριά ώστε να αποφεύγει την υψηλή θερμότητα και ακτινοβολία, αλλά όχι τόσο ώστε να είναι παγωμένος και αυτή η απόσταση επιτρέπει την ύπαρξη και διατήρηση νερού σε υγρή μορφή, (Kopparapu et al., 2013). Έτσι εξασφαλίζεται η κατάλληλη θερμοκρασία για τη διαβίωση των οργανισμών. Επιπλέον, πρέπει να είναι βραχώδης και να έχει τέτοιο μέγεθος που να επιτρέπει την ύπαρξη πυρήνα. Ο πυρήνας παρέχει γεωθερμική ενέργεια και επιτρέπει την ανακύκλωση των πρώτων υλών μέσω των τεκτονικών πλακών, ενώ ταυτόχρονα δημιουργεί ένα μαγνητικό πεδίο γύρω από τον πλανήτη που τον προστατεύει από την ακτινοβολία. Τέλος, είναι απαραίτητη η ύπαρξη προστατευτικής ατμόσφαιρας, η οποία διατηρεί το CO₂ σε βιώσιμα επίπεδα και προστατεύει από την ακτινοβολία (Εικόνα 13). Εάν τα επίπεδα του CO₂ αυξηθούν, αυτό λειτουργεί ως αέριο θερμοκηπίου και οδηγεί στην αύξηση της θερμοκρασίας κάνοντας τον πλανήτη ακατάλληλο για διαβίωση. Από την άλλη μεριά, αν τα επίπεδα του CO₂ μειωθούν, θα μειωθεί και η θερμοκρασία και ο πλανήτης θα μπει σε μια εποχή παγετώνα.



Εικόνα 13: Ιδανικές συνθήκες για να θεωρηθεί ένας πλανήτης κατοικήσιμος, σε ένα απλουστευμένο σχήμα από το http://learn.genetics.utah.edu/content/astrobiology/conditions/

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η Γη βρίσκεται σε πλεονεκτική θέση μέσα στο ηλιακό σύστημα, ώστε να μπορεί να επιβιώνει πλήθος οργανισμών πάνω σε αυτή. Εκτός όμως από τη θέση, υπάρχουν και άλλες προϋποθέσεις, όπως είναι η ύπαρξη νερού και οργανικών πολυμερών (Bada, 2004). Το νερό είναι ένας εξαιρετικός διαλύτης με μοναδικές ιδιότητες και αποτελεί το μέσο στο οποίο γίνονται οι χημικές αντιδράσεις. Στα οργανικά πολυμερή περιλαμβάνονται τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες, τα οποία συμμετέχουν σε βασικές βιολογικές διεργασίες μέσα στο κύτταρο. Επιπλέον, απαιτείται η ύπαρξη μιας πηγής ενέργειας, που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι η ηλιακή ενέργεια και η κοσμική ακτινοβολία, ώστε να γίνεται η σύνθεση μακρομορίων (Jortner, 2006). Για τη σύνθεση των μακρομορίων πρέπει να εξασφαλίζονται και οι πρώτες ύλες, δηλαδή μακροστοιχεία και μικροστοιχεία, τα οποία υπάρχουν σε αφθονία πάνω στη Γη.

1.3.2 Η Θεωρία της Πανσπερμίας

Οι συνθήκες που επικρατούν στη Γη και επιτρέπουν την επιβίωση των οργανισμών δεν ήταν πάντα οι σημερινές. Πριν από περίπου 4 δισεκατομμύρια χρόνια η θερμοκρασία του πλανήτη ήταν υψηλότερη, παρόλο που η φωτεινότητα του ήλιου ήταν κατά 20-30% μικρότερη (Bahcall, 1988; Catling et al., 2001). Αυτό το παράδοξο δικαιολογείται από τη συσσώρευση CO₂ και άλλων αερίων θερμοκηπίου στην ατμόσφαιρα, στην οποία δεν υπήρχε οξυγόνο, αλλά ήταν πλούσια σε μεθάνιο (Rages, 2000; Catling et al, 2001; Shih, 2015). Επιπλέον, στην πρώιμη Γη δεν υπήρχε νερό λόγω της υψηλής θερμοκρασίας, αλλά και του μικρού μεγέθους της Γης που δεν επέτρεπαν τη συγκράτησή του (Lunine, 2006; Shih, 2015). Παρά τις ακραίες συνθήκες, οργανισμοί κατάφεραν να δημιουργηθούν και να επιβιώσουν για δισεκατομμύρια χρόνια.

Μέσα σε αυτά τα χρόνια ένα μεγάλο ποσοστό των οργανισμών εξαφανίστηκε, ενώ οι υπόλοιποι εξελίχθηκαν και προσαρμόστηκαν στις αλλαγές που έγιναν στη Γη. Βέβαια, εξακολουθούν να υπάρχουν οργανισμοί που διαβιούν σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως σε έλλειψη οξυγόνου ή σε αυξημένη αλατότητα (Hoehler et al., 2001). Το γεγονός ότι υπάρχουν και τέτοιοι οργανισμοί που θα μπορούσαν να επιβιώσουν σε συνθήκες που προσομοιάζουν εκείνες άλλων πλανητών, έφερε τη θεωρία της πανσπερμίας. Σε αυτή τη θεωρία υποστηρίζεται ότι ζωή μπορεί να μεταφερθεί ανάμεσα σε πλανήτες και πλανητικά συστήματα. Είναι μια θεωρία που θα μπορούσαν να επιβιώσουν (ΜcKay, 2010). Σε αυτή περιλαμβάνεται και η θεωρία της λιθοπανσπερμίας, σύμφωνα με την οποία η μεταφορά γίνεται μέσω πετρωμάτων, πάνω στα οποία ζουν και επιβιώνουν οργανισμοί (Tobias and Todd, 1974; Melosh, 1988; Worth, 2013). Με αυτό τον τρόπο μπορεί να γίνει μεταφορά ζωής από έναν κατοικήσιμο σε ένα μη κατοικήσιμο πλανήτη.

Η επιτυχία της λιθοπανσπερμίας βασίζεται σε τρία κυρίως στάδια (Εικόνα 14). Αρχικά, ο οργανισμός πρέπει να επιβιώσει τη διαδικασία της εκτόξευσης που περιλαμβάνει ακραίες τιμές επιτάχυνσης και πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Έπειτα, θα βρεθεί έξω από την ατμόσφαιρα και πρέπει να επιβιώσει το διαπλανητικό ή διαγαλαξιακό ταξίδι, το οποίο απαιτεί ανθεκτικότητα σε παρατεταμένη ξηρασία, χαμηλή θερμοκρασία και κοσμική ακτινοβολία. Τέλος, ο οργανισμός θα μπει στην ατμόσφαιρα του νέου πλανήτη, στον οποίο πρέπει να προσαρμοστεί, να επιβιώσει και να αναπτυχθεί κάτω από τις νέες συνθήκες (Cockell, 2004; de Vera, 2012). Η επιτυχία μιας τέτοιας προσπάθειας προϋποθέτει την ύπαρξη ενός οργανισμού που να αντέχει στις παραπάνω καταπονήσεις.



Εικόνα 14: Εικονογράφηση των τριών βασικών γεγονότων για την επιτυχία της λιθοπανσπερμίας, από τον Joseph Hartley, κατά την οποία ένας οργανισμός πρέπει να επιβιώσει τη διαδικασία της εκτόξευσής του έξω από την ατμόσφαιρα, να επιβιώσει το διαπλανητικό ή διαγαλαζιακό ταζίδι, το οποίο απαιτεί ανθεκτικότητα σε παρατεταμένη ξηρασία, χαμηλή θερμοκρασία και κοσμική ακτινοβολία και τελικά να μπει στην ατμόσφαιρα του νέου πλανήτη, στον οποίο θα προσαρμοστεί, θα επιβιώσει και θα αναπτυχθεί κάτω από τις νέες συνθήκες.

Η ανάγκη για μεταφορά ζωής και η επιβίωση σε έναν άλλο πλανήτη θα γίνει ακόμα μεγαλύτερη σε βάθος χρόνου. Η ζωή στη Γη εξαρτάται από τον Ήλιο, ο οποίος όμως δεν είναι σε στατική κατάσταση, αλλά εξελίσσεται. Οι επιστήμονες προβλέπουν ότι κατά την εξέλιξη αυτή θα αυξηθεί η ηλιακή φωτεινότητα οδηγώντας σε αύξηση της θερμοκρασίας και κατ' επέκταση σε μείωση της διαθεσιμότητας του νερού λόγω εξάτμισης (Caldeira and Kasting, 1992; O'Malley-James, 2015). Επιπλέον θα αυξηθούν και τα επίπεδα CO₂. Αυτές οι καινούριες συνθήκες θα μετατρέψουν τη Γη σε μη βιώσιμη για τους περισσότερους οργανισμούς, οι οποίοι θα εξαφανιστούν και θα επιβιώσουν μόνο εκείνοι που μπορούν να ανταπεξέλθουν σε ακραία περιβάλλοντα. Η παραπάνω υπόθεση έχει οδηγήσει τους επιστήμονες στην αναζήτηση πλανητών που έχουν ανάλογες συνθήκες με τη Γη. Δηλαδή πλανήτες στο μέγεθος της Γης, που βρίσκονται σε κατοικήσιμη απόσταση από τον Ήλιο ή άλλο αστέρι και με τέτοια ηλικία που έχει επιτρέψει την ανάπτυξη βιόσφαιρας (O'Malley-James, 2015).

Ο πλανήτης Άρης θεωρείται ότι μοιάζει περισσότερο στη Γη από οποιονδήποτε άλλο πλανήτη του ηλιακού συστήματος. Η διευθέτηση του άξονά του δίνει στον πλανήτη πόλους και ισημερινό, ενώ διακρίνονται και εποχές. Βρίσκεται στο όριο της ζώνης κατοικησιμότητας, όπως ορίζεται από τον Ήλιο (Zubrin, 1993). Αυτή η απόσταση από τον Ήλιο έχει ως αποτέλεσμα η

θερμοκρασία να είναι χαμηλή, δηλαδή κατά μέσο όρο αντιστοιχεί στους -60°C. Βέβαια, κοντά στους πόλους κυμαίνεται από -60°C μέχρι -143°C το χειμώνα, ενώ στον ισημερινό μπορεί να φτάσει τους 27°C μέσα στην ημέρα (Hess et al., 1977; Tillman, 1988; Murphy et al., 1990). Η ατμόσφαιρα είναι 200 φορές πιο αραιή σε σχέση με αυτή της Γης, με πίεση μόλις 1kPa και αποτελείται κατά 95% από CO₂, 2,7% άζωτο, 1,6% αργό, μόλις 0,13% οξυγόνο, 0,08% μονοξείδιο του άνθρακα, ενώ υπάρχουν ελάχιστες ποσότητες από οξείδιο του αζώτου, νερό, νέον και ξένο. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η ατμόσφαιρα δεν είναι βιώσιμη για τον άνθρωπο. Επιπλέον, δεν είναι αρκετά πυκνή για να τον προστατεύσει από την υψηλή ηλιακή ακτινοβολία, η οποία έχει μήκος κύματος λιγότερο από 190nm (McKay, 2016). Άλλα προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπισθούν είναι οι ισχυρές ανεμοθύελλες, αλλά και η βαρύτητα, η οποία αντιστοιχεί μόνο στο 38% της βαρύτητας που υπάρχει στη Γη.

Παρά τις αντιξοότητες, ο πλανήτης Άρης έχει και πλεονεκτήματα, όπως είναι η ύπαρξη των κύριων στοιγείων που απαιτούνται για τη ζωή, δηλαδή το άζωτο, το υδρογόνο, το οξυγόνο, ο άνθρακας, το θείο και ο φωσφόρος (Brown, 2013). Το βασικότερο είναι οι ενδείξεις ότι κάποτε ο πλανήτης είχε νερό, το οποίο μπορεί να βρίσκεται υπογείως, αλλά και σε μικρές ποσότητες με τη μορφή υδρατμών. Η ύπαρξη νερού σε υγρή μορφή, όμως, δεν έχει επιβεβαιωθεί. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι στον πλανήτη μπορεί να υπήρχε κάποτε κάποια μορφή ζωής. Πλέον, με την εξέλιξη της τεχνολογίας, οι ερευνητές έχουν προηγμένα και πιο ευαίσθητα μέσα στην ανάλυση δειγμάτων από το έδαφος του πλανήτη Άρη. Οι αναλύσεις έδειξαν ότι υπάρχουν ίχνη οργανικής ύλης στο έδαφος του πλανήτη (Berardelli, 2006). Αν πράγματι υπήρχε ζωή σε αυτό τον πλανήτη, τότε και στο μέλλον θα μπορούσε να επανακατοικηθεί από οργανισμούς που θα είναι σε θέση να επιβιώσουν σε γαμηλή θερμοκρασία, σε ανοξία, περιορισμένη διαθεσιμότητα νερού και έκθεση σε κοσμική ακτινοβολία. Για να επιβιώσει ένας οργανισμός σε ένα τέτοιο ακραίο περιβάλλον εκτός από την ανθεκτικότητά του σε αυτές τις ακραίες συνθήκες, κυρίως έλλειψη νερού για μεγάλα διαστήματα και ακραία χαμηλές θερμοκρασίες, απαιτείται και μία ενεργειακή πηγή. Η ύπαρξη επαρκών ποσοτήτων οργανικών ενώσεων σε άλλους πλανήτες δεν έχει επιβεβαιωθεί, επομένως αυτός ο οργανισμός πρέπει να είναι σε θέση να παράγει την οργανική ύλη που χρειάζεται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών του. Αυτό γίνεται μέσω του φωτοσυνθετικού μηγανισμού, που μετατρέπει την ηλιακή ενέργεια σε χημική. Άρα, πλεονεκτική θέση για την αποίκιση σε άλλους πλανήτες έχουν οι φυτικοί οργανισμοί.

1.4 Ο σκοπός της παρούσας εργασίας

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στον έλεγχο της ανθεκτικότητας του λειχήνα Pleurosticta acetabulum σε συνθήκες απόλυτης ξηρασίας και ακραία χαμηλής θερμοκρασίας (-196 °C). Ο έλεγχος αφορά τόσο στη δομική όσο και στη λειτουργική ακεραιότητα του οργανισμού, μετά την έκθεσή του στις παραπάνω ακραίες συνθήκες καταπόνησης και στο συνδυασμό αυτών. Η εργασία θα προσπαθήσει να δώσει απάντηση και στο ερώτημα αν η όποια ανθεκτικότητα είναι προϊόν της συμβίωσης ή αν πρόκειται για δύο ιδιαίτερα ανθεκτικούς οργανισμούς που συγκροτούν το λειχήνα.

Η πιθανή διατήρηση της λειτουργικότητάς των λειχήνων μετά από την έκθεση σε ακραίες συνθήκες θα συσχετιστεί με τη διατήρηση της ικανότητας παραγωγής υδρογόνου σε κλειστά συστήματα, το οποίο αποτελεί το καύσιμο του μέλλοντος. Αν είναι σε θέση να παράγουν υδρογόνο μετά την έκθεσή τους σε αυτές τις συνθήκες, θα αποτελέσουν ένα σημαντικό εργαλείο για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών μελλοντικών διαστημικών αποστολών σε ακραία περιβάλλοντα, ακόμα και σε άλλους πλανήτες. Η δυνατότητα, βάσει των αποτελεσμάτων που θα προκύψουν από την εργασία, για μία δευτερογενή και στοχευόμενη πανσπερμία ελεγχόμενη από τον άνθρωπο θα συζητηθεί.

2.1 Οργανισμοί

2.1.1 Ο Λειχήνας Pleurosticta acetabulum

Ο λειχήνας Pleurosticta acetabulum χρησιμοποιήθηκε για τη διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών. Η φυλογενετική ταξινόμηση του είδους φαίνεται παρακάτω. Το συγκεκριμένο είδος βρίσκεται σε αφθονία στη φύση και η συλλογή του έγινε από κορμούς δέντρων του είδους Acer sempervirens και Quercus coccifera στο όρος Ίδη (HTRS07/TM07 X=578576.83m, Y=1900901.19m). Η συλλογή δειγμάτων έγινε με την άδεια του Υπουργείου Περιβάλλοντος, Ενέργειας και Κλιματικής Αλλαγής, με αριθμό πρωτοκόλλου 108436/956. Ο λειχήνας P. acetabulum ανήκει σε εκείνους που ένας μύκητας Ascomycota συμβιώνει με ένα μονοκύτταρο χλωροφύκος του

Βασίλειο: ΜύκητεςΔιαίρεση: AscomycotaΚλάση: LecanoromycetesΤάξη: LecanoralesΟικογένεια: ParmeliaceaeΓένος: PleurostictaΕίδος: Pleurosticta acetabulum

γένους *Trebouxia*. Μορφολογικά μοιάζει με φύλλο, το οποίο στη μεταβολικά ανενεργή κατάσταση έχει σκούρο πράσινο προς καφέ χρώμα, ενώ όταν αναγεννηθεί το χρώμα γίνεται έντονο ανοιχτό πράσινο (Εικόνα 15).

Το πρωτόκολλο για την αναγέννηση περιλαμβάνει τη βύθιση του ξηρού λειχήνα σε dH₂O για 10 λεπτά. Έπειτα μεταφέρεται σε απορροφητικό χαρτί και εμποτίζεται με επιπλέον dH₂O, ώστε να παραμείνει σε υγρό περιβάλλον. O λειχήνας, μαζί με το υγρό χαρτί που τον περιβάλλει, μεταφέρεται σε zip lock

σακουλάκι, το οποίο εξασφαλίζει τη διατήρηση της υγρασίας σε όλη τη διάρκεια της αναγέννησης. Αφού παραμείνει σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα, ο λειχήνας μεταφέρεται στους 4°C και παραμένει εκεί για επιπλέον 16 ώρες.



Εικόνα 15: Αριστερά: Ο λειχήνας Pleurosticta acetabulum σε αδρανή κατάσταση. Δεξιά: Ο λειχήνας Pleurosticta acetabulum σε μεταβολικά ενεργή κατάσταση.

2.1.2 Τα Μονοκύτταρα Χλωροφύκη *Trebouxia crenulata* και *Scenedesmus obliquus*

Η προμήθεια του χλωροφύκους *Trebouxia crenulata* έγινε από τη CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Scotland, United Kingdom). Το στέλεχος (219/2) έχει απομονωθεί από λειχήνα στην περιοχή της Αγγλίας (Richardson, 1965), ενώ το ίδιο είδος έχει απομονωθεί από το λειχήνα *Ramalina capitata* στην περιοχή της Αυστρίας (Tschaikner et al., 2007). Η φυλογενετική ταξινόμηση του στελέχους φαίνεται παρακάτω. Πρόκειται για μονοκύτταρο, ευκαρυωτικό, φωτοσυνθετικό οργανισμό. Μορφολογικά, τα κύτταρα είναι σφαιρικά και ελαφρώς ωοειδή, διαμέτρου 10-16μm (Εικόνα 16). Ο χλωροπλάστης διαιρείται σε πολλαπλούς λοβούς, στους οποίους υπάρχει άμυλο με τη μορφή κόκκων. Κεντρικά διακρίνεται ένα μεγάλο πυρηνοειδές (Tschaikner et al., 2007). Η καλλιέργεια του φύκους *T. crenulata* γίνεται αυτότροφα, σε θρεπτικό μέσο BB (Bold's Basal Medium, Stein, 1973). Η σύσταση του θρεπτικού μέσου φαίνεται στον Πίνακα 1. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 20°C υπό ανάδευση, σε συνθήκες συνεχούς φωτισμού με ένταση 150μmol/m²s.

Το στέλεχος Scenedesmus obliquus που χρησιμοποιήθηκε είναι το αγρίου τύπου D3, το οποίο απομονώθηκε το 1966 από το Lhotsky,O. Η φυλογενετική ταξινόμηση φαίνεται παρακάτω. Πρόκειται για ένα μονοκύτταρο ευκαρυωτικό οργανισμό, τα κύτταρα του οποίου έχουν ωοειδές σχήμα και μήκος 5-10μm, ενώ διακρίνονται και χλωροπλάστες (Εικόνα 17). Η καλλιέργειά του έγινε αυτότροφα σε θρεπτικό μέσο των Bishop and Senger (1971). Η σύσταση του θρεπτικού μέσου φαίνεται στον Πίνακα 1. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε ειδική κατασκευή, η οποία εξασφαλίζει τη συνεχή παροχή αέρα στις καλλιέργειες και σε θερμοκρασία 30°C, με συνεχή φωτισμό 150μmol/m²s.

Βασίλειο: Φυτά Διαίρεση: Χρωρόφυτα Κλάση: Χλωροφύκη Τάξη: Trebouxiales Οικογένεια: Trebouxiaceae Γένος: Trebouxia Είδος: Trebouxia crenulata



Εικόνα 16: Κύτταρα Trebouxia crenulata, όπως απομονώθηκαν από το λειχήνα Ramalina capitata (Tschaikner et al., 2007).

Βασίλειο: Φυτά Διαίρεση: Χρωρόφυτα Κλάση: Χλωροφύκη Τάξη: Chlorococcales Οικογένεια: Scenedesmaceae Γένος: Scenedesmus Είδος: Scenedesmus obliquus



Εικόνα 17: Κύτταρα Scenedesmus obliquus, όπως απομονώθηκαν από το Lhotsky,O, 1966.

Bold's Basal Medium			Bishop-Senger Medium	
	Stock	ml/litre		Συγκέντρωση
	Διάλυμα			
KH ₂ PO ₄	8,75 g/500 ml	10 ml	KNO ₃	8x10 ⁻³ M
CaCl ₂ ⁻ 2H ₂ O	1,25 g/500 ml	10 ml	NaCl	8x10 ⁻³ M
MgSO ₄ [·] 7H ₂ O	3,75 g/500 ml	10 ml	Na ₂ HPO ₄ [·] 2H ₂ O	10^{-3} M
NaNO ₃	12,5 g/500 ml	10 ml	NaH ₂ PO ₄ [·] 2H ₂ O	$3x10^{-3}M$
K ₂ HPO ₄	3,75 g/500 ml	10 ml	CaCl ₂ [·] 2H ₂ O	10 ⁻⁴ M
NaCl	1,25 g/500 ml	10 ml	MgSO ₄ [.] 7H ₂ O	10 ⁻³ M
Na ₂ EDTA	10 g/L	1 ml	Fe(III)-citrate	10^{-3} M
КОН	6,2 g/L		``	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,98 g/L	1 ml	Fe ₂ (SO ₄) ₃ ⁻⁷ H ₂ O	7,5x10 ⁻⁶ M
H ₂ SO ₄ (conc.)	1 ml/L			5
H ₃ BO ₃	5,75 g/500 ml	0,7 ml	H ₃ BO ₃	$4,5x10^{-3}M$
Trace Metal			MnCl ₂ [·] 4H ₂ O	8x10 ⁻⁶ M
Solution:				
Ουσία	g/litre		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	$7x10^{-7}M$
H_3BO_3	2,86 g		MoO ₃	10^{-7} M
MnCl ₂ [·] 4H ₂ O	1,81 g		CuSO ₄ ·5H ₂ O	$3x10^{-7}M$
ZnSO ₄ [·] 7H ₂ O	0,222 g	1 ml		
Na MoO ₄ ·5H ₂ O	0,390 g			
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079g			
Co(NO ₃) [•] 6H ₂ O	0,0494 g			

Πίνακας 1: Η σύσταση του θρεπτικού μέσου Bold's Basal (αριστερά) και του θρεπτικού μέσου Bishop-Senger (δεζιά).

2.2 Πειραματικοί Χειρισμοί

Ο χειρισμός ελέγχου (μάρτυρας) για όλα τα πειράματα ήταν δείγμα λειχήνα σε ξηρή κατάσταση (L) ή δείγμα αναγεννημένου λειχήνα (LR). Άλλες καταστάσεις που μελετήθηκαν ήταν η επώαση ξηρού και αναγεννημένου λειχήνα σε υγρό άζωτο, δηλαδή θερμοκρασία -196°C. Στην πρώτη περίπτωση, ο ξηρός λειχήνας έμεινε 30 λεπτά σε υγρό άζωτο και 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου πριν γίνει η αναγέννηση (LNR). Στη δεύτερη περίπτωση, ο ήδη αναγεννημένος λειχήνας μπήκε για 30 λεπτά σε υγρό άζωτο και έμεινε 1 ώρα για να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου (LRN). Τέλος, δείγμα λειχήνα από το χειρισμό LNR έμεινε 24 ώρες σε στεγνό περιβάλλον και σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να μεταβεί στην ξηρή κατάσταση, ενώ στη συνέχεια μπήκε (LNR_LNR). Οι μεταβολές στη θερμοκρασία περιβάλλοντος του λειχήνα, αλλά και η μετάβαση από την ξηρή στην ενυδατωμένη κατάσταση φαίνονται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Η μεταβολή της θερμοκρασίας και της υγρασίας στους χειρισμούς λειχήνα L, LNR και LNR_LNR. Στους χειρισμούς LR και LRN, που δεν παρουσιάζονται εδώ, ο ζηρός λειχήνας (L) με μηδενική υγρασία και σε θερμοκρασία 25°C, αναζωογονείται, αποκτά υγρασία στο 80% (χειρισμός LR) και στη συνέχεια επωάζεται στους -196°C για μισή ώρα (χειρισμός LRN), πριν επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου.

2.3 Μέτρηση Επαγωγικού Φθορισμού

Η μέτρηση του επαγωγικού φθορισμού έγινε με τη συσκευή Handy Plant Efficiency Analyser (Handy PEA, Hansatech Instruments, Εικόνα 19). Η συσκευή αυτή χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης, μόνο ένα μέρος της φωτονιακής ενέργειας απορροφάται από τις χρωστικές των

φωτοσυστημάτων και χρησιμοποιείται στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης, ενώ το υπόλοιπο εκπέμπεται με τη μορφή θερμότητας ή φθορισμού. Η διαδικασία της μέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι, όταν τα ενεργά κέντρα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού έχουν «αδειάσει» από ηλεκτρόνια σε συνθήκες σκότους και βρεθούν υπό συνεχή φωτισμό, τα επίπεδα φθορισμού μεταβαίνουν από ένα αρχικό επίπεδο (F_o) σε ένα μέγιστο επίπεδο (F_m) και έπειτα μειώνονται σταδιακά. Έτσι, μπορεί να εκτιμηθεί ο λόγος F_v/F_m, όπου



Εικόνα 19: Η συσκευή Handy PEA και τα ειδικά clips για τη μέτρηση του επαγωγικού φθορισμού.

 $F_v=F_m$ - F_o , ο οποίος σχετίζεται με τη φωτοσυνθετική απόδοση. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή (JIP test, Strasser and Strasser, 1995) δίνει τη δυνατότητα μέτρησης και άλλων παραμέτρων που συνδέονται με τη δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Οι παράμετροι αυτοί φαίνονται στον Πίνακα 2. Η μέτρηση του επαγωγικού φθορισμού σε δείγματα λειχήνα έγιναν προσαρμόζοντας ειδικά clips στην επιφάνεια του λειχήνα, τα οποία εξασφαλίζουν ότι αυτή η περιοχή θα βρίσκεται σε σκοτάδι για τουλάχιστον 5 λεπτά, προκειμένου να αδειάσουν τα ενεργά κέντρα αντίδρασης και στη συνέχεια να γίνει η μέτρηση του JIP test (Strasser and Strasser, 1995). Οι μετρήσεις της ταχείας

μεταβολής του φθορισμού έγιναν με ανάλυση 10μs σε χρονικό διάστημα 1 δευτερολέπτου. Ο φθορισμός μετρήθηκε με 12-bit ανάλυση και η διέγερση έγινε από 3 διόδους φωτισμού (LEDs) με ένταση ακτινοβολίας μέχρι 3000μΕ ερυθρού φωτός (650nm). Η επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από τις μετρήσεις έγινε με το λογισμικό Biolyser HP 4.0, σύμφωνα με τους Strasser and Strasser (1995).

Μεταβλητή OJIP καμπύλης	Ορισμός
F _t	Τιμή φθορισμού σε χρόνο t μετά την
	ακτινοβόληση
F _{50µs}	Ένταση φθορισμού στα 50 μs
F _{300µs}	Ένταση φθορισμού στα 300 μs
$F_J = F_{2ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα J (2 ms) της
	καμπύλης OJIP
$F_{I} = F_{30ms}$	Ένταση φθορισμού στο βήμα Ι (30 ms) της
	καμπύλης OJIP
$F_P(=F_m)$	Μέγιστη ένταση φθορισμού στο Ρ της
	καμπύλης OJIP
t _{Fm}	Χρόνος σε (ms) που απαιτείται για να
	μεγιστοποιηθεί η ένταση του φθορισμού F_{m}
Area	Συνολική συμπληρωματική περιοχή ανάμεσα
	στην καμπύλη ΟJIP και την ευθεία που
	δι έρχεται από το $\mathbf{F}=\mathbf{F}_{\mathrm{m}}$
Παράμετροι JIP-test	
F _o	Ελάχιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί σε
	«ανοιχτά» κέντρα (open PSII RCs, t = 0)
F _m	Μέγιστη τιμή φθορισμού, που αντιστοιχεί
	στο χρόνο όπου όλα τα κέντρα είναι
	«κλειστά» (closed PSII RCs, $t = t_{Fm}$)
F_v	Μεταβλητή τιμή φθορισμού τη χρονική
	στιγμή t
$F_v = F_m - F_0$	Μέγιστη τιμή μεταβλητής τιμής φθορισμού
$V_t = (F_t - F_0)(F_m - F_0)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού τη χρονική
	στιγμή t
$V_j = (F_j - F_0)(F_m - F_0)$	Σχετική μεταβολή φθορισμού στο βήμα J
$M_0 = (\Delta V / \Delta t)_0 = 4(F300 \mu - F_0) / (F_m - F_0)$	Αρχική κλίση σε m s της καμπύλης $\mathbf{V}=\mathbf{f}(\mathbf{t})$
$S_m = (Area)/(F_m - F_0)$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης
	OJIP (Area), ομαλοποιημένο ως προς F_v

	(αποτελεί μέτρο του αριθμού των				
	οξειδοαναγωγικών κύκλων της QA)				
$S_s = V_j / M_0$	Συμπληρωματικό εμβαδόν της καμπύλης				
	ΟJIP που αντιστοιχεί μόνο στην ΟJ φάση				
	(διάστημα όπου η QA των RC ανάγεται μία				
	φορά)				
$N=S_m/S_s=S_mM_0(1/V_j)$	Μέτρο αριθμού κύκλων αναγωγής της QA				
	στο διάστημα t _{Fm}				
Ειδικές ροές ενέργειας (ανά κέντρο που ανάγει QA)					
$ABS/RC=M_0(1/V_j)(1/\Phi_{p0})$	Μέγεθος λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής				
	κεραίας				
$TR_0/RC=M_0(1/V_J)$	Ενέργεια που παγιδεύεται ανά κέντρο				
	αντίδρασης (t = 0)				
$ET_0/RC=M_0(1/V_J)WO$	Ροή ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης				
	(t = 0)				
DI ₀ /RC=(ABS/RC)-(TR ₀ /RC)	Διαχεόμενη ενέργεια ανά κέντρο αντίδρασης				
	(t=0)				
Αποδόσεις ή λόγοι επιμέρους ροών					
$\Phi_{p0} = TR_0 / ABS = [1 - (F_0 / F_m)]$	Μέγιστη κβαντική απόδοση της πρωτογενούς				
	φωτοχημείας (t = 0)				
$\Psi_0 = ET_0 / TR_0 = 1 - V_J$	Πιθανότητα να προκαλέσει μια διέγερση τη				
	μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου κατά μήκος				
	της αλυσίδας πέρα από την $Q_{\rm A}\text{-}(t=0)$				
$\Phi_{E0} = ET_0 / ABS = [1 - (F_0 / F_m)] \Psi_0$	Κβαντική απόδοση της μεταφοράς				
	ηλεκτρονίων (t = 0)				
$\Phi D_0 = 1 - \Phi_{P0} = F_0 / F_m$	Κβαντική απόδοση της διάχυσης				
	ηλεκτρονίων (t = 0)				
Εκτιμώμενες ροές ενέργειας ανά διεγερμένη	περιοχή				
ABS/CS ₀	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή				
	διέγερσης με βάση το F_o				
ABS/CS _m	Απορρόφηση ενέργειας ανά περιοχή				
	διέγερσης με βάση το F_m				
$TR_0/CS_0 = FP_0(ABS/CS_0)$	Παγιδευμένη ενέργεια ανά διεγερόμενη				
	περιοχή της μεμβράνης (για t = 0)				
$ET_0/CS_0=(ABS/CS_0)$	Ροή ηλεκτρονίων ανά περιοχή διέγερσης				
$DI_0/CS_0 = (ABS/CS_0) - (TR_0/CS_0)$	Διαχεόμενη ενέργεια ανά περιοχή διέγερσης				
Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης					
--	--				
RC/CS ₀	Πυκνότητα ενεργών κέντρων αντίδρασης				
Δείκτες επίδοσης					
$PI_{ABS} = (RC/ABS)(\Phi_{P0}/1-\Phi_{P0})(\Psi_0/1-\Psi_0)$	Επιδόσεις ανά απορροφώμενη ενέργεια				
$PI_{CS0} = (RC/CS_0)(\Phi_{P0}/1 - \Phi_{P0})(\Psi_0/1 - \Psi_0)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης (t = 0)				
$PI_{CSm} = (RC/CS_m)(\Phi_{P0}/1-\Phi_{P0})(\Psi_0/1-\Psi_0)$	Επιδόσεις ανά περιοχή διέγερσης (t = t _{Fm})				
$SFI_{ABS} = (1 - \Phi_{P0})(1 - \Psi_0)$	Δείκτης λειτουργικότητας				

Πίνακας 2: Βασικές παράμετροι του JIP-TEST

2.4 Προσδιορισμός Χλωροφύλλης a και b

Η εκχύλιση και η εκτίμηση των ολικών χλωροφυλλών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του Holden (1965). Όλη η διαδικασία γίνεται υπό πράσινο φωτισμό χαμηλής έντασης, ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση των χλωροφυλλών. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, 100-200mg λειοτριβημένου με υγρό άζωτο ιστού λειχήνα αναμίχθηκαν με 2ml μεθανόλη (HPLC grade), έγινε καλή ανάδευση και θέρμανση του δείγματος στους 70°C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 1500g, για 5 λεπτά στους 25°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και το ίζημα αναμίχθηκε πάλι με 2ml μεθανόλη για δεύτερη φορά και ακολούθησε η ίδια διαδικασία και η συλλογή του υπερκειμένου. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των χλωροφυλλών έγινε φωτομέτρηση των εκχυλισμάτων στα 665nm και 650nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της χλωροφύλλης a και χλωροφύλλης b, σε ng ανά ml εκχυλίσματος, πραγματοποιήθηκε βάσει των παρακάτω εξισώσεων.

Ολικές Χλωροφύλλες = (25,5*E650 + 4*E665)

Χλωροφύλλη a = (16,5*E665 - 8,3*E650)

Χλωροφύλλη b = (33,8*E650 - 12,5*E665)

2.5 Προσδιορισμός Εργοστερόλης

Η απομόνωση της εργοστερόλης έγινε από λειοτριβημένο με υγρό άζωτο ιστό λειχήνα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Dahlman et al. (2002). Σε 50mg λειοτριβημένου ιστού προστέθηκαν 5ml 99,5% αιθανόλη (αναλογία 1:100) και έγινε έντονη ανάδευση. Το δείγμα επωάστηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά σε σκοτάδι. Το σκοτάδι είναι απαραίτητο, καθώς η εργοστερόλη είναι ευαίσθητη στο φως. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 10.000g, για 15 λεπτά στους 25°C. Στο υπερκείμενο βρίσκεται η εργοστερόλη. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός της εργοστερόλης έγινε με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), με στήλη narrow bore C-18 (2,1 mm × 200 mm, 5 μm Hypersil, Hewlett Packard) και ως διαλύτη τη μεθανόλη. Ο διαχωρισμός έγινε σε HPLC (Shimadzu, LC-10AD, VP) σύστημα δύο αντλιών (Shimadzu SPD-M10A). Η ποσοτική ανάλυση έγινε σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς που σχηματίστηκε από γνωστές συγκεντρώσεις εργοστερόλης σε mg και με αναγωγή ανά mg ξηρού βάρους λειχήνα.

2.6 Πολαρογραφική Μέτρηση Φωτοσυνθετικής και Αναπνευστικής Δραστηριότητας

Το σύστημα Clark type ηλεκτροδίου από τη Hansatech χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και της αναπνοής. Η διάταξη του συστήματος περιλαμβάνει ένα ηλεκτρόδιο καθόδου από πλατίνα και ένα ηλεκτρόδιο ανόδου από άργυρο. Ανάμεσά τους τίθεται ηλεκτρική τάση 50V με το κορεσμένο διάλυμα KCl να λειτουργεί ως ηλεκτρολύτης. Η μεταφορά ηλεκτρονίων ανάμεσα στα δύο ηλεκτρόδια γίνεται παρουσία Ο2 και διαμέσου μιας ημιδιαπερατής μεμβράνης που βρίσκεται ανάμεσα στο δείγμα και στα ηλεκτρόδια. Η συγκέντρωση του O₂ που μετράει το σύστημα είναι ανάλογη της έντασης (σε A) του ρεύματος. Η μέτρηση της αναπνοής των δειγμάτων γίνεται σε απόλυτο σκοτάδι, ενώ η μέτρηση της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας γίνεται σε ένταση φωτισμού 550µmol/m²s. Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα O_2 view, το οποίο δίνει την τιμή του οξυγόνου σε σχέση με τον αέρα (Relative to air, RTA) και το ρυθμό παραγωγής/κατανάλωσης οξυγόνου ανά λεπτό. Τα δείγματα λειχήνα που πρόκειται να μετρηθούν μπαίνουν στη διάταξη του συστήματος παρουσία συγκεκριμένου διαλύματος [NaHCO₃ (34 mg) και Tricine (8,96 mg) σε 100 ml dH₂O, pH 7,6], το οποίο αποτρέπει τον κίνδυνο η συγκέντρωση του CO2 να είναι ο περιοριστικός παράγοντας της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας. Τα επίπεδα φωτοσύνθεσης και αναπνοής ανάγονται ανά mg ξηρού βάρους λειχήνα και ανά ώρα.

2.7 Προσδιορισμός των Πολυαμινών

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των πολυαμινών σε δείγματα λειχήνα έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Kotzabasis et al. (1993) και με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Για τη διεκπεραίωση του πρωτοκόλλου έγινε λειοτρίβηση των δειγμάτων με υγρό άζωτο και 100-200mg ιστού γρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των πολυαμινών. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την προσθήκη 500μl 1N NaOH, ανάδευση και επώαση για 30 λεπτά στους 25°C. Ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου 36% HCl και υδρόλυση των δειγμάτων στους 110°C για 18 ώρες. Το υπερκείμενο από κάθε δείγμα εξατμίστηκε στους 80°C και έγινε επαναδιάλυση των δειγμάτων σε 350μl 5% (v/v) PCA (Perchloric acid). Επόμενο βήμα είναι η βενζυλίωση των πολυαμινών με προσθήκη 1ml 2N NaOH και 10μl Benzoyl-Chloride, καλή ανάδευση και επώαση για 30 λεπτά στους 25°C. Η αντίδραση της βενζυλίωσης σταματάει με την προσθήκη 2ml κορεσμένου διαλύματος NaCl. Η εκχύλιση των πολυαμινών έγινε με προσθήκη 2ml διεθυλ-αιθέρα, καλή ανάδευση και απομόνωση της πάνω φάσης του διέθυλ-αιθέρα, η οποία στη συνέχεια εξατμίζεται στους 55°C. Οι απομονωμένες πολυαμίνες διαλυτοποιούνται σε 200μl 63% (v/v) μεθανόλη και ένα δείγμα 50μl αναλύεται στην HPLC. Η ανάλυση στην HPLC, έγινε με στήλη narrow bore C-18 (2,1 mm × 200 mm, 5 μm Hypersil, Hewlett Packard) και ένα σύστημα δύο διαλυτών που περιλάμβανε μια διαβάθμιση μεθανόλης (55%-84%, v/v). Ο διαχωρισμός έγινε σε HPLC (Shimadzu, LC-10AD, VP) σύστημα δύο αντλιών (Shimadzu SPD-M10A). Η ποσοτική ανάλυση έγινε με τις εξισώσεις σύμφωνα με τους Kotzabasis et al., (1993). Τα επίπεδα των πολυαμινών σε κάθε δείγμα ανάγονται ανά mg ξηρού βάρους λειχήνα.

2.8 Απομόνωση και Ποσοτικοποίηση Ολικών Πρωτεϊνών

Η απομόνωση ολικών πρωτεϊνών έγινε από 1-2gr παγωμένου, λειοτριβημένου με υγρό άζωτο, ιστού λειχήνα. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 1,5 όγκοι από το διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών (200mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA, 200mM NaCl, 200mM MgCl₂, 0,5mM PMSF, 5mM DTT, 10μM λευπεπτίνη, 10% (v/v) γλυκερόλη και 0,25% Triton X-100). Το διάλυμα αναδεύτηκε με τον ιστό και έμεινε στον πάγο για τουλάχιστον 30 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 16.000g, για 30 λεπτά, στους 4°C. Στο υπερκείμενο βρίσκονται οι πρωτεΐνες.

Ένα δείγμα 20μl από το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Lowry et al. (1951). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτής της μεθόδου, σε 20μl πρωτεϊνικού δείγματος προστέθηκε ίσος όγκος 20% Τριχλωρο-οξικό οξύ (TCA), έγινε ανάδευση και τα δείγματα έμειναν στους 4°C για 30 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 16.000g, για 10 λεπτά στους 25°C. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και στο ίζημα έχουν κατακρημνιστεί οι πρωτεΐνες, οι οποίες επαναδιαλύονται σε 100μl διάλυμα A (10gr Na₂CO₃, 0,1gr K-Na Tartate και 2gr NaOH σε 500ml dH₂O). Σε αυτό προστέθηκε 1ml από το διάλυμα Γ [διαλύματα A και B σε αναλογία 50:1 (διάλυμα B: 0,5gr CuSO₄•5H₂O σε 100ml dH₂O)] και έγινε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκε το διάλυμα Δ (Follin-Ciocalteau και dH₂O σε αναλογία 1:1) και έγινε επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την τελευταία επώαση, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 625nm. Η τιμή της φωτομέτρησης δίνει την ποσότητα των πρωτεϊνών, λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η οπτική πυκνότητα 1 (OD=1) αντιστοιχεί σε 80mg πρωτεϊνών, με βάση την πρότυπη καμπύλη που σχεδιάστηκε με γνωστές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης BSA (Bovine Serum Albumin). Ως αρνητικό πείραμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε δείγμα με τα διαλύματα Α, Γ και Δ, αλλά χωρίς πρωτεΐνες (100μl Α, 1ml Γ και 100μl Δ).

2.9 Αποδιατακτική Ηλεκτροφόρηση σε Πήκτωμα Ακρυλαμίδης

Η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης στοχεύει στο διαχωρισμό ενός πρωτεϊνικού δείγματος με βάση το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Για την πραγματοποίηση αυτής της μεθόδου δημιουργείται ένα πήκτωμα, το οποίο ουσιαστικά αποτελείται από δύο διακριτά πηκτώματα (Πίνακας 3). Στο πάνω πήκτωμα γίνεται το πακετάρισμα των πρωτεϊνών (stacking gel). Στο κάτω πήκτωμα γίνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος (resolving gel) και έχει σύσταση ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών. Όσο πιο μικρό μέγεθος έχει η πρωτεΐνη, τόσο μεγαλύτερη είναι η πυκνότητα του πηκτώματος.

Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού δείγματος που φορτώθηκε στα πηκτώματα είναι 50µg. Κάθε δείγμα αναμιγνύεται με 6x Sample Buffer [25 ml 20% (v/v) SDS,13 ml 1M Tris-HCl pH 6,8, 0,24g bromophenol-blue και γλυκερόλη μέχρι τα 50ml, 7 μl β-μερκαπτοαιθανόλη/ ml sample buffer]. Ακολουθεί θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C για 5 λεπτά, ώστε να αποδιαταχτούν οι πρωτεΐνες και τα δείγματα επιστρέφουν αμέσως στον πάγο. Η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 1X running buffer με 10% SDS (0,0025 M Tris base, 0,0192 M Γλυκίνη pH 8.3 dH₂O μέχρι τα 1000ml). Το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται έχει σταθερή τάση μεταξύ 80-150 Volt, αλλά αυξανόμενη ένταση.

Η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση ακολουθείται από τη χρώση του πηκτώματος με Coomassie Brilliant Blue R-250. Με τη χρώση μπορούν να γίνουν ορατές οι πρωτεϊνικές ζώνες. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατό να επαληθευτεί εάν τα δείγματα είναι ισοφορτωμένα με βάση μια επιθυμητή πρωτεϊνική συγκέντρωση, ενώ μπορούν να παρατηρηθούν και διαφορές λόγω της ύπαρξης διαφορετικών χειρισμών. Επομένως, οι πρωτεϊνικές ζώνες έγιναν ορατές με 0,1% διάλυμα χρώσης (0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% Μεθανόλη, 10% Οξικό οξύ) με επώαση για 15 λεπτά. Ο αποχρωματισμός του πηκτώματος, ώστε να μείνουν ορατές μόνο οι πρωτεϊνικές ζώνες, γίνεται με το αντίστοιχο διάλυμα αποχρωματισμού (50% Μεθανόλη, 10% Οξικό οξύ).

Πηκτώματα Ακρυλαμίδης			
12% resolving gel	10% resolving gel	4% stacking gel	
3,75ml 4xTris-HCl pH 8.8	3,75ml 4xTris-HCl pH 8.8	1,85ml 4xTris-HCl pH 6.8	
6ml Acryl-Bis 30:0,8	5ml Acryl-Bis 30:0,8	1ml Acryl-Bis 30:0,8	
0,3ml 50% Glycerol	0,29ml 50% Glycerol	26µl 10% APS	
60µl 10% APS	64µl 10% APS	11µl Temed	
5µl Temed	5µl Temed	4,5ml dH ₂ O	
4,9ml dH ₂ O	5,9ml dH ₂ O		

Πίνακας 3: Τα συστατικά για 12% και 10% resolving gel και για 4% stacking gel.

2.10 Ανοσοεντοπισμός με Στύπωμα Western

Η ανάλυση με στύπωμα Western δίνει τη δυνατότητα εντοπισμού μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, με την προϋπόθεση ότι υπάρχει ένα ειδικό αντίσωμα που αναγνωρίζει τμήμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της πρωτεΐνης αυτής. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, πρωτεϊνικά δείγματα από λειχήνες σε συγκέντρωση 50μg διαχωρίστηκαν σε 10%-12% πήκτωμα ακρυλαμίδης. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε μια συσκευή μεταφοράς με την οποία οι διαχωρισμένες πλέον πρωτεΐνες του πηκτώματος μεταφέρονται σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Porablot, 0,45 μm, Machelrey-Nagel GmbH&Co.KG.Duren) με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 80V για 1 ώρα. Για τη μεταφορά χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα 1X running buffer, χωρίς την προσθήκη 10% SDS, ενώ η διαδικασία έγινε παρουσία πάγου. Τα επόμενα βήματα αφορούν στη μεταχείριση της μεμβράνης στην οποία βρίσκονται πλέον οι πρωτεϊνικές ζώνες. Πρώτα γίνεται μία πλύση επί 10 λεπτά με διάλυμα 1xPBS (0,8g NaCl, 0,02g KH2PO4 0,1125g Na2HPO4, 0,02g KCl, pH 7 dH2O μέχρι τα 1000ml) και ακολουθεί το διάλυμα αποκλεισμού, το οποίο αποτελείται από 2-5% αποβουτυρωμένο γάλα Regilait διαλυτοποιημένο σε 1xPBS, το οποίο μένει στη μεμβράνη για 1 ώρα. Το διάλυμα αποκλεισμού αφαιρείται και η μεμβράνη πλένεται 2x10 λεπτά με 1xPBS+0,05% Tween20 και 2x5 λεπτά με 1xPBS. Ακολουθεί η επώαση με το πρώτο αντίσωμα, το οποίο είναι εξειδικευμένο για την επιθυμητή πρωτεΐνη. Το διάλυμα του αντισώματος περιέχει 50ml 1xPBS, 0,05% Tween20, 500mg BSA και το αντίσωμα σε κατάλληλη αραίωση. Αφού γίνει η επώαση για 1 ώρα, γίνονται πλύσεις 2x10 λεπτά με 1xPBS+0,005% Tween20 και 2x5 λεπτά με 1xPBS, ώστε να απομακρυνθούν τα μόρια του αντισώματος που δεν προσδέθηκαν. Το δεύτερο αντίσωμα επωάζεται επίσης για 1 ώρα και βρίσκεται σε διάλυμα 50ml 1xPBS, 0,05% Tween20 και 500mg BSA, ενώ είναι αραιωμένο 1/500 και είναι εξειδικευμένο για το πρώτο αντίσωμα. Επαναλαμβάνονται οι πλύσεις με 1xPBS+0,05% Tween20 και 1xPBS για την απομάκρυνση των μη προσδεδεμένων μορίων. Τέλος, γίνεται μια πλύση με dH2O για 15 λεπτά, ώστε να αποφευχθούν τυχόν αλληλεπιδράσεις του Tween20 με τα διαλύματα

εμφάνισης, τα οποία προστίθενται αμέσως αφού στεγνώσει ελαφρά η μεμβράνη. Οι πρωτεϊνικές ζώνες γίνονται ορατές με χρώση με το kit χημειοφωταύγειας, υποστρώματος HRP (Chemiluminescent HRP substrate kit, Lumisensor), το οποίο αποτελείται από ένα διάλυμα αντίδρασης (A) και ένα διάλυμα ενίσχυσης (B). Το διάλυμα Α αναμιγνύεται με ίσο όγκο του B και μαζί επωάζονται πάνω στη μεμβράνη για πέντε λεπτά. Έπειτα, η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδική κασέτα εμφάνισης μαζί με φιλμ εμφάνισης FUJIFILM medical x-ray.

2.11 Ποσοτική Εκτίμηση Η₂ με τη Χρήση GC-TCD

Η δυνατότητα παραγωγής H_2 από τους λειχήνες, όταν αυτοί βρίσκονται σε διάφορες συνθήκες ελέγχθηκε με Αέρια Χρωματογραφία Θερμικής Αγωγιμότητας GC-TCD (Hewlett Packard 5890 Series II), με φέρον αέριο αργό υπό πίεση 5bar. Ταυτόχρονα, έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός και του O_2 που υπάρχει στο δείγμα. Ο διαχωρισμός των αερίων γίνεται βάσει της διαφορετικής θερμικής αγωγιμότητάς τους. Η θερμοκρασία του TCD ανιχνευτή ήταν 200°C, του φούρνου 120°C και του σημείου ένεσης 180°C. Η ποσοτικοποίηση του H_2 και του O_2 έγινε με καμπύλες αναφοράς που σχηματίστηκαν με βάση γνωστές συγκεντρώσεις H_2 και O_2 . Η τελική ποσότητα των αερίων προέκυψε με αναγωγή ανά γραμμάριο (gr) ξηρού βάρους λειχήνα. Τα δείγματα που ελέγχθηκαν για την παραγωγή H_2 ήταν τα LR, LNR και LNR_LNR με 2gr αρχικού ξηρού βάρους, σε ένταση φωτισμού 50-60μΕ, αλλά και σε σκοτάδι. Τα δείγματα μπήκαν σε μπουκάλια με 10ml dH₂O + 5gr/L γλυκόζη και έκλεισαν ερμητικά με septum. Οι μετρήσεις έγιναν για 5 ημέρες και κάθε μέρα 250μl αέριου δείγματος αναλύονταν στη GC.

2.12 Προσδιορισμός των σακχάρων

Η απομόνωση των ολικών υδατοδιαλυτών ενδοκυτταρικών σακχάρων έγινε σε 180mg ξηρού βάρους ολόκληρου λειχήνα και η ποσοτικοποίηση έγινε με την αντίδραση Molisch. Στα δείγματα από κάθε χειρισμό προστέθηκαν 2ml dH₂O και μπήκαν στο φούρνο μικροκυμάτων (~600W) τρεις φορές για 10sec κάθε φορά, με ενδιάμεσα διαλείμματα στον πάγο μέχρι να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να απελευθερωθούν τα ενδοκυτταρικά σάκχαρα. Στη συνέχεια έγινε ποσοτική εκτίμηση με την αντίδραση Molisch. Σε 100μl δείγματος, που περιέχει πλέον τα σάκχαρα, προστέθηκαν 1ml θεϊικό οξύ (H₂SO₄) και 10μl a-naphthol και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 ώρες. Τα δείγματα αποκτούν ένα ιώδες χρώμα, το οποίο είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των σακχάρων. Η ποσοτικοποίηση γίνεται με τη μέτρηση της απορρόφησης στα 565nm και γίνεται αναγωγή σε μmol σακχάρων ανά gr ξηρού βάρους λειχήνα, με βάση την καμπύλη αναφοράς που σχεδιάστηκε με γνωστές συγκεντρώσεις σακχάρων.

2.13 Προσδιορισμός των λιπαρών οξέων

Για την ανάλυση των λιπαρών οξέων, λειοτριβημένα δείγματα λειχήνα εκχυλίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Bligh and Dyer (1959) και η ανάλυση τους έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο του Kates (1972). Μεθυλ-εστέρες προέκυψαν μετά από σαπωνοποίηση με 0,5N NaOH και μεθυλίωση με 14% boron trifluoride-methanol (Metcalfe et al., 1966). Στη συνέχεια, οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία με FID ανιχνευτή (Hewlett Packard, 5890-Series II), τριχοειδή στήλη (SGE-BPX 70, μήκους 50m, διαμέτρου 0.22mm και πάχους 0.25μm) και ένα ακροφύσιο τριχοειδούς εισόδου (19251A). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο και ως βοηθητικό αέριο το άζωτο, με ρυθμό ροής 36 ml/min. Ο ρυθμός ροής του υδρογόνου και του συμπιεσμένου αέρα για τον FID ήταν 30 ml/min και 330 ml/min, αντίστοιχα. Η θερμοκρασία του σημείου ένεσης ήταν 320°C, του FID 300°C και της στήλης 155°C για 1min, έπειτα αυξήθηκε γραμμικά με ρυθμό 2°C/min μέχρι τους 180°C, ακολούθως αυξήθηκε στους 210°C με ρυθμό 5°C/min και τέλος στους 220°C με ρυθμό 2°C/min και παρέμεινε εκεί για 12 λεπτά μέχρι το τελικό στάδιο. Ο όγκος του κάθε δείγματος που αναλύθηκε στην GC-FID ήταν 0,1μl.

Ο καθορισμός κάθε κορυφής έγινε με διαλύματα ενώσεων αναφοράς (Supelco 18919-1amp FAME mix C₄-C₂₄ και FAMEs από τη Sigma), τα οποία αναλύθηκαν στις ίδιες συνθήκες και έγινε σύγκριση με τις κορυφές που προέκυψαν από τα δείγματα των λειχήνων, με βάση το χρόνο ανάκτησης. Η αναλογία κάθε ουσίας εκφράζεται ως ποσοστό (%) από το εμβαδόν της κορυφής προς το ολικό εμβαδόν των κορυφών που προκύπτουν σε όλο το χρωματόγραμμα. Η ακρίβεια των αποτελεσμάτων είναι μεγαλύτερη του \pm 5%. Η στατιστική ανάλυση του χρωματογράμματος έγινε με το λογισμικό HP GC-Chem Station, Rev. A. 06.03 [509], 1990-1998.

3.1 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του λειχήνα σε απόλυτη ξηρασία και ακραία χαμηλή θερμοκρασία

3.1.1 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του χλωροφύκους

Η μέτρηση του επαγωγικού φθορισμού είναι ένας τρόπος για τον έλεγχο της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Στην παρούσα εργασία η μέτρηση έγινε με τη συσκευή Handy Plant Efficiency Analyser (Handy PEA), ώστε να ελεγχθεί η κατάσταση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του χλωροφύκους του λειχήνα. Η μέτρηση έγινε για τους χειρισμούς LR, LNR, LNR_LNR και LRN. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η σχετική τιμή επαγωγικού φθορισμού σε σχέση με το χρόνο. Κάθε καμπύλη ακολουθεί το χαρακτηριστικό σχήμα (OJIP καμπύλη), που υποδηλώνει την καλή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.



Εικόνα 20: Σχετική τιμή επαγωγικού φθορισμού σε σχέση με το χρόνο.

Επιπροσθέτως, οι μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού δίνουν πληροφορίες για μια σειρά παραμέτρων, οι οποίες αντικατοπτρίζουν την κατάσταση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και κατ' επέκταση του χλωροφύκους. Για τους τρεις χειρισμούς παρατίθεται ένα αραχνοειδές γράφημα με όλες τις παραμέτρους που προέκυψαν από τις μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού (Εικόνα 21). Ο χειρισμός LR χρησιμοποιείται ως χειρισμός ελέγχου και οι LNR και LNR_LNR συγκρίνονται με αυτόν. Στο χειρισμό LRN ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός του χλωροφύκους έχει καταπονηθεί σε βαθμό που δεν επιτρέπει στη συσκευή να πάρει αξιόπιστες μετρήσεις για ολες τις παραμέτρους που αντανακλούν την κατάστασή του. Παρόλ' αυτά, ανακτήθηκαν τιμές για επιλεγμένες παραμέτρους, που παρατίθενται παρακάτω σε αραχνοειδή γραφήματα (Εικόνα 22) και είναι αντιπροσωπευτικές για τη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Επιπλέον, παρουσιάζονται συγκριτικά ραβδογράμματα για τις ίδιες παραμέτρους (Εικόνα 23).



Εικόνα 21: Ολικό αραχνοειδές γράφημα για όλες τις παραμέτρους που προέκυψαν από το JIP test.

Οι παράμετροι που επιλέχτηκαν να μελετηθούν λεπτομερέστερα είναι ο λόγος ABS/RC, που αντιστοιχεί στο μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, ο λόγος RC/CSo, που αναφέρεται στην πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης, η παράμετρος PSIo, που συνδέεται με τη πρωτογενή φωτοχημεία του συστήματος, ο λόγος DIo/RC, που συνδέεται με την ενέργεια που διαχέεται μη φωτοχημικά από τα ενεργά κέντρα, ο λόγος ETo/RC, που εκφράζει την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης, ο λόγος TRo/RC, που αντιστοιχεί στην ενέργεια που παγιδεύεται από τα ενεργά κέντρα, η παράμετρος PI(abs) και ο λόγος Fv/Fm, που αναφέρονται στην απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.



Εικόνα 22: Αραχνοειδή γραφήματα για τις επιλεγμένες παραμέτρους του JIP test που δείχνουν την κατάσταση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. **Α.** Το γράφημα για τους χειρισμούς LR, LNR και LNR LNR. **B.** Το γράφημα για τους χειρισμούς LR, LNR, LNR, LNR και LRN.

Τα αραχνοειδή γραφήματα δείχνουν πώς μεταβάλλονται οι παραπάνω παράμετροι στους χειρισμούς LNR, LNR_LNR και LRN συγκριτικά με το χειρισμό ελέγχου LR. Οι μεταβολές φαίνονται και στα παρακάτω διαγράμματα, όπου παρατίθενται οι πραγματικές τιμές των παραμέτρων στον κάθε χειρισμό. Η εικόνα που επικρατεί σχεδόν σε όλα τα ραβδογράμματα είναι ότι οι χειρισμοί LNR και LNR_LNR δε διαφοροποιούνται από το χειρισμό ελέγχου, δηλαδή η έκθεση του ξηρού λειχήνα σε υγρό άζωτο δεν επηρεάζει το φωτοσυνθετικό μηχανισμό και κατ' επέκταση το χλωροφύκος και το λειχήνα. Αντίθετα, στο χειρισμό LRN φαίνεται να αυξάνεται το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC), με αποτέλεσμα την αύξηση της ενέργειας που διαχέεται μη φωτοχημικά (DIo/RC). Αυτό οδηγεί σε μείωση της πρωτογενούς φωτοχημείας (PSIo), μείωση της ενέργειας που παγιδεύεται στα ενεργά κέντρα (TRo/RC) και μείωση της ροής ηλεκτρονίων που μεταφέρονται από τα κέντρα αντίδρασης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (ETo/RC). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τελικά να μειώνεται η απόδοση της φωτοσύνθεσης, όπως φαίνεται από τη μείωση των PI(abs) και Fv/Fm. Όλα τα παραπάνω παρουσιάζουν μια εικόνα καταπόνησης για το χειρισμό LRN. Βέβαια, η τιμή Fv/Fm δείχνει ότι ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός δεν έχει καταρρεύσει εντελώς, απλά έχει καταπονηθεί και ο οργανισμός επιβιώνει.



Εικόνα 23: Τα ραβδογράμματα παρουσιάζουν τις τιμές επιλεγμένων παραμέτρων του JIP test για τους χειρισμούς LR, LNR, LNR_LNR και LRN. **A.** Ο λόγος ABS/RC αντιπροσωπεύει το μέγεθος της λειτουργικής φωτοσυλλεκτικής κεραίας. **B.** Ο λόγος RC/CSo αναφέρεται στην πυκνότητα των ενεργών κέντρων αντίδρασης. **Γ.** Ο λόγος DIo/RC συνδέεται με την ενέργεια που διαχέεται μη φωτοχημικά από τα ενεργά κέντρα **Δ.** Η παράμετρος PSIo συνδέεται με τη πρωτογενή φωτοχημεία του συστήματος. **Ε.** Ο λόγος ETo/RC εκφράζει την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ανά κέντρο αντίδρασης. **ΣΤ.** Ο λόγος TRo/RC αντιστοιχεί στην ενέργεια που παγιδεύεται από τα ενεργά κέντρα. **Ζ.** Η παράμετρος PI(abs) αναφέρεται στην απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. **Η.** Ο λόγος Fv/Fm απεικονίζει την απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

Επιπλέον πληροφορίες για το φωτοσυνθετικό μηχανισμό μπορεί να δώσει ο ανοσοεντοπισμός με στύπωμα western, για τις κύριες πρωτεΐνες του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Επιλέχθηκε το κυτόχρωμα f του συμπλόκου Cytb₆f και η πρωτεΐνη PSaA του PSI, επειδή αυτές οι πρωτεΐνες

εμπλέκονται τόσο στη γραμμική όσο και στην κυκλική ροή ηλεκτρονίων. Στην Εικόνα 24 φαίνονται τα αποτελέσματα του στυπώματος western για την πρωτεΐνη PSaA και για το κυτόχρωμα f, για τους χειρισμούς L, LR, LNR, LNR_LNR και LRN. Πράγματι, η εικόνα των στυπωμάτων western δείχνει ότι δομικά ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός δεν έχει επηρεαστεί αρνητικά, ακόμα και στο χειρισμό LRN.



Εικόνα 24: Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης PSaA και του Cyt f στους πέντε χειρισμούς.

3.1.1.1 Φωτοσυνθετικές Χρωστικές - Χλωροφύλλες

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έδειξαν ότι στην περίπτωση του χειρισμού LRN υπάρχει στρες, αλλά ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός δεν έχει καταρρεύσει, ενώ οι άλλοι χειρισμοί ακολουθούν την ίδια συμπεριφορά με το χειρισμό ελέγχου. Ένας παράγοντας που μπορεί να δώσει επιπλέον πληροφορίες για την κατάσταση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και για τα κύτταρα του χλωροφύκους είναι οι χλωροφύλλες. Στην Εικόνα 25 παρουσιάζονται τα επίπεδα των χλωροφυλλών a και b, αλλά και το άθροισμά τους για τους χειρισμούς LR, LNR, LNR_LNR και LRN, καθώς και για ένα δείγμα ξηρού λειχήνα (L).

Αυτό που φαίνεται στο ραβδόγραμμα είναι ότι στην ξηρή κατάσταση του λειχήνα τα επίπεδα των χλωροφυλλών είναι χαμηλότερα, ενώ αρχίζουν να αυξάνονται όταν ο λειχήνας αναζωογονείται. Μάλιστα, τα επίπεδα της χλωροφύλλης b είναι σχετικά ίδια σε όλους τους χειρισμούς, συμπεριλαμβανομένης και της ξηρής κατάστασης L, και η αύξηση οφείλεται πρωτίστως στη χλωροφύλλη a. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι τιμές των χλωροφυλλών για το χειρισμό LRN, οι οποίες φαίνεται να είναι σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με το χειρισμό ελέγχου LR. Παρόλο που ο επαγωγικός φθορισμός έδειξε καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, οι χλωροφύλλες διατηρούν την ακεραιότητά τους.



Εικόνα 25: Τα επίπεδα της χλωροφύλλης a, της χλωροφύλλης b αλλά και το άθροισμά τους για τους πέντε χειρισμούς. Φαίνεται η αύζηση της chl a, αλλά τα επίπεδα της chl b μένουν σταθερά σε όλους τους χειρισμούς.

Η αύξηση των χλωροφυλλών στο χειρισμό LRN δικαιολογείται από την αύξηση του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (ABS/RC), όπως φάνηκε παραπάνω στην Εικόνα 23.

Στην Εικόνα 26 φαίνεται η αναλογία χλωροφύλλης a προς χλωροφύλλη b. Με εξαίρεση το χειρισμό ξηρού λειχήνα (L), όπου η σχέση chl a/ b είναι 1,5, στους υπόλοιπους χειρισμούς υπάρχει μία σχετικά σταθερή αναλογία chl a/b, με τη χλωροφύλλη a να είναι περίπου τέσσερις φορές περισσότερη από τη b.



Εικόνα 26: Η αναλογία chl a/b για τους πέντε χειρισμούς. Με εξαίρεση το χειρισμό L, στους υπόλοιπους έχει σχετικά σταθερή τιμή.

3.1.2 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του μύκητα

Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας του φωτοβιώτη πραγματοποιήθηκε μέσω του ελέγχου της μοριακής δομής και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με τη χρήση μη επεμβατικών τεχνικών επαγωγικού φθορισμού. Για να ελεγχθεί η ανθεκτικότητα του μυκοβιώτη, δηλαδή του μύκητα, ελέγχθηκε το επίπεδο ενός βασικού συστατικού των μεμβρανών των μυκήτων, της



εργοστερόλης (Εικόνα 27). Πρόκειται για μία στερόλη, η οποία έχει ρόλο αντίστοιχο με αυτό της χοληστερόλης στα ζωικά κύτταρα (Weete et al., 2010). Λόγω της σπουδαιότητάς της χρησιμοποιείται ως ένδειξη, για να εκτιμηθεί η κατάσταση του μύκητα στο λειχήνα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Dahlman et al., (2002) για την εκχύλιση της εργοστερόλης

Εικόνα 27: Η δομή της εργοστερόλης.

από τους λειχήνες στους χειρισμούς LR, LNR, LNR_LNR και LRN, καθώς και από δείγμα ξηρού λειχήνα (L). Η ποσοτικοποίηση της εργοστερόλης έγινε με HPLC και τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 28.



Εικόνα 28: Τα επίπεδα εργοστερόλης για τους πέντε χειρισμούς. Παρατηρείται αύζηση κατά τη μετάβαση από την ζηρή (L) στην ενυδατωμένη μορφή, αλλά μετά τα επίπεδα μένουν αμετάβλητα.

Τα επίπεδα της εργοστερόλης παρουσιάζουν σαφή αύξηση κατά τη μετάβαση από την ξηρή (L) στην αναγεννημένη κατάσταση (LR). Στους υπόλοιπους χειρισμούς (LNR, LNR_LNR, LRN) δεν εμφανίζεται σημαντική διαφορά σε σχέση με το χειρισμό ελέγχου LR. Ιδιαίτερα για το χειρισμό LRN, στον οποίο το χλωροφύκος φάνηκε να καταπονείται, ο μύκητας έχει τα ίδια επίπεδα εργοστερόλης με το χειρισμό ελέγχου (LR). Φαίνεται, λοιπόν, ότι δομικά ο μύκητας του λειχήνα παραμένει ακέραιος σε όλους τους χειρισμούς. Μία εικόνα για τη λειτουργική κατάσταση του μύκητα μπορεί να δώσει και η αναπνευστική δραστηριότητα, η οποία καταγράφηκε με πολαρογραφικές μετρήσεις.

Για την εκτίμηση της κατάστασης όλου του λειχήνα χρησιμοποιήθηκε η πολαρογραφική καταγραφή της αναπνευστικής, αλλά και της φωτοσυνθετικής διαδικασίας, για να ελεγχθεί η λειτουργική κατάσταση και των δύο συμβιωτών του. Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα θα δώσει πληροφορίες για τη λειτουργικότητα του χλωροφύκους και η αναπνοή κυρίως για το μύκητα αντίστοιχα. Στην Εικόνα 29 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τους χειρισμούς LR, LNR, LNR_LNR και LRN.



Εικόνα 29: Μέτρηση αναπνοής και φωτοσυνθετικής δραστηριότητας για τους τέσσερις χειρισμούς. Οι θετικές τιμές αντιστοιχούν στην παραγωγή οζυγόνου μέσω της φωτοσύνθεσης, ενώ οι αρνητικές στην κατανάλωση οζυγόνου μέσω της αναπνοής.

Στο διάγραμμα, οι μπάρες που αντιστοιχούν σε θετικές τιμές οξυγόνου αντιπροσωπεύουν τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Αντίθετα, οι μπάρες που αντιστοιχούν σε αρνητικές τιμές οξυγόνου υποδηλώνουν την κατανάλωσή του, δηλαδή την ύπαρξη αναπνευστικής δραστηριότητας. Οι χειρισμοί LNR και LNR_LNR παρουσιάζουν φωτοσυνθετική δραστηριότητα ίση με το χειρισμό ελέγχου LR. Αντίθετα, ο χειρισμός LRN έχει χαμηλότερα επίπεδα, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα του JIP test που έδειξαν καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού για αυτό το χειρισμό. Όσον αφορά στην αναπνευστική δραστηριότητα, ο χειρισμότητας σε σχέση με το χειρισμός LRN εμφανίζει μεγάλη αύξηση της αναπνευστικής δραστηριότητας σε σχέση με το χειρισμό ελέγχου, υποδηλώνοντας την καλή κατάσταση του μύκητα, όχι μόνο δομικά αλλά και λειτουργικά. Η αύξηση είναι πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι ο οργανισμός προσπαθεί να ανταπεξέλθει στο στρες. Άρα, αυξάνει τα

επίπεδα της αναπνοής, ώστε να αποκτήσει περισσότερη ενέργεια και να ενεργοποιηθούν μηχανισμοί απόκρισης στην καταπόνηση.

Ο δομικός και λειτουργικός έλεγχος έγινε και με ανοσοεντοπισμό δύο πρωτεϊνών του αναπνευστικού μηχανισμού, της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COX) και της εναλλακτικής οξειδάσης (AOX). Η COX βρίσκεται στη μεμβράνη του μιτοχονδρίου του μύκητα και συμμετέχει στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, για τη μετατροπή μοριακού οξυγόνου σε δύο μόρια νερού. Η AOX είναι μιτοχονδριακό ένζυμο, που όμως ενεργοποιείται όταν ο οργανισμός βρίσκεται σε στρες και παρέχει ένα εναλλακτικό μονοπάτι στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Στην Εικόνα 30 φαίνονται τα αποτελέσματα από το στύπωμα western. Στους χειρισμούς LR και LNR φαίνεται να λειτουργεί περισσότερο η AOX για τη διεκπεραίωση της αναπνοής, στο χειρισμό LNR_LNR εντοπίζονται και οι δύο πρωτεΐνες, ενώ στον LRN η αναπνοή γίνεται κυρίως από την COX. Σε κάθε περίπτωση φαίνεται να υπάρχει μία συμπληρωματικότητα των δύο μονοπατιών σε όλους τους χειρισμούς.



Εικόνα 30: Ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης COX και της ΑΟΧ στους πέντε χειρισμούς.

3.1.3 Επίπεδο καταπόνησης στο λειχήνα - Πολυαμίνες ως δείκτης καταπόνησης

Οι πολυαμίνες είναι μόρια που, εκτός των άλλων, έχουν συνδεθεί με την παρουσία καταπόνησης σε έναν οργανισμό. Ιδιαίτερο ρόλο εμφανίζουν τα επίπεδα της διαμίνης πουτρεσίνης (put) και της τετραμίνης σπερμίνης (spm). Όταν ο λόγος put/spm είναι αυξημένος αυτό δείχνει την ανθεκτικότητα του οργανισμού σε κάποια μορφή καταπόνησης. Αντίθετα, όταν ο λόγος αυτός μειώνεται, ο οργανισμός είναι πιο ευαίσθητος στην καταπόνηση. Στην προκειμένη περίπτωση εξετάστηκαν τα επίπεδα των πολυαμινών πουτρεσίνη (put), σπερμιδίνη (spd), σπερμίνη (spm),

αγματίνη (agm) και καδαβερίνη (cad) στους χειρισμούς L, LR, LNR, LNR_LNR και LRN. Για την εκχύλιση των ολικών πολυαμινών χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Kotzabasis et al., (1993), η ποσοτικοποίηση έγινε μέσω HPLC και τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 31. Λόγω των υψηλών επιπέδων της πολυαμίνης αγματίνης, παρατίθεται και ένα δεύτερο διάγραμμα με τις τέσσερις πολυαμίνες και χωρίς την αγματίνη, ώστε να είναι πιο ξεκάθαρη η εικόνα των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, υπολογίστηκε και ο λόγος put/spm.



Εικόνα 31: Τα διαγράμματα παρουσιάζουν τα επίπεδα των πολυαμινών στους χειρισμούς L, LR, LNR, LNR_LNR και LRN. **A.** Τα επίπεδα των ολικών πολυαμινών. **B.** Διάγραμμα με τις πολυαμίνες, πλην της αγματίνης. **Γ.** Ο λόγος put/spm στους χειρισμούς, ο οποίος σχετίζεται με το επίπεδο της καταπόνησης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ξεκάθαρα ότι στην ξηρή κατάσταση (L) όλες οι πολυαμίνες βρίσκονται σε χαμηλότερα επίπεδα, με εξαίρεση τη σπερμίνη, η οποία βρίσκεται σε υψηλότερο επίπεδο σε σχέση με όλους τους άλλους χειρισμούς. Όταν ο λειχήνας μεταβαίνει στην αναγεννημένη κατάσταση, η σπερμίνη μειώνεται και οι υπόλοιπες πολυαμίνες αυξάνονται. Στο χειρισμό LRN παρατηρείται ιδιαίτερη αύξηση στην πολυαμίνη καδαβερίνη, λόγω πιθανής νέκρωσης ενός μέρους του οργανισμού. Άλλωστε, έχει ήδη φανεί ότι σε αυτό το χειρισμό υπάρχει υψηλή καταπόνηση και οι πολυαμίνες είναι μόρια που σχετίζονται με στρες. Μία καλύτερη εικόνα για το μέγεθος της καταπόνησης του λειχήνα δίνεται από το λόγο put/spm φαίνεται στην Εικόνα 31 (Γ). Ο λόγος put/spm είναι χαμηλότερος στην ξηρή κατάσταση (L) και αυξάνεται όταν ο λειχήνας μεταβαίνει στην αναγεννημένη κατάσταση (LR). Παρόλο που οι πολυαμίνες εδώ αφορούν και στους δύο συμβιώτες του λειχήνα, πρόσφατες μελέτες με χλωροφύκη (Navakoudis et al., 2003; Demetriou et al., 2007; Ioannidis and Kotzabasis, 2007; Sfichi et al., 2008; Ioannidis et al., 2012; Ioannidis and Kotzabasis, 2014) έδειξαν ότι οι υψηλές τιμές της σπερμίνης σε σχέση με αντίστοιχες χαμηλές τιμές της πουτρεσίνης υποδηλώνουν μία μη φωτοχημική διαχείριση της απορροφηθείσας ηλιακής ενέργειας.

Αυτό υποστηρίζει μία ορθολογική διαχείριση της ενέργειας του λειχήνα που βρίσκεται σε ξηρή μορφή (χειρισμός L), αποφεύγοντας με αυτό τον τρόπο την πίεση διέγερσης του μη λειτουργικού σε αυτές τις συνθήκες PSII, που θα οδηγούσε άμεσα στη φωτοοξείδωση και την καταστροφή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Στους χειρισμούς LNR και LNR_LNR δεν εμφανίζεται σημαντική αλλαγή σε σχέση με το χειρισμό ελέγχου, σε αντίθεση με το χειρισμό LRN που υπάρχει εμφανής μείωση σε σχέση με το LR, υποδηλώνοντας την καταπόνηση του λειχήνα σε αυτό το χειρισμό. Αυτό είναι λογικό, δεδομένου ότι ο ένας συμβιώτης αυτού του χειρισμού, το χλωροφύκος, έχει φανεί μέχρι τώρα ότι δεν είναι απόλυτα ανθεκτικός στην έκθεση σε υγρό άζωτο όταν ο λειχήνας έχει αναγεννηθεί, δηλαδή όταν ο λειχήνας εκτεθεί στους -196°C ενώ βρίσκεται σε ενυδατωμένη μορφή.

3.1.4 Διαφοροποίηση του επιπέδου των λιπιδίων και των σακχάρων σε συνθήκες καταπόνησης

Τα επίπεδα των λιπιδίων, καθώς και οι αλλαγές τους κατά τη μετάβαση από μια φυσιολογική σε μια στρεσογόνο κατάσταση, δείχνουν την ικανότητα των λειχήνων να ενεργοποιούν μηχανισμούς ρύθμισης για την αντιμετώπιση της καταπόνησης. Στην παρούσα εργασία, τα λιπαρά οξέα απομονώθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Bligh and Dyer (1959) και ποσοτικοποιήθηκαν μέσω της GC-FID. Στην Εικόνα 32 παρουσιάζεται το σύνολο των λιπαρών οξέων που απομονώθηκαν από τον κάθε χειρισμό. Αμέσως μετά παρατίθενται τα επίπεδα καθενός από αυτά σε κάθε χειρισμό, εκφρασμένα ως ποσοστό που καταλαμβάνουν στο σύνολο των λιπαρών οξέων του κάθε χειρισμού (Εικόνα 33), καθώς και τα χρωματογράμματα (Εικόνα 35), στα οποία ταυτοποιήθηκαν τα 12 διαφορετικά λιπαρά οξέα που φαίνονται στον Πίνακα 4.



Εικόνα 32: Το σύνολο των λιπαρών στους πέντε χειρισμούς. Φαίνεται η αύζηση που υπάρχει στο χειρισμό L, σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς.

Τα αποτελέσματα από την εκτίμηση των λιπαρών οξέων δείχνουν μία μείωση στα ολικά λιπαρά κατά τη μετάβαση από την ξηρή κατάσταση (χειρισμός L) στην ενυδατωμένη κατάσταση (χειρισμός LR). Αυτό σημαίνει ότι ο λειχήνας σε συνθήκες ξηρασίας έχει σημαντικά αυξημένη συγκέντρωση λιπαρών. Αντίθετα, όταν βρίσκεται σε ενυδατωμένη κατάσταση και εκτεθεί σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196°C) (χειρισμός LRN) ή στο συνδυασμό ξηρασίας και ακραία χαμηλής θερμοκρασίας (χειρισμοί LNR και LNR_LNR), δεν παρατηρείται ουσιαστική αλλαγή στη συγκέντρωση των λιπαρών σε σχέση με τον LR χειρισμό.

α/α	Χημικός Τύπος	Λιπαρό Οξύ
1	C _{10:0}	Decanoic acid
2	C _{13:0}	Tridecanoid acid
3	C _{14:0}	Tetradecanoid acid
4	C _{16:0}	Hexadecanoid acid
5	C _{16:10-9}	9- Hexadecenoic acid
6	C _{16:1ω-7}	7- Hexadecenoic acid
7	C _{18:0}	Octadecanoid acid
8	C _{18:1}	E-9- Octadecenoic acid
9	C _{18:1} 9	9- Octadecenoic acid
10	С _{18:3ю-6}	6,9,12- Octadecatrienoic acid
11	С _{18:3ю-3}	9,12,15- Octadecatrienoic acid
12	C _{20:30-6}	8,11,14- Octadecatrienoic acid

Πίνακας 4: Τα 12 λιπαρά οζέα που ταυτοποιήθηκαν σε όλους τους χειρισμούς λειχήνα. Παρατίθεται ο χημικός τύπος και η ονομασία καθενός, ενώ έχει δοθεί μια αρίθμηση, η οποία χρησιμοποιείται στα διαγράμματα παρακάτω.



Εικόνα 33: Το ποσοστό των λιπαρών οξέων σε κάθε χειρισμό λειχήνα. Τα λιπαρά οξέα έχουν αριθμηθεί 1-12 και δίπλα παρατίθεται το λιπαρό οξύ που αντιστοιχεί σε κάθε αριθμό.

Ένας δεύτερος παράγοντας που σχετίζεται με την επιβίωση των κυττάρων σε καταπονήσεις, κυρίως έλλειψης νερού και αλλαγής θερμοκρασίας, είναι τα σάκχαρα. Στην Εικόνα 34 παρουσιάζονται τα ολικά ενδοκυτταρικά σάκχαρα, όπως ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο Molisch.



Εικόνα 34: Τα επίπεδα των ενδοκυτταρικών σακχάρων για τους πέντε χειρισμούς. Φαίνεται η αύζηση στο χειρισμό L, σε σχέση με τους υπόλοιπους χειρισμούς.



Εικόνα 35: Τα χρωματογράμματα που προέκυψαν από τη GC-FID για τους πέντε χειρισμούς, στα οποία φαίνονται τα 12 λιπαρά οξέα που ταυτοποιήθηκαν.

Στην Εικόνα 34 φαίνεται ότι ο λειχήνας σε συνθήκες ξηρασίας (χειρισμός L) έχει περισσότερα σάκχαρα, σε σχέση με την ενυδατωμένη μορφή (LR). Αυτό δικαιολογείται, καθώς σε συνθήκες ξηρασίας παρατηρείται συσσώρευση ωσμωλυτών, όπως είναι τα σάκχαρα, ώστε να επιβιώσουν τα κύτταρα (Shao et al., 2006). Επιπλέον, ο χειρισμός LR είναι μεταβολικά ενεργός και καταναλώνει σάκχαρα για τις ανάγκες του μεταβολισμού του. Όσον αφορά στο χειρισμό LNR, παρουσιάζει μία μείωση σε σχέση με το χειρισμό LR και μάλιστα εάν επαναληφθεί σε δύο κύκλους (χειρισμός LNR_LNR) οι τιμές των σακχάρων μειώνονται, όπως και στο χειρισμό LNR. Σε αντίθεση, ο LRN χειρισμός βρίσκεται στα ίδια επίπεδα με τον LR. Δηλαδή, η έκθεση σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία δεν επηρέασε τα επίπεδα των σακχάρων, αλλά ο συνδυασμός της με την έκθεση σε ξηρασία οδήγησε σε μικρή μείωσή τους.

3.2 Δυνατότητα παραγωγής υδρογόνου από το λειχήνα μετά την έκθεσή του σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία.

3.2.1 Ακραιοφιλία και παραγωγή υδρογόνου

Ο λειγήνας Pleurosticta acetabulum φάνηκε να είναι ανθεκτικός στην ξηρασία. Σε αυτή την κατάσταση μπορεί να αντέξει και την έκθεση σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία, ενώ όταν είναι μεταβολικά ενεργός στην αναγεννημένη μορφή καταπονείται σε μεγάλο βαθμό, αλλά εξακολουθεί να επιβιώνει. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η επιβίωσή του σε έναν άλλο πλανήτη είναι πιθανή. Τι συμβαίνει, όμως, με τη λειτουργικότητά του; Αυτός ο οργανισμός έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να παράγει υδρογόνο φωτοσυνθετικά, όταν βρεθεί σε κλειστό σύστημα και δημιουργήσει ανοξικές συνθήκες (Papazi et al., 2015). Η ικανότητα αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι σε ένα κλειστό σύστημα ο ένας συμβιώτης, ο μύκητας, καταναλώνει το οξυγόνο μέσω της αναπνευστικής διαδικασίας και δημιουργεί σύντομα ανοξικό περιβάλλον που απαιτείται για την ενεργοποίηση του ενζύμου της υδρογενάσης στον άλλο συμβιώτη, το μονοκύτταρο χλωροφύκος του γένους Trebouxia. Στο γλωροφύκος, η φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων τροφοδοτεί με ηλεκτρόνια την υδρογενάση για να γίνει η σύνθεση μοριακού υδρογόνου (H₂). Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείγνουν ότι και οι δύο συμβιώτες είναι ανθεκτικοί στο συνδυασμό παρατεταμένης ξηρασίας και ακραία χαμηλής θερμοκρασίας στους χειρισμούς LNR και LNR LNR. Το επόμενο βήμα είναι να ελεγχθεί εάν αυτοί οι δύο χειρισμοί εξακολουθούν να μπορούν να παράγουν υδρογόνο, όπως συμβαίνει με το χειρισμό ελέγχου LR.

Ο έλεγχος για την παραγωγή υδρογόνου έγινε σε πειράματα πέντε ημερών, σε φως και σε σκοτάδι. Η παραγωγή υδρογόνου γίνεται από το PSII-εξαρτώμενο και το PSII-ανεξάρτητο μονοπάτι, αλλά κυρίως από την φωτοανεξάρτητη ζύμωση (dark fermentation). Στο σκοτάδι παράγεται υδρογόνο αποκλειστικά από τη dark fermentation. Η ποσοτικοποίηση των δύο αερίων, του υδρογόνου και του οξυγόνου, έγινε μέσω αέριας χρωματογραφίας θερμικής αγωγιμότητας (GC-TCD). Στην Εικόνα 36 φαίνεται ένα κλασικό προφίλ που προκύπτει από τη μέτρηση στην GC την πρώτη ημέρα (Εικόνα 36.Α) και φαίνεται η παρουσία μόνο του οξυγόνου, το οποίο έχει ήδη μειωθεί και του αζώτου και την πέμπτη ημέρα (Εικόνα 36.Β-Δ), όπου πλέον έχει γίνει κατανάλωση του οξυγόνου και την κατανάλωση οξυγόνου για τους τρεις χειρισμούς στο φως (Α και Β) και στο σκοτάδι (Γ και Δ).



Εικόνα 36: Τα προφίλ που προκύπτουν από τη μέτρηση στην GC-TCD με τις κορυφές να αντιστοιχούν με τη σειρά σε υδρογόνο-οζυγόνο-άζωτο. Α. Χειρισμός LR την ημέρα 1, όπου υπάρχει ακόμα μικρή ποσότητα οζυγόνου και καθόλου υδρογόνο. Β. Χειρισμός LR την ημέρα 5, όπου έχει παραχθεί η μέγιστη δυνατή ποσότητα υδρογόνου και το οζυγόνο έχει καταναλωθεί. Γ. Χειρισμός LNR την ημέρα 5, όπου έχει παραχθεί ποσότητα υδρογόνου όσο και στον LR και το οζυγόνο έχει καταναλωθεί. Δ. Χειρισμός LNR την ημέρα 5, όπου έχει παραχθεί ποσότητα υδρογόνου όσο και στους LR και LNR και το οζυγόνο έχει καταναλωθεί.

Στις εικόνες φαίνεται ότι τα επίπεδα παραγωγής υδρογόνου και κατανάλωσης οξυγόνου για τους χειρισμούς LNR και LNR_LNR δε διαφέρουν από εκείνα του χειρισμού ελέγχου LR σε συνθήκες φωτός. Όσον αφορά στην παραγωγή υδρογόνου και στην κατανάλωση οξυγόνου σε σκοτάδι, χειρισμοί εξακολουθούν να παράγουν υψηλά επίπεδα υδρογόνου μέσω της dark fermentation και οι χειρισμοί LNR και LNR_LNR έχουν και εκεί την ίδια συμπεριφορά με το χειρισμό ελέγχου LR. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν την αυτορρύθμιση της ατμόσφαιρας του κλειστού συστήματος από το λειχήνα και στους τρεις χειρισμούς (LR, LNR, LNR_LNR). Ήδη από την πρώτη ημέρα παρατηρείται δραματική μείωση του οξυγόνου (τείνει προς τη δημιουργία ανοξικών συνθηκών) και αυτό επιτρέπει την επαγωγή της υδρογενάσης και κατά συνκρινοντας τα αποτελέσματα στο φως και στο σκοτάδι, είναι ότι τα ηλεκτρόνια που φθάνουν στην υδρογενάση

ακόμη και στο φως προέρχονται κατά περίπου 90% από το μονοπάτι της dark fermentation. Αυτό συμφωνεί και με τα αποτελέσματα των Papazi et al. (2015).



Εικόνα 37: Τα διαγράμματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις στην GC-TCD: **A**. Η παραγωγή υδρογόνου για τους χειρισμούς LR, LNR και LNR_LNR στο φως. **B**. Η κατανάλωση οζυγόνου για τους χειρισμούς LR, LNR και LNR_LNR στο φως. Γ. Η παραγωγή υδρογόνου για τους χειρισμούς LR, LNR και LNR_LNR στο φως. Γ. Η παραγωγή υδρογόνου για τους χειρισμούς LR, LNR και LNR_LNR στο σκοτάδι. **Δ**. Η κατανάλωση οζυγόνου για τους χειρισμούς LR, LNR και LNR_LNR στο σκοτάδι.

Το σημαντικότερο όλων των παραπάνω αποτελεσμάτων είναι η επιβεβαίωση ότι η απόλυτη και παρατεταμένη ξηρασία και η ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196°C) δεν επηρέασαν στο παραμικρό τους λειχήνες και οι τρεις χειρισμοί δε διαφέρουν στην ικανότητα παραγωγής υδρογόνου και κατανάλωσης οξυγόνου. Τα διαγράμματα δείχνουν ότι από την πρώτη ημέρα ο λειχήνας έχει ήδη καταναλώσει το διαθέσιμο οξυγόνο και τη δεύτερη ημέρα έχει αρχίσει η παραγωγή υδρογόνου. Με βάση αυτή την παρατήρηση, δείγμα λειχήνα LR (το ίδιο συμβαίνει και με τους χειρισμούς LNR και LNR_LNR) μπήκε στη διαδικασία παραγωγής υδρογόνου σε μπουκάλι, όπως παραπάνω, σε συνθήκες φωτός. Μετά από δύο ημέρες, που έχει γίνει εγκαθίδρυση ανοξικών συνθηκών και έχει παραχθεί υδρογόνο, το μπουκάλι άνοιξε, ώστε να εγκαθιδρυθούν οξυγονικές συνθήκες και στη

συνέχεια ξαναέκλεισε. Τα αποτελέσματα παραγωγής υδρογόνου και κατανάλωσης οξυγόνου φαίνονται στην Εικόνα 38.



Εικόνα 38: Α. Η επαναληψιμότητα στη διαδικασία παραγωγής υδρογόνου. Β. Η επαναληψιμότητα στη διαδικασία κατανάλωσης οζυγόνου.

Όπως φαίνεται στα διαγράμματα, ο λειχήνας είναι σε θέση να επαναλάβει την κατανάλωση οξυγόνου και την παραγωγή υδρογόνου. Δηλαδή, μετά από δύο ημέρες ο λειχήνας παραμένει λειτουργικός όπως την ημέρα 0 και δεν έχει επηρεαστεί από τις ανοξικές συνθήκες που δημιουργούνται στο μπουκάλι. Μέχρι τώρα δηλαδή φαίνεται ότι ο λειχήνας αντέχει στην απόλυτη ξηρασία, επιβιώνει σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196°C) και τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι αντέχει και σε ανοξικές συνθήκες. Επόμενο βήμα στην παρούσα εργασία είναι να ελεγχθεί η βιωσιμότητα των δύο συμβιωτών του λειχήνα, στους χειρισμούς LR, LNR και LNR_LNR σε διάστημα πέντε ημερών σε ανοξικές συνθήκες.

3.2.1.1 Έλεγχος της κατάστασης του φωτοβιώτη

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας του χλωροφύκους του λειχήνα πραγματοποιήθηκε μέτρηση επαγωγικού φθορισμού, όπως παραπάνω, σε διάστημα πέντε ημερών. Δεδομένου ότι οι χειρισμοί LNR και LNR_LNR έχουν την ίδια συμπεριφορά στην παραγωγή υδρογόνου, από εδώ και πέρα τα πειράματα διεξάγονται με τους χειρισμούς LR και LNR. Τη δεύτερη ημέρα ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός και ουσιαστικά το PSII του χλωροφύκους καταρρέει, όπως έχει αναφερθεί και σε εργασία των Papazi et al. (2012), οπότε οι τιμές για όλες τις παραμέτρους από το JIP test αφορούν μόνο την ημέρα 0 και 1. Η μόνη παράμετρος που ανακτήθηκε για όλες τις ημέρες είναι ο λόγος Fv/Fm, ο οποίος αντιπροσωπεύει τη φωτοσυνθετική απόδοση. Στις Εικόνες 39 και 40

φαίνονται τα ολικά αραχνοειδή γραφήματα, όπως προκύπτουν για όλες τις παραμέτρους του JIP test την πρώτη ημέρα. Στην Εικόνα 39 περιλαμβάνονται οι τιμές του χειρισμού LR σε φως και σκοτάδι, σε ένα κλειστό σύστημα μετά από μία ημέρα (24 ώρες) και συγκρίνονται σε την ημέρα 0. Αντίστοιχες πληροφορίες περιλαμβάνει η Εικόνα 40, αλλά για το χειρισμό LNR.



Εικόνα 39: Ολικό αραχνοειδές γράφημα για όλες τις παραμέτρους που προέκυψαν από το JIP test για το χειρισμό LR την ημέρα 1.

Αμέσως μετά παρατίθενται αραχνοειδή γραφήματα για τις οκτώ παραμέτρους που είχαν επιλεχθεί και παραπάνω. Στην Εικόνα 41 είναι οι παράμετροι για το χειρισμό LR και στην Εικόνα 42 για το χειρισμό LNR. Η εικόνα που φαίνεται στα αραχνοειδή διαγράμματα των Εικόνων 41 και 42 είναι ότι την πρώτη ημέρα ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός παραμένει λειτουργικός.



Εικόνα 40: Ολικό αραχνοειδές γράφημα για όλες τις παραμέτρους που προέκυψαν από το JIP test για το χειρισμό LNR την ημέρα 1.

Βέβαια, είναι εμφανής η αρχή καταπόνησης, κυρίως από την αύξηση στο μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας και τη μείωση των ενεργών κέντρων αντίδρασης (RC/CS), αυτό οδηγεί στη μείωση της φωτοχημικής απόσβεσης της δεσμευμένης ενέργειας (PSIo) και στην αύξηση της μη φωτοχημικής διάχυσης της ενέργειας (DIo/RC). Αποτέλεσμα αυτών των διαφοροποιήσεων είναι η μείωση της ενέργειας που παγιδεύεται στα ενεργά κέντρα (TRo/RC) και της φωτοσυνθετικής ροής ηλεκτρονίων (ETo/RC), φτάνοντας τελικά στη μείωση της φωτοσυνθετικής απόδοσης [PI(abs) και Fv/Fm]. Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται μετά από μία μέρα σε κλειστά συστήματα (ανοξικές συνθήκες) σε σχέση με οξυγονικές συνθήκες φαίνεται να είναι παρόμοιες στο χειρισμό LR όσο και στο χειρισμό LNR. Αυτό διαφαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα όπου συγκρίνονται οι αλλαγές στο χειρισμό LNR σε σχέση με τον αντίστοιχο LR μετά από επώαση μίας ημέρας σε κλειστό σύστημα (Εικόνα 43).



Εικόνα 41: Αραχνοειδές γράφημα για τις επιμέρους παραμέτρους για το χειρισμό LR την ημέρα 1.



Εικόνα 42: Αραχνοειδές γράφημα για τις επιμέρους παραμέτρους για το χειρισμό LNR την ημέρα 1.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι ακόμη μία ένδειξη ότι η απόλυτη ξηρασία και η ακραία χαμηλή θερμοκρασία του χειρισμού LNR δεν επηρέασε τη λειτουργικότητά του. Τη δεύτερη ημέρα ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός έχει καταπονηθεί ακόμα περισσότερο και αρχίζει ενδεχομένως η αναδιάταξή του, που θα επικεντρωθεί στη διαχείριση της ενέργειας κάτω από ανοξικές συνθήκες μέσω της dark fermentation. Σχετικά με τις υπόλοιπες ημέρες, οι τιμές του Fv/Fm φαίνονται στην Εικόνα 44.



Εικόνα 43: Ολικό αραχνοειδές γράφημα για όλες τις παραμέτρους που προέκυψαν από το JIP test για το χειρισμό LNR την ημέρα 1 σε φως, συγκρινόμενος με το χειρισμό LR την ημέρα 1 σε φως.

Το γεγονός ότι ο λόγος Fv/Fm έχει καθοδική τάση από την πρώτη κιόλας ημέρα και τελικά φτάνει κοντά στο μηδέν την πέμπτη ημέρα δείχνει την κατάρρευση του PSII του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Αυτό όμως δε σημαίνει ότι ολόκληρος ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός έχει καταρρεύσει. Στη συνέχεια φαίνονται τα αποτελέσματα από το στύπωμα western, για την πρωτεΐνη PSaA του PSI (Εικόνα 45) που δείχνει ότι υπάρχει σημαντική αύξηση σε αυτή την πρωτεΐνη από την ημέρα 0 προς την ημέρα 1, που δικαιολογείται από την ενεργοποίηση του PSII ανεξάρτητου μονοπατιού για την παραγωγή H₂, στο οποίο συμπεριλαμβάνεται το PSI. Το σημαντικό είναι ότι μέχρι και την πέμπτη ημέρα τα επίπεδα της PSaA παραμένουν υψηλά, δηλώνοντας την ακεραιότητα του PSI και δικαιολογώντας την παραγωγή H₂.



Εικόνα 44: Η μεταβολή στις τιμές Fv/Fm σε διάστημα πέντε ημερών σε ανοζικές συνθήκες. **Α.** Οι τιμές Fv/Fm για το χειρισμό LR σε φως. **Β.** Οι τιμές Fv/Fm για το χειρισμό LR σε σκοτάδι. **Γ.** Οι τιμές Fv/Fm για το χειρισμό LNR σε φως. **Δ.** Οι τιμές Fv/Fm για το χειρισμό LNR σε σκοτάδι.





Εικόνα 46: Οι μετρήσεις των χλωροφυλλών για τους χειρισμούς LR και LNR σε διάστημα 5 ημερών σε φως. Α. Τα επίπεδα των χλωροφυλλών στο χειρισμό LR. Β. Η αναλογία chl a/chl b για το χειρισμό LR. Γ. Τα επίπεδα των χλωροφυλλών στο χειρισμό LNR. Δ. Η αναλογία chl a/chl b για το χειρισμό LNR.

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έδειξαν ότι η λειτουργικότητα του PSII ουσιαστικά, σταματάει μετά τη δεύτερη ημέρα που ο λειχήνας μένει σε ανοξικές συνθήκες. Οι χλωροφύλλες μπορούν να δώσουν μία εικόνα για τη δομική κατάσταση. Στις Εικόνες 46 και 47 φαίνονται τα επίπεδα των χλωροφυλλών και η αναλογία chl a/b για το χειρισμό LR και LNR, σε διάστημα πέντε ημερών, σε φως και σε σκοτάδι, αντίστοιχα.

Τα διαγράμματα δείχνουν μια αισθητή μείωση τόσο στις ολικές χλωροφύλλες όσο και στην αναλογία chl a/b από την ημέρα 0 προς την ημέρα 1. Αυτό συμβαίνει, επειδή ουσιαστικά έχουμε το πέρασμα από αυτότροφες συνθήκες σε μικτότροφες συνθήκες και μάλιστα σε ένα κλειστό σύστημα που οδηγεί σε ανοξικές συνθήκες. Μετά την πρώτη ημέρα, δεν παρατηρείται σημαντική αλλαγή στα επίπεδα των χλωροφυλλών. Αυτό δείχνει ότι παρά τη λειτουργική καταπόνηση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, ειδικότερα του PSII, δομικά οι χλωροφύλλες μένουν ακέραιες.



Εικόνα 47: Οι μετρήσεις των χλωροφυλλών για τους χειρισμούς LR και LNR σε διάστημα 5 ημερών σε σκοτάδι. Α. Τα επίπεδα των χλωροφυλλών στο χειρισμό LR. Β. Η αναλογία chl a/chl b για το χειρισμό LR. Γ. Τα επίπεδα των χλωροφυλλών στο χειρισμό LNR. Δ. Η αναλογία chl a/chl b για το χειρισμό LNR.

3.2.1.2 Έλεγχος της κατάστασης του μυκοβιώτη

Η κατάσταση του δεύτερου συμβιώτη, του μύκητα, κατά την επώασή του σε ανοξικές συνθήκες αποκαλύπτεται με τη μέτρηση των επιπέδων εργοστερόλης. Η εκχύλιση της εργοστερόλης έγινε με το πρωτόκολλο των Dahlman et al., (2002) και η ποσοτικοποίηση έγινε με HPLC. Η απομόνωση της εργοστερόλης έγινε επιλεγμένα από τις ημέρες 1, 2 και 5 και συγκρίνεται με την αρχική ημέρα 0. Την πρώτη και τη δεύτερη ημέρα δημιουργούνται οι ανοξικές συνθήκες, ενώ την τελευταία ημέρα ο λειχήνας έχει δεχτεί ήδη την καταπόνηση από αυτές τις συνθήκες. Στην Εικόνα 48 φαίνονται τα επίπεδα της εργοστερόλης για το χειρισμό LR, καθώς και για το χειρισμό LNR, σε φως και σκοτάδι.



Εικόνα 48: Η μέτρηση των επιπέδων της εργοστερόλης τις ημέρες 1,2 και 5 στους χειρισμούς **A.** LR σε *φως.* **B**. LR σε σκοτάδι. **Γ.** LNR σε *φως.* **Δ.** LNR σε σκοτάδι.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι από την πρώτη ημέρα τα επίπεδα της εργοστερόλης μειώνονται σε σχέση με την ημέρα 0. Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να έχει σχέση, εκτός από τη μεταφορά του σε ανοξικές συνθήκες, με το γεγονός ότι ο λειχήνας εκτέθηκε σε ένα περιβάλλον με εξωγενή οργανικό άνθρακα (γλυκόζη). Από την πρώτη μέρα και μετά όμως, τα επίπεδα της εργοστερόλης δε μεταβάλλονται σημαντικά μέχρι και την τελευταία ημέρα. Αυτό δείχνει ότι ο μύκητας προσαρμόζεται και επιβιώνει καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης σε ανοξικές συνθήκες. Επιπλέον πληροφορίες για την κατάσταση του μηχανισμού της αναπνοής δίνει ο ανοσοεντοπισμός των δύο πρωτεϊνών του αναπνευστικού μηχανισμού, της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COX) και της εναλλακτικής οξειδάσης (AOX). Στην Εικόνα 49 φαίνονται τα αποτελέσματα από το στύπωμα Western για την COX και την AOX αντίστοιχα, για δείγματα από τις πέντε ημέρες, καθώς και την αρχική ημέρα 0.



Εικόνα 49: Ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών COX και AOX.

Στην Εικόνα 49 φαίνεται ότι η COX υπερεκφράζεται όταν ο λειχήνας βρίσκεται στο κλειστό σύστημα του μπουκαλιού με επιπρόσθετη γλυκόζη, ενώ την ημέρα 0, πριν την προσθήκη γλυκόζης, τα επίπεδα είναι πολύ χαμηλά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στο μπουκάλι οι συνθήκες είναι μικτότροφες και η παρουσία γλυκόζης αυξάνει τα επίπεδα της αναπνευστικής δραστηριότητας. Από την άλλη μεριά, η AOX αυξάνεται την πρώτη ημέρα, αλλά στη συνέχεια μειώνεται και η έκφρασή της σταματάει από την τρίτη ημέρα.

3.2.1.3 Φωτοσυνθετική δραστηριότητα και αναπνοή του λειχήνα

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δείχνουν ότι όταν ο λειχήνας βρίσκεται σε ανοξικές συνθήκες για πέντε ημέρες, το χλωροφύκος είναι εκείνο που φαίνεται ότι καταπονείται, τουλάχιστον όσον αφορά στο PSII, ενώ ο μύκητας διατηρεί, σε γενικές γραμμές, τη δομική του ακεραιότητα μέχρι και την τελευταία ημέρα. Για τη λειτουργική ανθεκτικότητα έγιναν μετρήσεις πολαρογραφίας για τη φωτοσυνθετική και την αναπνευστική δραστηριότητα. Στην Εικόνα 50 φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τους χειρισμούς LR και LNR, σε φως και σκοτάδι, σε διάστημα 5 ημερών αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στα διαγράμματα, η φωτοσυνθετική δραστηριότητα, ουσιαστικά η λειτουργία του PSII που παράγει και το οξυγόνο, σε όλους τους χειρισμούς ακολουθεί πτωτική τάση και μέχρι την τελευταία μέρα τείνει προς το μηδέν. Αυτό επιβεβαιώνει τα προηγούμενα αποτελέσματα, ότι μετά τη δεύτερη ημέρα το PSII έχει καταρρεύσει. Αυτό δεν σημαίνει ότι κατέρρευσε και ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός, αφού η φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου γίνεται κυρίως μέσω της dark fermentation (Papazi et al., 2015), η οποία δεν χρειάζεται το PSII.



Εικόνα 50: Η μέτρηση της φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής δραστηριότητας σε διάστημα 5 ημερών για τους χειρισμούς **A.** LR σε φως, **B.** LR σε σκοτάδι, **Γ.** LNR σε φως και **Δ.** LNR σε σκοτάδι.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μετρήσεις της αναπνευστικής δραστηριότητας του μύκητα. Μέχρι και την πέμπτη μέρα ο μύκητας φαίνεται να έχει λειτουργική αναπνοή, η οποία ξεπερνάει σημαντικά τα επίπεδα της ημέρας 0. Προφανώς, με την εγκαθίδρυση ανοξικών συνθηκών, ο μύκητας εκτελεί αναερόβια αναπνοή, κατά την οποία δέκτης ηλεκτρονίων δεν είναι το οξυγόνο, αλλά άλλα οξειδωτικά μόρια. Η αυξημένη αναπνοή οφείλεται στην παρουσία μικτότροφων συνθηκών στο σύστημα. Τελικά, όμως, ο μύκητας φαίνεται ότι όχι μόνο διατηρεί τη δομική ακεραιότητά του, αλλά και τη λειτουργική μέχρι και την πέμπτη ημέρα και σε όλους τους χειρισμούς.
3.2.1.4 Πολυαμίνες ως δείκτης καταπόνησης στο λειχήνα

Για να γίνει εκτίμηση αυτής της καταπόνησης, δηλαδή του μειωμένου έως μηδενικού οξυγόνου, έγινε απομόνωση και ποσοτικοποίηση των πολυαμινών, όπως παραπάνω με το πρωτόκολλο των Kotzabasis et al., (1993). Τα αποτελέσματα για τους χειρισμούς LR και LNR σε φως φαίνονται στην Εικόνα 51 και για τους χειρισμούς LR και LNR σε σκοτάδι στην Εικόνα 52. Και εδώ παρατίθενται διαγράμματα με και χωρίς την αγματίνη, για να είναι ξεκάθαρα τα επίπεδα όλων των πολυαμινών. Και στην προκειμένη περίπτωση, οι μετρήσεις εστιάζουν στις ημέρες 1, 2 και 5, καθώς φαίνεται να είναι κομβικές για το λειχήνα. Το συμπέρασμα που βγαίνει για όλους τους χειρισμούς είναι ότι μειώνεται η πουτρεσίνη σε σχέση με τη σπερμίνη, κάτι που δείχνει ότι οι λειχήνες δέχονται καταπόνηση. Επιπλέον, παρατηρείται μεγάλη αύξηση της πολυαμίνης καδαβερίνης την ημέρα 5.



Εικόνα 51: Τα επίπεδα των πολυαμινών για τους χειρισμούς σε φως τις ημέρες 1,2 και 5. **Α.** Ολικές πολυαμίνες για το χειρισμό LR, **Β**. Οι πολυαμίνες, πλην της αγματίνης, για το χειρισμό LR, **Γ**. Ολικές πολυαμίνες για το χειρισμό LNR, **Δ.** Οι πολυαμίνες, πλην της αγματίνης, για το χειρισμό LNR.



Εικόνα 52: Τα επίπεδα των πολυαμινών για τους χειρισμούς σε σκοτάδι τις ημέρες 1,2 και 5. Α. Ολικές πολυαμίνες για το χειρισμό LR, Β. Οι πολυαμίνες, πλην της αγματίνης, για το χειρισμό LR, Γ. Ολικές πολυαμίνες για το χειρισμό LNR, Δ. Οι πολυαμίνες, πλην της αγματίνης, για το χειρισμό LNR.

Η καδαβερίνη έχει συσχετιστεί με την απόκριση σε στρες, όπως υψηλή θερμοκρασία, αλατότητα, ξηρασία και οξειδωτικές καταστάσεις (Jancewicz et al., 2016), οπότε είναι πιθανό να συσσωρεύεται για να μπορέσει ο λειχήνας να ανταπεξέλθει στην καταπόνηση που υφίσταται. Συνοψίζοντας τις παραπάνω πληροφορίες, φαίνεται ότι ο λειχήνας είναι σε θέση να ανταπεξέλθει σε ανοξικές συνθήκες και να συνεχίσει να είναι λειτουργικός.

3.2.1.5 Τα επίπεδα των λιπαρών σε συνθήκες καταπόνησης

Στην προηγούμενη ενότητα εξετάστηκαν τα επίπεδα των λιπαρών οξέων, καθώς έχουν καθοριστικό ρόλο στην επιβίωση του λειχήνα σε ξηρασία και ακραία χαμηλή θερμοκρασία. Τι συμβαίνει, όμως, σε συνθήκες ανοξίας; Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα, εκχυλίστηκαν τα ολικά λιπαρά οξέα των λειχήνων με τη μέθοδο των Bligh and Dyer (1959) (Εικόνα 53) και στη συνέχεια

έγινε η ποσοστιαία ανάλυση της σύστασής τους στα δείγματα για τους χειρισμούς LR και LNR σε διάστημα πέντε ημερών σε ανοξικές συνθήκες, σε φως και σκοτάδι (Εικόνες 54-59). Στην Εικόνα 54 φαίνονται οι αναλογίες κάθε λιπαρού οξέος στους χειρισμούς LR και LNR σε φως και στην Εικόνα 55 σε σκοτάδι, σε διάστημα 5 ημερών. Στην Εικόνα 56 παρουσιάζονται τα χρωματογράμματα για το χειρισμό LR σε φως, στην Εικόνα 57 για τον LNR σε φως, στην Εικόνα 58 για το χειρισμό LR σε σκοτάδι και στην Εικόνα 59 για το χειρισμό LNR σε σκοτάδι.



Εικόνα 53: Τα επίπεδα των ολικών λιπαρών στους χειρισμούς που έμειναν πέντε ημέρες σε κλειστό σύστημα. Α. Ο χειρισμός LR σε φως. Β. Ο χειρισμός LR σε σκοτάδι. Γ. Ο χειρισμός LNR σε φως. Δ. Ο χειρισμός LNR σε σκοτάδι.

Όλη αυτή η πληθώρα της πληροφορίας δείχνει ότι σε συνθήκες φωτός, οι δύο χειρισμοί διαφοροποιούνται, καθώς στον LR, με το πέρασμα σε κλειστό σύστημα και σε μικτότροφες συνθήκες, παρατηρείται αύξηση των ολικών λιπαρών την 1^η ημέρα, αλλά μία οριακά σταδιακή πτώση τις επόμενες ημέρες (Εικόνα 53-Α). Αντίθετα, στο χειρισμό LNR την 1^η ημέρα υπάρχει μία σημαντική πτώση που ακολουθείται από μία σταδιακή αύξηση στην πορεία της επώασης σε κλειστό σύστημα τουλάχιστον μέχρι και την 4^η μέρα (Εικόνα 53-Β).

Τα επίπεδα των λιπαρών είναι φυσικό να αλλάζουν, καθώς οι καταπονήσεις, όπως η έκθεση σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία στο χειρισμό LNR, αλλά και οι ανοξικές συνθήκες που εγκαθιδρύονται από τη δεύτερη ημέρα, προκαλούν οξειδωτικό στρες στο λειχήνα. Στο οξειδωτικό στρες απελευθερώνονται ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS), οι οποίες στοχεύουν και καταστρέφουν μόρια του κυττάρου, μεταξύ των οποίων είναι και τα λιπαρά των μεμβρανών (Hetherington et al., 1982; Chirkova et al., 1989). Η υψηλότερη καταπόνηση του χειρισμού LNR, σε σχέση με τον αντίστοιχο LR, δικαιολογεί την αρχική μείωσή τους, όμως επιβεβαιώνει την προσαρμογή του λειχήνα, που καταφέρνει στο τέλος της επώασης (5^η μέρα) να έχει τα ίδια επίπεδα λιπαρών με το χειρισμό LR (Εικόνα 53-A και B).



Εικόνα 54: Το ποσοστό κάθε λιπαρού οζέος στο διάστημα πέντε ημερών στους χειρισμούς Α. LR σε φως Β. LNR σε φως.

Το γεγονός ότι ο λειχήνας επιβιώνει και προσαρμόζεται σε αυτές τις συνθήκες, υποδηλώνει την ύπαρξη μηχανισμών αντιμετώπισης του οξειδωτικού στρες. Κάτι ενδιαφέρον που παρατηρείται στο χειρισμό LNR σε φως, στην Εικόνα 54.Β, είναι η απουσία των λιπαρών οξέων #2 ($C_{13:0}$), #3 ($C_{14:0}$) και #8 ($C_{18:1}$) από την πρώτη κιόλας ημέρα. Αντίθετα, το #1 ($C_{10:0}$) εμφανίζει πολύ τεράστια αύξηση από την πρώτη μέρα, ενώ το αντίστοιχο λιπαρό οξύ στο χειρισμό LR παραμένει σταθερά χαμηλό κατά τη διάρκεια όλης της επώασης. Η ονομασία των λιπαρών οξέων φαίνεται στον Πίνακα 4, παραπάνω. Άλλη μία διαφορά που παρατηρείται στο χειρισμό LNR είναι ότι το λιπαρό οξύ #12 (C_{20:3}) αυξάνεται σταδιακά κατά την επώαση, ενώ στο χειρισμό LR παραμένει σχετικά σταθερό (Εικόνα 54).



Εικόνα 55: Το ποσοστό κάθε λιπαρού οζέος στο διάστημα πέντε ημερών στους χειρισμούς Α. LR σε σκοτάδι Β. LNR σε σκοτάδι.

Στο σκοτάδι τα αποτελέσματα έχουν ενδιαφέρον, καθώς σε συνθήκες έλλειψης φωτός και με ανοξία, τα χλωροφύκη του λειχήνα παράγουν υδρογόνο μέσω του μονοπατιού της dark fermentation (Papazi et al. 2015). Σε αυτό το μονοπάτι ενεργοποιείται το ένζυμο PFOR (pyruvate-feredoxin oxidoreductase), το οποίο εμπλέκεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων στο Acetyl-CoA, από το οποίο σχηματίζονται και τα λιπαρά οξέα.

Στους χειρισμούς LR και LNR στο σκοτάδι παρατηρείται μία μείωση στα ολικά λιπαρά την 1^η ημέρα επώασης σε κλειστό σύστημα (Εικόνα 53-Γ και Δ). Στο χειρισμό LR υπάρχει από τη δεύτερη ημέρα αποκατάσταση του ποσοστού των ολικών λιπαρών στο λειχήνα, η οποία διατηρείται για όλες τις ημέρες, δείχνοντας την ανθεκτικότητα του λειχήνα σε αυτές τις συνθήκες. Στο χειρισμό LNR υπάρχει μια μικρή αύξηση από τη δεύτερη ημέρα, αλλά την ημέρα 5 αυτή η αύξηση δε φτάνει στα επίπεδα της ημέρας 0. Αυτό ίσως δικαιολογείται από το γεγονός ότι και σε αυτό το χειρισμό, όπως και τον LNR σε φως, υπάρχει απουσία των λιπαρών οξέων #2 ($C_{13:0}$), #3 ($C_{14:0}$) και #8 ($C_{18:1}$) (Εικόνα 55).



- 79 -





- 80 -



- 81 -

Κ, σε συνθηκες ελλειψης φωτος και σε διαστημ που ταυτοποιήθηκαν με την GC-FID.



- 82 -

3.3 Συγκριτική μελέτη ανθεκτικότητας του χλωροφύκους του γένους *Trebouxia* όταν δε βρίσκεται σε συμβιωτική κατάσταση

Τα δεδομένα που προκύπτουν από την παρούσα εργασία μέχρι στιγμής δείχνουν ότι ο λειχήνας είναι ένας ιδιαίτερος οργανισμός, στον οποίο ένας μύκητας και ένα χλωροφύκος συμβιώνουν τέλεια και ανταπεξέρχονται σε ακραίες συνθήκες καταπόνησης. Οι πληροφορίες αφήνουν να εννοηθεί ότι η συμβίωση έχει σημαντικό ρόλο, καθώς ως σύνολο ο λειχήνας παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε ξηρασία, ακραία χαμηλή θερμοκρασία και ανοξία. Είναι, όμως, η συμβίωση απαραίτητη προϋπόθεση για την επιβίωση του οργανισμού σε αυτές τις ακραίες συνθήκες; Η απάντηση σε αυτό το ερώτημα θα δοθεί εξετάζοντας το χλωροφύκος μόνο του, χωρίς να βρίσκεται σε συμβίωση με το μύκητα. Το χλωροφύκος του λειχήνα *P. acetabulum* ανήκει στο γένος *Trebouxia*. Στα πειράματα ανθεκτικότητας χρησιμοποιήθηκε το χλωροφύκος *Trebouxia crenulata*, ως αξενική καλλιέργεια, το οποίο παρείχε η CCAP (219/2) και έχει απομονωθεί από το Richardson, 1965. Τα πειράματα αφορούν στον έλεγχο ανθεκτικότητας σε ξηρασία και ακραία χαμηλή θερμοκρασία. Παράλληλα, έγιναν συγκριτικά πειράματα στις ίδιες συνθήκες για το μονοκύτταρο χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*, το οποίο δε βρίσκεται σε συμβιωτική κατάσταση, αλλά ζει μόνο του.

3.3.1 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του χλωροφύκους Trebouxia crenulata

Ο λειχήνας *P. acetabulum* παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανθεκτικότητά του σε ξηρασία, ακραία χαμηλή θερμοκρασία και ανοξία. Για τη μελέτη μόνο του απομονωμένου χλωροφύκους του γένους *Trebouxia* έγιναν δύο πειράματα. Στο πρώτο πείραμα, δείγμα υγρής καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε φίλτρο (χειρισμός TR) και αφού αφαιρέθηκε πλήρως η υγρασία από το φίλτρο και επήλθε ξηρασία (T), εκτέθηκε σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196°C, χειρισμός TN). Στη συνέχεια, έγινε επαναφορά του ακινητοποιημένου χλωροφύκους σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο (χειρισμός TNR). Σε κάθε χειρισμό έγινε μέτρηση επαγωγικού φθορισμού για να εκτιμηθεί αν επηρεάζεται η λειτουργικότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και κατ' επέκταση η ανθεκτικότητα του κυττάρου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 60.



Εικόνα 60: Σχετική τιμή επαγωγικού φθορισμού (αριστερά) και η τιμή Fv/Fm (δεξιά) για τις τρεις καταστάσεις του χλωροφύκους.

Τα διαγράμματα δείχνουν ότι μόνο όταν το χλωροφύκος βρίσκεται σε ξηρή κατάσταση (T), δίνει μηδενική τιμή Fv/Fm, αφού είναι ανενεργό και δεν είναι δυνατή η μέτρηση επαγωγικού φθορισμού. Στο χειρισμό TNR οι μετρήσεις δε διαφέρουν από την αρχική καλλιέργεια (TR). Αυτό δείχνει ότι το χλωροφύκος είναι ανθεκτικό στην απόλυτη ξηρασία και στην ακραία χαμηλή θερμοκρασία, όπως συνέβαινε και στη συμβιωτική κατάσταση. Στο δεύτερο πείραμα, δείγμα υγρής καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε φίλτρο (χειρισμός TR) και επωάστηκε σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία, ενώ ήταν ενυδατωμένο. Στη συνέχεια, έγινε επαναφορά σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο (χειρισμός TRN). Οι μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού και οι τιμές Fv/Fm φαίνονται στην Εικόνα 61.



Εικόνα 61: Σχετική τιμή επαγωγικού φθορισμού (αριστερά) και η τιμή Fv/Fm (δεξιά) για τους δύο χειρισμούς.

Στο δεύτερο πείραμα, το χλωροφύκος *Trebouxia* φαίνεται να διατηρεί τη λειτουργικότητά του ακόμη και όταν είναι σε υγρή μορφή και βρεθεί σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία. Σε αντίθεση με το χειρισμό LRN του λειχήνα, όπου φαίνεται το χλωροφύκος να καταπονείται, όταν βρίσκεται σε μη συμβιωτική κατάσταση φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικό. Φαίνεται τελικά ότι υπάρχει ανθεκτικότητα σε απόλυτη ξηρασία και σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία, είτε το χλωροφύκος βρίσκεται σε ξηρή ή σε υγρή μορφή, είτε συμβιώνει στα πλαίσια ενός μύκητα είτε είναι ελεύθερο.

3.3.2 Έλεγχος της ανθεκτικότητας του χλωροφύκους Scenedesmus obliquus

Τα πειράματα για την ανθεκτικότητα του χλωροφύκους επαναλήφθηκαν για το μονοκύτταρο χλωροφύκος Scenedesmus obliquus, το οποίο δεν είναι συμβιωτικό. Πραγματοποιήθηκαν δύο ανάλογα πειράματα, όπως παραπάνω. Στο πρώτο, το χλωροφύκος από υγρή καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε φίλτρο (χειρισμός SR), το φίλτρο ξηράθηκε και επωάστηκε σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία (χειρισμός SN). Στη συνέχεια, επανήλθε σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρθηκε σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο (χειρισμός SNR). Οι μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού και οι τιμές Fv/Fm φαίνονται στην Εικόνα 62.



Εικόνα 62: Σχετική τιμή επαγωγικού φθορισμού (αριστερά) και η τιμή Fv/Fm (δεξιά) για τους τρεις χειρισμούς.

Στην περίπτωση του Scenedesmus φαίνεται το χλωροφύκος να μην αντέχει την ξηρασία και την έκθεση σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία. Στο δεύτερο πείραμα, η επώαση σε χαμηλή θερμοκρασία έγινε μετά τη μεταφορά της υγρής καλλιέργειας σε φίλτρο (χειρισμός SR) και χωρίς αυτό να στεγνώσει. Έπειτα επανήλθε σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρθηκε σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο (χειρισμός SRN). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στην Εικόνα 63. Στο δεύτερο πείραμα φαίνεται και πάλι ότι το χλωροφύκος δεν αντέχει την ξηρασία και την επώαση σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία. Αυτό αποδεικνύει ότι η *Trebouxia* μόνο έχει την ιδιαίτερη ανθεκτικότητα και όχι οποιοδήποτε άλλο χλωροφύκος.



Εικόνα 63: Σχετική τιμή επαγωγικού φθορισμού (αριστερά) και η τιμή Fv/Fm (δεζιά) για τους δυο χειρισμούς.

Συζήτηση

Όλες οι πειραματικές προσεγγίσεις στα πλαίσια της παρούσας εργασίας εστιάζουν σε έναν ιδιαίτερο οργανισμό, τους λειχήνες. Ουσιαστικά πρόκειται για περισσότερους από έναν οργανισμούς. Ένας μύκητας και στη συγκεκριμένη περίπτωση ένα μονοκύτταρο χλωροφύκος (Honegger, 1998), συμβιώνουν σε αρμονία και όλοι επωφελούνται από αυτή τη συμβίωση (Smith et al., 1969). Ο μύκητας προσφέρει ένα μικροπεριβάλλον στους συμβιώτες για την επιβίωση και αναπαραγωγή τους (Wang et al., 2014), ενώ ο φωτοσυνθετικός οργανισμός προσφέρει οργανική ύλη και ενέργεια στο μύκητα (Richardson et al., 1968; Komiya and Shibata, 1971). Υπάρχουν ορισμένα είδη λειχήνων που διαθέτουν και ένα τρίτο συμβιώτη, ένα ζυμομύκητα, ο ρόλος του οποίου δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί (Spribille et al, 2016). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η απόκριση του λειχήνα *Pleurosticta acetabulum* σε συνθήκες απόλυτης ξηρασίας και ακραία χαμηλής θερμοκρασίας (-196°C), αλλά και σε ανοξικές συνθήκες. Επιπλέον, πέρα από την μελέτη ανθεκτικότητας και επιβίωσής του στις εν λόγω συνθήκες, η μελέτη εστιάζει στη δυνατότητα διατήρησης της λειτουργικότητας του οργανισμού μετά από την έκθεσή του σε αυτές τις συνθήκες. Επιπλέον, εξετάζει το ρόλο της συμβίωσης στην ανθεκτικότητά του. Η παρούσα εργασία εστίασε, λοιπόν, σε τρία κεντρικά ερωτήματα:

4.1 Είναι ο λειχήνας ανθεκτικός στην ξηρασία και στην ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196°C) που επικρατούν εκτός βιόσφαιρας;

Η ζωή στον πλανήτη Γη δημιουργήθηκε με απαραίτητο στοιχείο το νερό. Όλες οι μορφές ζωής χρειάζονται, άλλες σε μεγαλύτερο και άλλες σε μικρότερο βαθμό, νερό στο περιβάλλον τους για να μπορέσουν να εκτελέσουν τις βασικές λειτουργίες τους. Η έλλειψη νερού, δηλαδή η ξηρασία, είναι η πιο δύσκολη κατάσταση για την επιβίωση των οργανισμών και η επιβίωση, για μικρό διάστημα, σε συνθήκες ξηρασίας επιτυγχάνεται μέσω στρατηγικών που υιοθετούνται από τους οργανισμούς, ώστε να συντηρηθούν σε αυτή τη δυσμενή κατάσταση, μέχρις ότου υπάρξει πάλι διαθέσιμο νερό (Fontaneto et al., 2012). Τα φυτά προσαρμόζονται στην περιορισμένη διαθεσιμότητα νερού, μεγιστοποιώντας την πρόσληψή του μέσω αύξησης των ριζών, ενώ παράλληλα ελαχιστοποιούν την απομάκρυνσή του μειώνοντας την επιβιάνεια των φύλλων και κατά συνέπεια την ποσότητα νερού που χάνεται από αυτά (Zwicke et al., 2015). Όταν η μείωση του νερού γίνει ακόμα μεγαλύτερη και επέλθει απόλυτη ξηρασία, τα φυτά δεν επιβιώνουν. Την ίδια ευπάθεια στην ξηρασία παρουσιάζουν και οι περισσότεροι μύκητες. Παρόλο που υπάρχουν είδη μη συμβιωτικών μυκήτων, που εμφανίζουν ένα βαθμό ανθεκτικότητας στην ξηρασία (Gostinčar et al., 2012; Borovikova et al.,

2016), έχει φανεί ότι συγκριτικά η ανθεκτικότητα είναι πολύ μεγαλύτερη στους μύκητες που βρίσκονται σε συμβιωτική κατάσταση, δηλαδή ως λειχήνες (Zhang et al., 2011; Wang et al., 2014). Πράγματι, οι λειχήνες είναι οργανισμοί που μπορούν να επιβιώσουν σε δυσμενή περιβάλλοντα λόγω της επιτυχημένης συμβίωσής τους (Nash, 2008). Ακόμα και σε συνθήκες απόλυτης ξηρασίας για μεγάλο χρονικό διάστημα, εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα και η λειτουργία του μεταβολισμού τους ανακτάται πλήρως όταν υπάρξει και πάλι διαθέσιμο νερό (Kappen and Valladares, 2007).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο λειχήνα Pleurosticta acetabulum, που έχει ως φωτοβιώτη ένα μονοκύτταρο χλωροφύκος του γένους Trebouxia. Σε συνθήκες παρατεταμένης ξηρασίας (χειρισμός L) δεν παρουσιάζει καμία μετρήσιμη μεταβολική δραστηριότητα, είτε πρόκειται για τη φωτοσυνθετική διαδικασία του φωτοβιώτη είτε πρόκειται για την αναπνευστική δραστηριότητα που αφορά και στους δύο συμβιώτες και πρωτίστως στο μυκοβιώτη. Η έκθεση του λειχήνα σε υγρασία (χειρισμός LR) ενεργοποιεί το μεταβολισμό του, που βρισκόταν για μεγάλο διάστημα σε κατάσταση αδράνειας. Η αποκατάσταση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μελετήθηκε με τη μη επεμβατική τεχνική του επαγωγικού φθορισμού (Εικόνες 20-23). Η καμπύλη φθορισμού και η τιμή της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης, εκφρασμένη ως Fv/Fm, για τον LR χειρισμό δείχνουν την πλήρη επαναφορά του φωτοσυνθετικού μηχανισμού, δομικά και λειτουργικά. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από τον ανοσοεντοπισμό των δύο εκ των τριών συμπλόκων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Στην Εικόνα 24, η πρωτεΐνη PSaA του PSI και το Cyt b6f δε διαφοροποιούνται ανάμεσα στους χειρισμούς, παρά μόνο στο χειρισμό L, όπου ο λειχήνας είναι αδρανής. Η επαναφορά του μηγανισμού επιβεβαιώνεται και με την παρατηρούμενη αύξηση των γλωροφυλλών και κυρίως της γλωροφύλλης a, κατά τη μετάβαση από την ξηρή (L) στην αναγεννημένη κατάσταση (LR) του λειχήνα (Εικόνες 25 και 26). Αυτές οι τιμές αφορούν αποκλειστικά στον φωτοβιώτη, ενώ η επαναφορά του μύκητα (μυκοβιώτη) πιστοποιείται από την αύξηση της εργοστερόλης (Εικόνα 28), αλλά και την πλήρη αποκατάσταση της φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής δραστηριότητας (Εικόνα 29). Επιπλέον επιβεβαίωση για την ακεραιότητα του αναπνευστικού μηγανισμού δίνει ο ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών COX και AOX (Εικόνα 30), που συμμετέχουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο μιτοχόνδριο.

Ο λειχήνας, λοιπόν, είναι σε θέση να επανέλθει, δομικά αλλά και λειτουργικά, από την καταπόνηση της ξηρασίας, το μέγεθος της οποίας φαίνεται από τα επίπεδα των πολυαμινών στην Εικόνα 31. Στην LR κατάσταση ο λόγος put/spm είναι περίπου τρεις φορές μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο στο χειρισμό L, δείχνοντας ότι ο λειχήνας βρισκόταν σε συνθήκες ελεγχόμενης καταπόνησης στο χειρισμό L, αλλά επανήλθε στη λειτουργική κανονικότητα στο χειρισμό LR. Αυτά τα ευρήματα βρίσκονται σε συμφωνία με δημοσιεύσεις, κυρίως σε φυτά και μονοκύτταρα χλωροφύκη, που συνδέουν τη μείωση της σχέσης put/spm με καταπόνηση, ενώ αντίθετα η αύξηση

της εν λόγω σχέσης σχετίζεται με την κανονικότητα, την αυξημένη μεταβολική διαδικασία και την ανάπτυξη (Navakoudis et al., 2003; Demetriou et al., 2007; Ioannidis and Kotzabasis, 2007; Sfichi et al., 2008; Ioannidis et al., 2012; Ioannidis and Kotzabasis, 2014).

Η παρούσα εργασία εμβαθύνει ακόμα περισσότερο στη συμπεριφορά του λειχήνα κάτω από τη συνδυαστική ακραιοφιλία, δηλαδή έκθεση σε ξηρασία και ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196°C). Επιπλέον, εξετάζει τι συμβαίνει στο λειχήνα όταν είναι μεταβολικά ενεργός και βρεθεί σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία. Οι μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού δείχνουν ότι όταν η ξηρασία προηγείται της έκθεσης του λειχήνα στους -196°C (χειρισμός LNR), τότε η μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού του φωτοβιώτη δε διαφοροποιείται ουσιαστικά από το χειρισμό LR, που δεν εκτέθηκε σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία (Εικόνες 20-23). Ακόμα και σε διαδοχικούς κύκλους ξηρασίας και χαμηλής θερμοκρασίας (χειρισμός LNR LNR), ο λειχήνας όχι μόνο επιβιώνει αλλά επανέρχεται λειτουργικά στα αρχικά του επίπεδα, όμοια με αυτά του χειρισμού LR. Παράλληλα με τους παραπάνω γειρισμούς, εξετάστηκε η συμπεριφορά των ενυδατωμένων λειγήνων όταν εκτεθούν άμεσα στην ακραία χαμηλή θερμοκρασία των -196°C (χειρισμός LRN). Οι τιμές μιας σειράς παραμέτρων που αφορούν στη μοριακή δομή και λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηγανισμού και παρατίθενται, υποδηλώνουν την ύπαρξη σοβαρής καταπόνησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Εικόνα 23), χωρίς όμως να καταρρεύσει. Όσον αφορά στη λειτουργικότητα της φωτοσυνθετικής και αναπνευστικής διαδικασίας βάσει πολαρογραφικών μετρήσεων φαίνεται ότι δεν επηρεάζονται στο χειρισμό LNR και LNR, αλλά στον LRN η φωτοσύνθεση μειώνεται σημαντικά, αλλά λειτουργεί, ενώ ταυτόχρονα η αναπνευστική δραστηριότητα έχει ουσιαστικά τριπλασιαστεί σε σχέση με την αντίστοιχη του χειρισμού LR (Εικόνα 29). Ίσως αυτός να είναι ένας τρόπος να αυξηθούν τα κυτταρικά ενεργειακά αποθέματα, που είναι απαραίτητα να ανταπεξέλθει ο λειχήνας σε αυτές τις ακραίες συνθήκες. Επιπλέον, στην Εικόνα 25, τα επίπεδα των χλωροφυλλών στον LRN είναι αυξημένα, περισσότερο και από το χειρισμό LNR, πιθανότατα λόγω αύξησης της φωτοσυλλεκτικής κεραίας για να διαχειριστεί μη-φωτοχημικά την περίσσεια ενέργειας και να μειώσει την πίεση διέγερσης του PSII. Πρόκειται για μία φυσιολογική απόκριση των φυτικών οργανισμών και ιδιαίτερα των χλωροφυκών για να επιβιώσουν σε συνθήκες καταπόνησης (Kotzabasis et al., 1999; Papadakis et al., 2005; Navakoudis et al., 2007; Ioannidis et al., 2011). Αυτό από μόνο του δείχνει ότι παρά την ακραία καταπόνηση του LRN χειρισμού, δεν υπάρχει απόλυτη κατάρρευση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Παράλληλα, αυτό ενισχύεται και από τα αποτελέσματα της Εικόνας 31, όπου παρατηρείται σημαντική αύξηση στα επίπεδα της καδαβερίνης, πολυαμίνης που σχετίζεται με την απόκριση στο οξειδωτικό στρες (Kosugi et al., 2009; Jancewicz et al., 2016). Φαίνεται, δηλαδή, ότι στο χειρισμό LRN ο φωτοβιώτης του λειχήνα έχει καταπονηθεί σε μεγάλο βαθμό, αλλά δεν αποκλείεται η πλήρης επαναφορά του εάν επωαστεί για

διάστημα μεγαλύτερο της μιας ώρας, όπως έγινε βάσει του πειραματικού σχεδιασμού, σε κανονική θερμοκρασία και υγρασία (Εικόνα 18). Η αντίστοιχη κατάσταση του μυκοβιώτη φαίνεται από τη μέτρηση της εργοστερόλης (Εικόνα 28), που αποτελεί δομικό συστατικό των μεμβρανών των μυκήτων. Τα επίπεδα της εργοστερόλης στους χειρισμούς LNR και LRN δε διαφοροποιούνται, δηλαδή ο μύκητας παραμένει δομικά ακέραιος και στις δύο περιπτώσεις.

Η ανθεκτικότητα του λειχήνα στην ξηρασία και την ακραία χαμηλή θερμοκρασία πιθανόν να οφείλεται στη βιοσύνθεση και συσσώρευση οργανικών ωσμωλυτών (Holzinger and Karsten, 2013), καθώς και στην ανάπτυξη κάποιων αγνώστων για την ώρα στρατηγικών επιβίωσης. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας εξετάστηκαν τα επίπεδα των υδατοδιαλυτών σακχάρων, αλλά και τα επίπεδα των λιπαρών και της σύστασής τους στο χειρισμό L σε σχέση με το χειρισμό LR, αλλά και των χειρισμών LNR, LNR LNR, LRN. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε συνθήκες ξηρασίας (L) τα κυτταρικά επίπεδα των σακγάρων είναι υψηλότερα σε σγέση με την ενυδατωμένη κατάσταση του λειγήνα (Εικονα 34). Αυτά τα αποτελέσματα δίνουν μία ιδέα για τον πιθανό μηχανισμό που χρησιμοποιεί ο λειχήνας για να ανταπεξέλθει στην παρατεταμένη ξηρασία και είναι σε συμφωνία με πρόσφατα δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία φαίνεται ότι ένας από τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας του λειχήνα απέναντι στην ξηρασία είναι η ωσμωρρύθμιση, η οποία γίνεται με τη συσσώρευση ωσμωλυτών, όπως είναι τα σάκχαρα, η προλίνη, η μαλονδιαλδεΰδη και το κάλλιο (Shao et al, 2006). Τα σάκχαρα φαίνεται να είναι υπεύθυνα για την ωσμωτική ρύθμιση στο μύκητα (Hounsa and Brandt, 1998) και τη σταθεροποίηση των μεμβρανών του κατά την έλλειψη νερού (Goodrich et al., 1988), ενώ σχετίζονται και με την ανθεκτικότητά του σε χαμηλή θερμοκρασία (Niederer et al., 1992; Tibbett et al., 1998a). Επιπλέον, ο χειρισμός LR είναι μεταβολικά ενεργός και καταναλώνει σάκχαρα για τις ανάγκες του μεταβολισμού του. Όσον αφορά στο γειρισμό LNR, παρουσιάζει μία επιπλέον μείωση σε σχέση με το χειρισμό LR και μάλιστα εάν επαναληφθεί σε δύο κύκλους (χειρισμός LNR LNR) οι τιμές των σακχάρων παραμένουν μειωμένες όπως στο χειρισμό LNR. Σε αντίθεση, ο LRN χειρισμός βρίσκεται στα ίδια επίπεδα με τον LR. Όλα αυτά δείχνουν ότι, η έκθεση σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία δεν επηρέασε τα επίπεδα των σακχάρων, αλλά ο συνδυασμός της με την έκθεση σε ξηρασία οδήγησε σε μείωσή τους. Βέβαια, εδώ γίνεται μέτρηση των ενδοκυτταρικών υδατοδιαλυτών σακγάρων και όγι των ολικών σακγάρων, που βρίσκονται σε πολυμερή μορφή.

Η διατήρηση της ακεραιότητας των μεμβρανών είναι πολύ σημαντική για την επιβίωση των κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, όταν υπάρχει ξηρασία, παρόλο που στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το σύνολο των λιπιδίων μειώνεται (Pham et al., 1985; Pham et al., 1987), παρατηρείται αύξηση των ακόρεστων λιπαρών οξέων, αύξηση στα επίπεδα των DGDG (digalactosyl-diacyloglycerol) και μείωση των MGDG (monogalactosyl-diacylglycerol) (Gigon et al., 2004). Στην παρούσα εργασία φάνηκε ότι τα επίπεδα των ολικών λιπαρών αλλάζουν κατά τη μετάβαση από την ξηρή στην

αναγεννημένη κατάσταση και μάλιστα μειώνονται (Εικόνες 32, 33, 35). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με βιβλιογραφικές αναφορές που θέλουν τα επίπεδα των λιπαρών οξέων να μειώνονται στην καταπόνηση της ξηρασίας. Η ανάλυση της σύστασης των λιπαρών οξέων έδειξε ότι στο χειρισμό L τα λιπαρά οξέα C_{13:0}, C_{18:1ω-9} και C_{18:3ω-6} παρουσιάζουν μία σημαντική αύξηση, ενώ αντίθετα τα λιπαρά οξέα C_{16:1} C_{18:1} και C_{18:3ω-6} παρουσιάζουν μία σημαντικά χαμηλότερα σε σχέση με όλους τους άλλους χειρισμούς (LR, LNR, LNR_LNR, LRN). Μία εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι ότι ο λειχήνας είναι ένας εξαιρετικά ανθεκτικός οργανισμός και η κατάσταση της ξηρασίας δεν αποτελεί απαραίτητα καταπόνηση γι' αυτόν, αλλά στρατηγική αντιμετώπισης άλλων δυσμενών καταστάσεων. Το γεγονός ότι ο λειχήνας προσαρμόζεται στην ακραία χαμηλή θερμοκρασία επιβεβαιώνεται και από την ίση ποσότητα λιπαρών οξέων στους χειρισμούς LR και LRN, ενώ υπάρχει μικρή αύξηση στο χειρισμό LNR (Εικόνα 32). Η αύξηση των λιπαρών οξέων αποτελεί μία προσαρμογή που παρατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία (Weinstein et al., 2000) και συναντάται σε λειχήνες της Ανταρκτικής (Robinson, 2001).

4.2 Είναι δυνατόν να συνδεθεί η ακραιοφιλία του λειχήνα με βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όπως η ικανότητα παραγωγής H₂;

Όλα τα παραπάνω επιβεβαιώνουν ότι ο λειχήνας P. acetabulum είναι ανθεκτικός στην ξηρασία και στην ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196°C) και δεν επηρεάζεται δομικά και λειτουργικά, ούτε ο φωτοβιώτης, αλλά ούτε και ο μυκοβιώτης. Οι πρώτες ενδείξεις, που δεν παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη, είναι ότι αυτή η ιδιαιτερότητα δεν αφορά μόνο στο συγκεκριμένο λειχήνα, αλλά ένα μεγάλο αριθμό λειχήνων. Εξαιτίας αυτής της ιδιαίτερης ιδιότητάς τους χρησιμοποιήθηκαν ήδη σε κάποιες διαστημικές αποστολές για να ελεγχθεί η αντοχή τους και το ενδεχόμενο επιβίωσής τους σε άλλους πλανήτες. Πράγματι, οι λειχήνες φάνηκαν να αντέχουν σε συνθήκες προσομοίωσης του διαστήματος (de Vera et al., 2002) και μάλιστα διατήρησαν την ικανότητα αναπαραγωγής τους (de Vera et al., 2003). Ακόμα και κατά το πείραμα LICHEN (Sancho et al., 2007), στο οποίο οι λειχήνες εκτέθηκαν σε πραγματικές διαστημικές συνθήκες στον πλανήτη Άρη για δύο εβδομάδες, φάνηκε ότι αυτοί οι οργανισμοί παραμένουν λειτουργικοί. Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι οι λειχήνες θα μπορούσαν δυνητικά να επιβιώσουν και να είναι βιολογικά ενεργοί σε έναν άλλο πλανήτη που δεν πληροί τις γήινες προϋποθέσεις για να φιλοξενήσει ζωντανούς οργανισμούς, αρκεί αυτός να πληροί κάποιες ελάχιστες προϋποθέσεις, όπως είναι η διαθεσιμότητα απαραίτητων χημικών στοιχείων και η ύπαρξη μικροποσοτήτων υγρού νερού, έστω και περιστασιακά, για να λειτουργήσει μεταβολικά. Ένα ακόμα πλεονέκτημα που θα είχαν οι λειχήνες σε μία ενδεχόμενη αποστολή αποίκισης άλλου πλανήτη είναι το γεγονός ότι

φωτοσυνθέτουν. Οπότε μπορούν να αξιοποιήσουν την ηλιακή ακτινοβολία για να παράγουν οξυγόνο και οργανική ύλη για την επιβίωσή τους, δηλαδή θα ήταν αυτόνομοι. Μία τέτοια αποστολή, βέβαια, απαιτεί πολύ καλό σχεδιασμό και επίλυση πολλών προβλημάτων, ένα από τα οποία είναι η κάλυψη των ενεργειακών αναγκών. Οι λειχήνες θα μπορούσαν να αποτελέσουν μέρος της επίλυσης αυτού του προβλήματος. Οι Papazi et al. (2015) έδειξαν για πρώτη φορά, και η παρούσα μελέτη το επιβεβαίωσε, ότι οι λειχήνες είναι σε θέση σε ένα κλειστό σύστημα, να παράγουν μεγάλη ποσότητα μοριακού υδρογόνου φωτοσυνθετικά. Η ικανότητα αυτή οφείλεται στη συμβίωση του μύκητα και του φωτοσυνθετικού οργανισμού. Σε ένα κλειστό σύστημα, ο μύκητας καταναλώνει το οξυγόνο μέσω της αναπνοής, ώστε να δημιουργηθούν οι ανοξικές συνθήκες που χρειάζεται το ένζυμο υδρογενάση για να ενεργοποιηθεί, ενώ το χλωροφύκος τροφοδοτεί την υδρογενάση με ηλεκτρόνια μέσω του φωτοσυνθετικού μηχανισμού για το σχηματισμό H2. Επιπλέον, έδειξαν ότι η παραγωγή H2 είναι πολύ μεγάλη και σχεδόν ισόποση όταν γίνεται στο φως ή στο σκοτάδι (μέσω του μηγανισμού της φωτοανεξάρτητης ζύμωσης – dark fermentation). Το H_2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια ως καύσιμο και μάλιστα δίνει καλύτερη απόδοση κατά την καύση του σε σχέση με άλλα καύσιμα. Επιπλέον, δεν απελευθερώνει τοξικά παραπροϊόντα (Antal et al., 2011). Το πιο σημαντικό αυτής της προοπτικής είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο λειχήνας ως πηγή ενέργειας, χωρίς επιπλέον κόστος, όποτε χρειαστεί και η συντήρησή του για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα είναι εφικτή και χωρίς κόστος, λόγω της σταθερότητάς του σε ανενεργή μορφή, δηλαδή σε κατάσταση ξηρασίας.

Στην παρούσα εργασία έγινε η σύνδεση της συνδυαστικής ακραιοφιλίας των λειχήνων με πιθανές βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Οι χειρισμοί LR, LNR και LNR_LNR που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη επιβίωση, φάνηκε ότι διατηρούν αναλλοίωτη την ικανότητά τους σε ένα κλειστό σύστημα να δημιουργούν ανοξικές συνθήκες και να παράγουν μεγάλες ποσότητες μοριακού υδρογόνου (H₂). Τα επίπεδα H₂ δε διαφέρουν ανάμεσα στους τρεις χειρισμούς, όπως φαίνεται στην Εικόνα 37, αποδεικνύοντας ότι η ακραία χαμηλή θερμοκρασία και η απόλυτη ξηρασία δεν επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του λειχήνα και την παραγωγή H₂. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ποσότητα H₂ είναι ίδια στο φως και στο σκοτάδι, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της προηγούμενης εργασίας (Papazi et al., 2015), δηλαδή ο λειχήνας χρησιμοποιεί το μονοπάτι της dark fermentation κατά κύριο λόγο για την παραγωγή H₂, κάτι που δεν παρατηρείται σε άλλους οργανισμούς με την ίδια ικανότητα φωτοσυνθετικής παραγωγής H₂. Η διαδικασία μάλιστα είναι επαναλαμβανόμενη για το λειχήνα, δηλαδή εάν μεταβεί από ανοξικό περιβάλλον σε οξυγονικό και μετά πάλι σε κλειστό σύστημα, η ικανότητα παραγωγής H₂ διατηρείται (Εικόνα 38). Συνοψίζοντας, φαίνεται ότι ο λειχήνας όχι μόνο επιβιώνει σε ακραίες συνθήκες ξηρασίας και χαμηλής θερμοκρασίας, αλλά διατηρεί την ικανότητα παραγωγής H₂, με τη δυνατότητα μελλοντικών βιοτεχνολογικών εφαρμογών ακόμη και σε ακραία περιβάλλοντα, ανοίγοντας αστροβιολογικές και αστροβιοτεχνολογικές προοπτικές.

Τα πειράματα για την παραγωγή Η2 περιλαμβάνουν την επώαση του λειχήνα σε μπουκάλι ερμητικά κλειστό για πέντε ημέρες, αλλά τη δεύτερη ημέρα το οξυγόνο έχει καταναλωθεί από το μύκητα και επικρατούν ανοξικές συνθήκες στο περιβάλλον του λειχήνα. Συνεχίζει, όμως να παράγει Η₂ μέχρι και την πέμπτη ημέρα, οπότε παραμένει λειτουργικός σε αυτές τις συνθήκες. Φαίνεται, δηλαδή, ότι ο λειχήνας παρουσιάζει ανθεκτικότητα ακόμα και στην ανοξία, εκτός από την ξηρασία και την ακραία χαμηλή θερμοκρασία. Πιο συγκεκριμένα, η ανθεκτικότητα σε ανοξικές συνθήκες, όσον αφορά στο μυκοβιώτη, φαίνεται στην Εικόνα 48 από τις μετρήσεις της εργοστερόλης. Τα επίπεδα της εργοστερόλης δείχνουν μια σταδιακή μείωση μέχρι την πέμπτη ημέρα αλλά παραμένει σε επίπεδο που αποδεικνύει την επιβίωση του μύκητα. Επιπλέον, πέρα από την απόδειξη της δομικής ακεραιότητας, η αναπνευστική δραστηριότητα παραμένει σε υψηλά επίπεδα για όλες τις ημέρες (Εικόνα 50), δηλαδή ο μύκητας διατηρεί τη λειτουργικότητά του. Αυτό αποδεικνύεται και στην Εικόνα 49, όπου έχει γίνει ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας. Παρόλο που η ΑΟΧ μετά τη δεύτερη ημέρα έχει εξαφανιστεί, η COX, που είναι και το κύριο ένζυμο της αναπνοής, λειτουργεί κανονικά μέχρι και την πέμπτη ημέρα. Δεδομένου ότι από τη δεύτερη ημέρα στο περιβάλλον του λειχήνα επικρατούν ανοξικές συνθήκες, η λειτουργία της COX δικαιολογείται επειδή χρησιμοποιούνται άλλα μόρια ως δέκτες ηλεκτρονίων αντί για το οξυγόνο, όπως είναι τα νιτρικά και τα θεϊικά. Από την άλλη μεριά, το χλωροφύκος δεν παρουσιάζει την ίδια συμπεριφορά. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς προηγούμενες εργασίες με μονοκύτταρα χλωροφύκη που παράγουν Η2 σε ανοξικές συνθήκες, έχουν καταγράψει την κατάρρευση του PSII του φωτοσυνθετικού μηχανισμού από τη δεύτερη κιόλας ημέρα (Papazi et al., 2012). Το ίδιο επιβεβαιώνεται και στην παρούσα εργασία, όπου ο επαγωγικός φθορισμός δείχνει την κατάρρευση του PSII και τη μηδαμινή απόδοση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού μετά τη δεύτερη ημέρα (Εικόνες 39-44). Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα ταυτοποιήθηκε και μέσω πολαρογραφικών μετρήσεων ως παραγωγή οξυγόνου (Εικόνας 50) και φαίνεται μειωμένη, αλλά αυτό δικαιολογείται καθώς το PSII έχει απενεργοποιηθεί και ως εκ τούτου δεν απελευθερώνεται οξυγόνο και η φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων περιορίζεται στο PSI, που τροφοδοτεί πλέον με ηλεκτρόνια την υδρογενάση για την παραγωγή H₂ (PSII-ανεξάρτητο μονοπάτι παραγωγής H₂). Η ακεραιότητα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στη νέα λειτουργική οργάνωσή του φαίνεται από τις μετρήσεις του επιπέδου των γλωροφυλλών, οι οποίες διατηρούν τα ίδια επίπεδα όλες τις ημέρες επώασης σε ανοξικές συνθήκες, τόσο στο φως όσο και στο σκοτάδι (Εικόνες 46 και 47). Ιδιαίτερα η ακεραιότητα του PSI φαίνεται στην Εικόνα 45 με τον ανοσοεντοπισμό της PSaA να τη δείχνει σε αμετάβλητα επίπεδα όλες τις ημέρες. Συμπερασματικά, ο λειχήνας παραμένει δυνητικά ανθεκτικός καθ' όλη την πενθήμερη επώασή του στις συνθήκες ανοξίας, που από μόνος του εγκαθιδρύει σε ένα κλειστό σύστημα. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα ανθεκτικότητας και παραγωγής H₂ συμβαδίζουν για τους χειρισμούς LR και LNR, είτε η επώαση γίνεται στο φως είτε στο σκοτάδι Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός τροποποιείται και αντί να παράγει O₂, καταλήγει να παράγει H₂. Για να γίνει αυτό, το PSII καταρρέει, ενώ το PSI παραμένει λειτουργικό.

Το μέγεθος της καταπόνησης φαίνεται και από τον προσδιορισμό των πολυαμινών στις Εικόνες 51 και 52. Η πιο αξιοσημείωτη διαφοροποίηση συμβαίνει την ημέρα 5, όπου αυξάνονται τα επίπεδα της καδαβερίνης, πολυαμίνης που σχετίζεται με την αντιμετώπιση καταπονήσεων, συμπεριλαμβανομένου και του οξειδωτικού στρες (Jancewicz et al., 2016). Φαίνεται, δηλαδή, ότι ο λειχήνας ενεργοποιεί μηχανισμούς αντιμετώπισης της καταπόνησης που δέχεται στις ανοξικές συνθήκες του κλειστού συστήματος. Για την κατανόηση αυτών των μηχανισμών έγινε μέτρηση των επιπέδων των λιπαρών οξέων στους χειρισμούς LR και LNR, σε φως και σκοτάδι, σε διάστημα 5 ημερών (Εικόνες 53-59). Σε συνθήκες φωτός παρατηρείται μία μικρή αύξηση των ολικών λιπαρών στο χειρισμό LR και μία μικρή μείωση στον LNR, την ημέρα 1, αλλά μέχρι την ημέρα 5 τα επίπεδα έχουν επανέλθει (Εικόνα 53) Αυτό δείχνει ότι ο λειχήνας ενεργοποιεί μηχανισμούς αντιμετώπισης της καταπόνησης που δέχεται στις ανοξικές συνθήκες του κλειστού συστήματος. Οι συνθήκες ανοξίας οδηγούν στην παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) (Hunter et al., 1983; Crawford et al., 1994; Yan et al., 1996; Chirkova et al., 1998; Blokhina et al., 1999). Τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών εμφανίζουν ευπάθεια στις ROS, με αποτέλεσμα οι μεμβράνες να χάνουν την ακεραιότητά τους και τα κύτταρα να πεθαίνουν (Hetherington et al., 1982; Chirkova et al., 1989). Στο λειχήνα αυτό δεν παρατηρείται, όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα.

Η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται και στους χειρισμούς στο σκοτάδι, όπου εκεί και ο LR και ο LNR παρουσιάζουν μείωση των ολικών λιπαρών από την πρώτη ημέρα (Εικόνα 53) Τις υπόλοιπες ημέρες υπάρχει μια μικρή αύξηση. Βέβαια, στο σκοτάδι ενεργοποιείται το μονοπάτι της dark fermentation για την παραγωγή H₂, που όμως περιλαμβάνει το ένζυμο PFOR, το οποίο συμμετέχει στο μονοπάτι σύνθεσης λιπιδίων. Φαίνεται, δηλαδή, ότι ο λειχήνας συνθέτει λιπαρά για να διατηρηθεί ακέραιος και να επιβιώσει στην καταπόνηση που δέχεται, αλλά το μονοπάτι στο σημείο της PFOR κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται για την παραγωγή H₂, η οποία ουσιαστικά δρα ανταγωνιστικά με την παραγωγή λιπαρών οξέων.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι ο λειχήνας είναι ανθεκτικός στην ξηρασία, στην ακραία χαμηλή θερμοκρασία, στην ανοξία και στο συνδυασμό όλων αυτών. Το γεγονός ότι ένας τόσο ανθεκτικός οργανισμός μπορεί να συνδεθεί με βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όπως φάνηκε παραπάνω, διευρύνει τις δυνατότητες αυτού του τομέα. Ο τομέας της βιοτεχνολογίας ασχολείται με την εφαρμογή ζωντανών οργανισμών, αλλά και των παραγώγων τους, σε διαδικασίες και προϊόντα της βιομηχανίας (Hamlyn, 1997). Σε αυτόν συμπεριλαμβάνεται και η έρευνα στην τεχνική της ακινητοποίησης ενζύμων και μικροοργανισμών, που όπως φανερώνει η ετυμολογία της λέξης, αποσκοπεί στον περιορισμό της κίνησης (Yu-Qung, 2004). Κυρίως, αναφέρεται στον περιορισμό της κίνησης μορίων-βιοκαταλυτών ή και ολόκληρων κυττάρων, πάνω σε κατάλληλο υλικό, με στόχο να γίνεται η επαναλαμβανόμενη χρήση κάποιας ιδιότητάς τους στη βιομηχανία, με λιγότερα χρήματα και καλύτερη απόδοση (Mahmoud and Helmy, 2009). Μία προϋπόθεση σε αυτή τη διαδικασία είναι η ανθεκτικότητα του βιοκαταλύτη ή των κυττάρων για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο υλικό της ακινητοποίησης. Στην περίπτωση των λειχήνων, η τεχνική της ακινητοποίησης έχει γίνει από την ίδια τη φύση. Ο μύκητας αποτελεί το υλικό υπόστρωμα, πάνω στο οποίο ακινητοποιούνται ολόκληρα κύτταρα χλωροφυκών. Ο μύκητας προσφέρει τη μηχανική στήριξη, διατηρεί σταθερές τις συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος και εξασφαλίζει τη βιωσιμότητα και τη λειτουργικότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων του χλωροφύκους (Wang et al., 2014). Πληρούνται, δηλαδή, όλες οι προϋποθέσεις μιας επιτυχημένης ακινητοποίησης, όπως συνοψίζονται στην εργασία των Mahmoud and Helmy, (2009). Σε αυτή την κατάσταση, τα χλωροφύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία για την παραγωγή Η₂ ως βιοκαύσιμο.

4.3 Είναι η συμβίωση μυκοβιώτη και φωτοβιώτη το κλειδί της ακραιόφιλης συμπεριφοράς του λειχήνα ή πρόκειται για δύο ανεξάρτητα ακραιόφιλους οργανισμούς;

Για να δωθεί μία απάντηση σε αυτή την ερώτηση, ελέγχθηκε η ανθεκτικότητα του ελεύθερου, μη συμβιωτικού, χλωροφύκους του γένους *Trebouxia* σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196°C) ενώ είναι ενυδατωμένο (TRN χειρισμός), αλλά και σε έκθεση πρώτα σε απόλυτη ξηρασία και μετά στην ακραία χαμηλή θερμοκρασία των -196°C (TNR χειρισμός). Στην Εικόνα 61 παρουσιάζονται οι μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού για την πρώτη περίπτωση, δηλαδή την έκθεση στους -196°C, ενώ το χλωροφύκος ήταν ενυδατωμένο. Αυτό που φαίνεται από την καμπύλη φθορισμού και την τιμή της μέγιστης φωτοσυνθετικής απόδοσης, εκφρασμένης σε Fv/Fm, είναι ότι το χλωροφύκος είναι απόλυτα ανθεκτικό. Την ίδια ανθεκτικότητα παρουσιάζει και στη δεύτερη περίπτωση, δηλαδή στη συνδυαστική έκθεση σε απόλυτη ξηρασία και στους -196°C, όπως φαίνεται στην Εικόνα 60. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύονται και από παρατηρήσεις ανθεκτικότητας χλωροφυκών του γένους *Trebouxia* σε χαμηλή θερμοκρασία, μέχρι και τους -40°C (Hájek et al., 2012). Εδώ καταγράφεται ένα επιπλέον επίπεδο ανθεκτικότητας, αυτό της ξηρασίας ή και του συνδυασμού της με ακραία χαμηλή θερμοκρασία.

Τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα χλωροφύκη έχουν μηχανισμούς ανθεκτικότητας, αλλά αυτό γίνεται εφικτό μόνο όταν αυτά βρίσκονται σε συμβίωση με ένα μύκητα

στα πλαίσια ενός λειχήνα (Brock, 1975; Kranner et al., 2005; Kosugi, 2009; Gostinčar et al., 2012; Wang et al., 2014). Στην παρούσα πειραματική προσέγγιση έγινε ξεκάθαρο ότι το ελεύθερο από το μυκοβιώτη χλωροφύκος Trebouxia, όχι μόνο επιβίωσε κατά την έκθεσή του σε ακραία χαμηλή θερμοκρασία και τη μετάβαση από την υγρή στην ξηρή κατάσταση, αλλά και στο συνδυασμό των δύο, αναδεικνύοντας μία εντυπωσιακή ακραιοφιλία, εφάμιλλη ή και ανώτερη από αυτή του λειχήνα. Επανάληψη των πειραμάτων με ένα χλωροφύκος διαφορετικής οικογένειας, όπως είναι το Scenedesmus obliquus, ένα ιδιαίτερα ανθεκτικό και ευπροσάρμοστο στην καταπόνηση χλωροφύκος (Sfichi et al., 2008; Papazi and Kotzabasis, 2013), έδειξαν ότι δεν παρουσιάζει την ίδια ανθεκτικότητα σε αυτές τις ακραίες συνθήκες. Η εν λόγω καλλιέργεια μετά την έκθεσή της σε συνθήκες απόλυτης ξηρασίας ή και ακραία χαμηλής θερμοκρασίας δεν μπόρεσε, όπως έδειξαν και οι μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού, να επανέλθει λειτουργικά (Εικόνες 62 και 63). Αυτό επιβεβαιώνει ότι η ανθεκτικότητα σε αυτές τις συνθήκες δεν συναντάται ευρέως στα χλωροφύκη και η εντυπωσιακή ακραιοφιλία του φωτοβιώτη του λειχήνα δεν είναι άμεσα λειτουργικό αποτέλεσμα της συμβίωσης με το μυκοβιώτη, σε αντίθεση με τη μέχρι τώρα επικρατούσα αποδοχή, αλλά πρόκειται για δύο ξεχωριστά ανθεκτικούς οργανισμούς, που ενδεχομένως αυτή η ακραιοφιλία να αναπτύχθηκε στην πορεία της εξέλιξης μέσω της συμβίωσής τους στο λειχήνα.

4.4 Λειχήνες και η θεωρία της πανσπερμίας

Η πρωτοφανής και συνδυαστική ανθεκτικότητα του λειχήνα σε ακραία περιβάλλοντα, όπως μελετάται στην παρούσα εργασία, μπορεί να δώσει προεκτάσεις για αστροβιολογικές και αστροβιοτεχνολογικές εφαρμογές. Επιπλέον, η ιδιαίτερη απόκριση του οργανισμού σε ακραία περιβάλλοντα και η ικανότητά του να παράγει εκμεταλλεύσιμη ενέργεια, με τη μορφή H₂, σε αυτές τις συνθήκες τον κάνουν ιδανικό υποψήφιο για μια μελλοντική διαστημική αποστολή σε άλλο πλανήτη. Δεδομένου ότι πρόκειται για φωτοσυνθετικό οργανισμό, όταν εκτεθεί σε φως μπορεί να χρησιμοποιήσει την ηλιακή ενέργεια για να παράγει O₂ και οργανική ύλη. Αντίθετα όταν βρίσκεται σε ανοξικό περιβάλλον έχει τη δυνατότητα παρουσία ή απουσία φωτός να παράγει μοριακό H₂.

Η συμβατική άποψη για τη ζωή είναι ότι ξεκίνησε με φυσικό τρόπο πάνω στη Γη. Υπάρχει όμως και ένα εναλλακτικό σενάριο για τη δημιουργία των πρώτων μορφών ζωής. Είναι η ζωή από τον ουρανό ή από τα αστέρια. Πριν περίπου 25 χρόνια οι Fred Hoyle και Chandra Wickramsinghe, πρότειναν ότι οι κομήτες μπορούν να μεταφέρουν σπόρια ζωής από το ένα αστρικό σύστημα στο άλλο. Αυτή η ιδέα σήμερα είναι γνωστή ως τη θεωρία της πανσπερμίας. Εάν η ουρά ενός τέτοιου κομήτη, που φέρει ζωή, μπορούσε να περάσει από τη Γη και να αφήσει μερικούς από τους παγωμένους μικροοργανισμούς του στην ατμόσφαιρα, τότε κάποιοι οργανισμοί μπόρεσαν να φτάσουν στην επιφάνεια της Γης. Οι δύο αστρονόμοι τόλμησαν να ισχυριστούν ότι αυτό το γεγονός θα μπορούσε να ήταν η έναρξη της ζωής πάνω στη Γη. Φυσικά είναι γεγονός ότι η πανσπερμία παραμένει μια αμφιλεγόμενη θεωρία, και είναι φυσικό να υπάρχουν και πολλές αντιδράσεις σε αυτή. Σε κάθε περίπτωση όμως η αντίδραση στην πανσπερμία είναι λιγότερο εχθρική σήμερα από όσο ήταν 25 χρόνια πριν, επειδή στο μεσοδιάστημα έχουν βρεθεί βακτήρια σε ακραίες συνθήκες στη Γη, αλλά και στο εργαστήριο επέζησαν κάτω από σκληρές συνθήκες. Έτσι η ιδέα της πανσπερμίας δεν είναι πλέον και τόσο παράξενη, όπως ήταν κάποτε. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας που αφορούν στην ανθεκτικότητα ενός γήινου οργανισμού, όπως αυτός των λειχήνων, σε παρατεταμένη έλλειψη νερού και ακραία χαμηλή θερμοκρασία (-196°C), ενισχύει τη θεωρία της πανσπερμίας.

Ανεξάρτητα, όμως, από το αν ισχύει η θεωρία της πανσπερμίας ή όχι, με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας είναι δυνατό η ανθρωπότητα να οραματιστεί μία Αντίστροφη Υποβοηθούμενη Πανσπερμία (ΑΥΠ) μεταφέροντας τη ζωή σε άλλα αστρικά συστήματα. Η ΑΥΠ θα αφορά στοχευμένη μεταφορά ανθεκτικών οργανισμών, όπως οι λειχήνες, σε συγκεκριμένους κομήτες, που θα τους μεταφέρουν σε άνυδρη και παγωμένη μορφή σε άλλα αστρικά συστήματα, που πιθανόν να έχουν τη δυνατότητα όχι μόνο να επιβιώσουν αλλά και να λειτουργήσουν αυτόνομα, παράγοντας ενέργεια και μετατρέποντας την ανόργανη ύλη σε οργανική, χρησιμοποιώντας μόνο φως.

Βιβλιογραφία

- Allen, J. F. (2003) Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *TRENDS in Plant Science* **8**:15-19.
- Anna, J.M, Scholes, G.D., van Grondelle, R. A (2013) Little Coherence in Photosynthetic Light Harvesting. *BioScience* 1-12.
- Antal, T.K., Krendeleva, T.E., Laurinavichene, T.V., Makarova, V.V., Ghirardi, M.L., et al. (2003) The dependence of algal H₂ production on Photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Biochim Biophys Acta* 1607:153–160.
- Antal, T.K., Krendeleva, T.E., Rubin, A.B. (2011) Acclimation of green algae to sulfur deficiency: underlying mechanisms and application for hydrogen production. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:3–15.
- Arnon, D.I. et al. (1954) Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Nature* 174:394–396.
- Arnon, D.I. et al. (1971) The Light Reactions of Photosynthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. 68: 2883-2892.
- Bada, J. L. (2004) How life began on Earth : a status report, *Earth and Planetary Science Letters* 226: 1–15.
- Bahcall, J. N., Ulrich, R. K. (1988) Solar models, neutrino experiments, and helioseismology. *Rev. Mod. Phys.* 60:297.
- Bendre, A. K., A. (2010) A Text Book of Practical Botany-1.
- Benemann, J.R., Berenson, J.A., Kaplan, N.O., Kamen, M.D. (1973) Hydrogen evolution by chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system. *Proc Natl Acad Sci* **70**:2317–2320.
- Bishop, N.L., Senger, H. (1971) Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of Scenedesmus. Pietro S, editor. *New York: Academic Press.* 130–143.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37:**911-917.
- Blokhina, O.B., Fagerstedt, K.V., Chirkova, T.V. (1999) Relationships between lipid peroxidation and anoxia tolerance in a range of species during post-anoxic reaeration. *Physiologia Plantarum* **105**: 625-632.
- Blokhina, O.B., Virolainer, E., Fagerstedt, K. (2002) Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* **91:**179-194.

- Borovikova, D., Teparić, R., Mrša, V., Rapoport, A. (2016) Anhydrobiosis in yeast: cell wall mannoproteins are important for yeast Saccharomyces cerevisiae resistance to dehydration. *Yeast* ISSY32 Special Issue.
- Brock, T. D. (1975) The effect of water potential on photosynthesis in whole lichens and in their liberated algal components. *Planta* **124**: 13–23.
- Brown, D., Cole, S., Webster, G., Agle, D.C., Chicoine, R.A., Rickman, J., Hoover, R., Mitrofanov, I., Ravine, M., Hassler, D., Cuesta, L., Jones, N.N., Barnstorff, K. (2013) The Mars Science Laboratory Landing. *World Neurosurg* 79:223-242.
- Bunsupa, S., Katayama, K., Ikeura, E., Oikawa, A., Toyooka, K., Saito, K., et al. (2012a) Lysine decarboxylase catalyzes the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis and coevolved with alkaloid production in leguminosae. *Plant Cell* **24**:1202–1216.
- Caldeira, K., Kasting, J.F. (1992) The life span of the biosphere revisited. *Nature* **360**:721–723.
- Catling, D. C., Zahnle, K. J., Mckay, C. P. (2001) Biogenic Methane, Hydrogen Escape, and the Irreversible Oxidation of Early Earth, **293**: 839–844.
- Chirkova, T.V., Sinyutina, N.F., Blyudzin, Y.A., Barsky, I.E., Smetannikova, S.V. (1989) Phospholipid fatty acids of root mitochondria and microsomes from rice and wheat seedlings exposed to aeration or anaerobiosis. *Russian Journal of Plant Physiology* **36**: 126-134.
- Chirkova, T.V., Novitskaya, L.O., Blokhima, O.B. (1998) Lipid peroxidation and antioxidant systems under anoxia in plants differing in their tolerance to oxygen deficiency. *Russian Journal of Plant Physiology* **45**: 55-62.
- Cockell, C.S. (2007) The interplanetary exchange of photosynthesis. Orig Life Evol Biosph.
- Cockell, C.S., Bush, T., Bryce, C., Direito, S., Fox-Powell, M., Harrison, J.P., Lammer, H., Landenmark, H., Martin-Torres, J., Nicholson, N., Noack, L., O'Malley-James, J., Payler, S.J., Rushby, A., Samuels, T., Schwendner, P., Wadsworth, J., Zorzano, M.P. (2016) Habitability: A Review. *Astrobiology* 16:1-29.
- Cohen, S.S. (1998) A Guide to the Polyamines. Oxford University Press, New York 1-59.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico, R., Tavladoraki, P. (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci.* **11**:80–88.
- Cramer, W.A. et al. (2011) The Q cycle of cytochrome bc complexes: a structure perspective. *Biochim. Biophys. Acta* 1807:788-802.
- Crawford, R.M.M., Walton, J.C., Wollenweber-Ratzer, B. (1994) Similarities between postischaemic injury to animal tissues and post anoxic injury in plants. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* **102B**:325-332.

- Dahlman, L., Zetherstrom, M., Sundberg, B. (2002) Measuring Ergosterol and Chitin in lichens. *Protocols in Lichenology* Chapter 21:348-362.
- Demetriou, G., Neonaki, C., Navakoudis, E., Kotzabasis, K. (2007) Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus- The protective role of polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta* **1767**: 272-280.
- de Vera, J.P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S. (2002) The potential of the lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *International Journal of Astrobiology 1* 4: 285–293.
- de Vera, J.-P.P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S. (2003) The potential of the lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space II. germination capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions *Advances in Space Research* 33: 1236–1243.
- de Vera, J.-P.P. (2012) Lichens as survivors in space and on Mars. *Fungal Ecology* 5: 472-479.
- Dubini, A.G., M.L. (2014) Engineering photosynthetic organisms for the production of biohydrogen. *Photosynth Res* **123**:241-253.
- Florin, E., Tsokoglou, A., Happe, T. (2001) A Novel Type of Iron Hydrogenase in the Green Alga Scenedesmus obliquus Is Linked to the Photosynthetic Electron Transport Chain. The J. Biol. Chem. 276:6125–6132.
- Fontaneto, D., Bunnefeld, N., Westberg, M., (2012) Long-Term Survival of Microscopic Animals Under Desiccation Is Not So Long. *Astrobiology* **12**: 863-869.
- Frenkel, A. (1954) Light induced phosphorylation by cell-free preparations of photosynthetic bacteria. J. Am. Chem. Soc. 76:5568–5569.
- Ghirardi, M., Togasaki, R. (1997) Oxygen sensitivity of algal H₂-production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **63-65**: 143-151.
- Gigon, A., Matos, A.R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.T. (2004) Effect of Drought Stress on Lipid Metabolism in the Leaves of Arabidopsis thaliana (Ecotype Columbia). *Annals* of Botany 94: 345-351.
- Goodrich, R.P., Handel, T.M., Baldeschwieler, J.D. (1988) Modification of lipid phase behaviour with membrane-bound cryoprotectants. *Biochimica et Biophysica Acta* **938**:143–154.
- Gostinčar, C., Muggia, L., Grube, M. (2012) Polyextremotolerant black fungi: oligotrophism, adaptive potential, and a link to lichen symbioses. *Front. Microbio.* **3:** 390.
- Hájek, J., Váczi, P., Barták, M., Jahnová, L. (2012) Interspecific differences in cryoresistance of lichen symbiotic algae of genus Trebouxia assessed by cell viability and chlorophyll fluorescence. *Cryobiology* **64**: 215-222.

- Hájek, J., Váczi, P., Barták, M. (2009) Photosynthetic electron transport at low temperatures in the green algal foliose lichens Lasallia pustulata and Umbilicaria hirsuta affected by manipulated levels of ribitol. *Photosynthetica* 47: 199-205.
- Hájek, J., Váczi, P., Barták, M. Smejkal, L., Lipavská, H. (2009) Cryoprotective role of ribitol in Xanthoparmelia somloensis. *Biol. Plantarum* **53:** 677-684.
- Hamlyn, P.F. (1997) Fungal Biotechnology. NWFG Newsletter (ISSN 1465-8054).
- Happe, T., Naber, D. (1993) Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem* **214**:475-481.
- Hartley, J. Origins of life on Earth: Panspermia or thermal vents.
- Hess, S.L., Henry, R.M., Leovy, C.B., Ryan, J.A. Tillman, J.E. (1977) Meteorological results from the surface of Mars: viking 1 and 2. *J. Geophys. Res.* **82**:4559–4574.
- Hetherington, A.M., Hunter, M.I., Crawford, R.M.M. (1982) Contrasting effects of anoxia on rhizome lipids of Iris species. *Phytochemistry* **21**: 1275-1278.
- Hoehler, T. M., Bebout, B. M., Marais, D. J. Des. (2001) The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early Earth. *Nature* **412**:324–327.
- Holden, M. (1965) Chlorophylls. In: Goodwin TW Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. *Academic Press* 461–488.
- Holzinger, A., Karsten, U. (2013) Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological, and molecular mechanisms. *Front. Plant Sci.* 4:327.
- Honegger, R. (1998) The lichen symbiosis- What is so spectacular about it?. *The Lichenologist* 30: 193–212.
- Hounsa, C.G., Brandt, E.V., Thevelein, J., Hohmann, S., Prior, B.A. (1998) Role of trehalose in survival of Saccharomyces cerevisiae under osmotic stress. *Microbiology* **144**: 671-680.
- Hunter, M.I.S., Hetherington, A.M., Crawford, R.M.M. (1983) Lipid peroxidation-a factor in anoxia intolerance in Iris species? *Phytochemistry* **22:**1145-1147.
- Ioannidis, N., Kotzabasis, K. (2007) Effects of polyamines on the functionality of photosynthetic membrane in vivo and in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* **1767**: 1372-1382.
- Ioannidis, N., Kotzabasis, K. (2014) Could structural similarity of specific domains between animal globins and plant antenna proteins provide hints important for the photoprotection mechanism? *Journal of Theoretical Biology* 364:71-79.

- Ioannidis, N., Sfichi-Duke, L., Kotzabasis, K. (2011) Polyamines stimulate non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence in Scenedesmus obliquus. *Photosynth Res* 107: 169-175.
- Ioannidis, N., Tsiavos, T., Kotzabasis, K. (2012) Chemical bonding of chlorophylls and plant aminic axial ligands impact harvesting of visible light and quenching of fluorescence. *Photochemistry and Photobiology* 88: 98-106.
- Jancewicz, A. L., Gibbs, N. M., Masson, P. H. (2016) Cadaverine 's Functional Role in Plant Development and Environmental Response. *Front. Plant Sci.* 7:1–8.
- Jänchen, J., Meeßen, J., Herzog, T. H., Feist, M., de la Torre, R., de Vera J.-P.P. (2015) Humidity interaction of lichens under astrobiological aspects : the impact of UVC exposure on their water retention properties. *International Journal of Astrobiology* **14**: 445–456.
- Jortner, J. (2006) Conditions for the emergence of life on the early Earth: summary and reflections. *Phil. Trans. R. Soc. B* **361**:1877–1891.
- Kappen, L., Valladares, F. (2007) Opportunistic growth and desiccation tolerance, the ecological success of poikilohydrous autotrophs. *Functional Plant Ecology*, edited by. F. Pugnaire and F. Valladares, Taylor and Francis, New York, pp 7–65.
- Kasting, J.F., Kopparapu, R.K., Ramirez, R.M., Harman, C.E. (2014) Remote life-detection criteria, habitable zone boundaries, and the frequency of Earth-like planets around M and late K stars. *PNAs* **111**: 12641-12646.
- Kates, M. (1972) In Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids. *North-Holland Pub. Co.*, New York.
- Komiya, T., Shibata, S. (1971) Polyols produced by the cultured phyco- and mycobionts of some Ramalina species. *Phytochemistry* **10**: 695-699.
- Kopparapu, R.K. (2013) A revised estimate of the occurrence rate of terrestrial planets in the habitable zones around Kepler M-Dwarfs. *The astrophysical journal letters* **767:**1-5.
- Kosugi, M., Arita, M., Shizuma, R., Moriyama, Y., Kashino, Y., Koike, H., Satoh, K. (2009) Responses to Desiccation Stress in Lichens are Different from Those in Their Photobionts. *Plant Cell Physiol.* 50: 879–888.
- Kotakis, C., Theodoropoulou, E., Tassis, K., Oustamanolakis, C., Ioannidis, N., Kotzabasis, K. (2013) Putrescine, a fast-acting switch for tolerance against osmotic stress. *Journal of Plant Physiology* 171: 48-51.
- Kotzabasis, K., Christakis-Hampsas, M.D., Roubelakis-Angelakis, K.A. (1993) A narrow-bore HPLC method for the identification and quantitation of free, conjugated, and bound polyamines. *Analytical biochemistry* **214**: 484-489.

- Kotzabasis, K., Strasser, B., Navakoudis, E., Senger, H., Dörnemann, D. (1999) The regulatory role of polyamines in structure and functioning of the photosynthetic apparatus during photoadaptation. *J. Photochem. Photobiol. B:Biol* **50**: 45-52.
- Kranner, I., Cram, W.J., Zorn, M., Wornik, S., Yoshimura, I., Stabentheiner, E., et al. (2005) Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102:** 3141–3146.
- Kranner, I., Beckett, R., Hochman, A., Nash, T. H. (2008) Desiccation-tolerance in lichens: a review. *The Bryologist* **111:** 576–593.
- Kumar, S.V., Rajam, M.V. (2004) Polyamine ethylene nexus: A potential target for post harvest biotechnology. *Indian Journal of Biotechnology* **3:**299-304.
- Kuznetsov, V., Shorina, M., Aronova, E., Stetsenko, L., Rakitin, V., Shevyakova, N. (2007). NaCl- and ethylene-dependent cadaverine accumulation and its possible protective role in the adaptation of the common ice plant to salt stress. *Plant Sci* 172:363–370.
- Lowry, O., Rosebrough. N., Farr, A., Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagen. *J Biol Chem* **193:**265–275.
- Lunine, J. I. (2006) Physical conditions on the early Earth. *Phil. Trans. R. Soc. B* 361:1721–1731.
- Lütz, C., Navakoudis, E., Seidlitz, H.K., Kotzabasis, K. (2005) Simulated solar irradiation with enhanced UV-B adjust plastid- and thylakoid-associated polyamine changes for UV-B protection. *Biochimica et Biophysica Acta* **1710**: 24-33.
- Mahmoud, D.A.R., Helmy, W.A. (2009) Potential application of immobilization technology in enzyme and biomass production (review article). *J. Appl. Sci. Res.* **5:** 2466-2476.
- Malley-james, J. T. O., Greaves, J. S., Raven, J. A., Cockell, C. S. (2015) In Search of Future Earths : Assessing the Possibility of Finding Earth Analogues. *Astrobiology* **15**:400–411.
- McKay, C.P. (2016) An origin of life on Mars. Cold Spring Harb Perspect Biol 1-7.
- Meeßen, J., Backhaus, T., Sadowsky, A., Mrkalj, M., Sánchez, F. J., de la Torre, R., Ott, S. (2014) Effects of UVC_{254nm} on the photosynthetic activity of photobionts from the astrobiologically relevant lichens Buellia frigida and Circinaria gyrosa. *International Journal of Astrobiology* 13:340–352.
- Meeßen, J., Sánchez, F.J., Brandt, A., Balzer, E.M., de la Torre, R., Sancho, L.G., de Vera, J.-P.P., Ott, S. (2013) Extremotolerance and resistance of lichens: comparative studies on five species used in astrobiological research I. Morphological and anatomical characteristics. *Orig. Life Evol. Biosph* 43:283–303.

- Melis, A., Happe, T. (2001) Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant Physiol* **127:**740–748.
- Melosh, H. J. (1988) The rocky road to panspermia. *Nature* **332:**687.
- Metcalfe, L.D., Schmitz, A.A., Pelka, J.R. (1966) Preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* **38:**514-516.
- Moschou, P.N., Paschalidis, K.A., Roubelakis-Angelakis, K.A. (2008) Plant polyamine catabolism: the state of the art. *Plant Signaling & Behavior* **12**:1061-1066.
- Nash, T.H. III (ed) (2008) Lichen biology. Cambridge University Press Cambridge.
- Navakoudis, E., Lütz, C., Langebartels, C., Lütz-Meindl, U., Kotzabasis, K. (2003) Ozone impact on the photosynthetic apparatus and the protective role of polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta* 1621: 160-169.
- Navakoudis, E., Vrentzou, K., Kotzabasis, K. (2007) A polyamine- and LHCII protease activity-based mechanism regulates the plasticity and adaptation status of the photosynthetic apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta* **1767**:261–271.
- Nguyen, T.A.D., Kim, J.P., Kim, M.S., Oh, Y.K., Sim, S.J., (2008a) Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria, Thermotoga maritima and Thermotoga neapolitana in batch fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* **33**:1483-1488.
- Papadakis, I.A., Kotzabasis, K., Lika, K. (2005) A cell-based model for the photoacclimation and CO2-acclimation of the photosynthetic apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta* 1708:250 – 261.
- Papazi, A., Andronis, E., Ioannidis, N.E., Chaniotakis, N., Kotzabasis, K. (2012) High Yields of Hydrogen Production Induced by Meta-Substituted Dichlorophenols Biodegradation from the Green Alga *Scenedesmus obliquus*. *PLoS ONE* **7:** 1-16.
- Papazi, A., Kastanaki, E., Pirintsos, S., Kotzabasis, K. (2015) Lichen Symbiosis : Nature 's High Yielding Machines for Induced Hydrogen Production. *PLoSONE* **10**:1–22.
- Papazi, A., Kotzabasis, K. (2013) Rational Management of Dichlorophenols Biodegradation by the Microalga *Scenedesmus obliquus*. *PLoS ONE* **8:**1-12.
- Pham-Thi, A.T., Borrel-Flood, C., Vieira da Silva, J., Justin, A.M., Mazliak, P. (1985) Effects of water stress on lipid metabolism in cotton leaves. *Phytochemistry* **24**: 723–727.
- Pham-Thi, A.T., Borrel-Flood, C., Vieira da Silva, J., Justin, A.M., Mazliak, P. (1987) Effects of drought on [1-¹⁴C]-oleic and [1-¹⁴C]-linoleic acid desaturation in cotton leaves. *Physiologia Plantarum* 69: 147–150.
- Rages, K., Freedman, R., Geophys, J. (2000) *Res.* **105:**11981.

- Richardson, D. H. S., Hill, D. J., Smith, D. C. (1968) Lichen physiology. XI. The role of the alga in determining the pattern of carbohydrate movement between lichen symbionts. *New Phytol* **67**: 469-486.
- Robinson, C. (2001) Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. New Phytologist 151: 341– 353.
- Rogov, A.G., Sukhanova, E.I., Uralskaya, L. A., Aliverdieva, D. A., Zvyagilskaya, R.A. (2014) Alternative Oxidase: Distribution, Induction, Properties, Structure, Regulation, and Functions. *Biochemistry* 79:1615-1634.
- Sancho, L.G., de la Torre, R., Horneck, G., Ascado, C., de los Rios, A., Pintado, A., Wierzchos, J., Schuster, M. (2007) Lichens Survive in Space: Results from the 2005 LICHENS Experiment. *Astrobiology* 7: 443-454.
- Sfakianaki, M., Kotzabasis, K. (2006) The involvement of LHCII-associated polyamines in the response of the photosynthetic apparatus to low temperature. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **84**:181–188.
- Sfichi, L., Ioannidis, N., Kotzabasis, K. (2004) Thylakoid-associated Polyamines Adjust the UV-B Sensitivity of the Photosynthetic Apparatus by Means of Light-harvesting Complex II Change. *Photochemistry and Photobiology* 80: 499-506.
- Sfichi-Duke, L., Ioannidis, N., Kotzabasis, K. (2008) Fast and reversible response of thylakoid-associated polyamines during and after UV-B stress: a comparative study of the wild type and a mutant lacking chlorophyll b of unicellular green alga Scenedesmus obliquus. *Planta* 228:341–353.
- Shao, H.B., Liang, Z.S., Shao, M.A. (2006) Osmotic regulation of 10 wheat (Triticum aestivum L.) genotypes at soil water deficits. *Colloid Surface B* 47: 132-139.
- Shevyakova, N. I., Rakitin, V. Y., Duong, D. B., Sadomov, N. G., Kuznetsov, V. V. (2001) Heat shock-induced cadaverine accumulation and translocation throughout the plant. *Plant Sci* 161:1125–1133.
- Shih, P. M. (2015) early Earth. *Current Biology* **25**:855–859.
- Smith, D, Muscatine, L, Lewis, D. (1969) Carbohydrate movement from autotrophs to heterotrophs in parasitic and mutualistic symbiosis. *Biol Rev Camb Philos Soc* **44**:17-90.
- Spribille, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M.C., Schneider, K., Stabentheiner, E., Toome-Heller, M., Thor, G., Mayrhofer, H., Johannesson, H., McCutcheon, J.P. (2016) Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichen. *Science*.
- Stein, J. (1973) (Ed.) Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements. *Cambridge University Press* 448.

- Strasser, B.J., Strasser, R.J., (1995) Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test. In: Mathis P. Photosynthesis: from light to biosphere. Dordrecht: *Kluwer Academic Press* 977–980.
- Sziderics, A. H., Oufir, M., Trognitz, F., Kopecky, D., Matušíková, I., Hausman, J.-F., et al. (2010) Organ-specific defence strategies of pepper (*Capsicum annuum L.*) during early phase of water deficit. *Plant Cell Rep.* 29:295–305.
- Tillman, J.E. (1988) Mars global atmospheric oscillations: annually synchronized, transient normal-mode oscillations and the triggering of global dust storms. J. Geophys. Res. 93:9433–9451.
- Tobias, C. A., Todd, P. (1974) Radiation and molecular and biological evolution. Space radiation biology and related topics. *New York, Academic Press* 197-255.
- Tschaikner, A., Ingolić, E., Holzinger, A., Gärtner, G. (2007) Phycobionts of some species of Evernia and Ramalina. *Herzogia* **20**: 53-60.
- Tschermak-woess, E. (1989) The Algal Partner.- In GALUN M. CRC Handbook of Lichenology vol. I:39–92. – Boca Raton: CRC Press.
- Walker, D.A. (2002) The Z-scheme down hill all the way. Trends Plant Sci. 7:183–185.
- Wang, Y.Y, Liu, B., Zhang, X.Y., Zhou, Q.M., Zhang, T., Li, H., Yu, Y.F., Zhang, X.L, Hao, X.Y., Wang, M., Wang, L., Wei, J.C. (2014) Genome characteristics reveal the impact of lichenization on lichen-forming fungus Endocarpon pusillum Hedwig (Verrucariales, Ascomycota). *BMC Genomics* 15: 1-18.
- Wang, Y.Y., Zhang, X.Y., Zhou, Q.M., Zhang, X.L., Wei, J.C. (2015) Comparative transcriptome analysis of the lichen-forming fungus Endocarpon pusillum elucidates its drought adaptation mechanisms. *Sci China Life Sci* **58**: 89-100.
- Weete, J.D., Abril, M., Blackwell, M. (2010) Phylogenetic distribution of fungal sterols. *PLoS One.* **5.**
- Weinstein, R.N., Montiel, P.O., Johnstone, K. (2000) Influence of growth temperature on lipid and soluble carbohydrate synthesis by fungi isolated from fellfield soil in the maritime Antarctic. *Mycologia* **92**: 222–229.
- Worth, R. J., Sigurdsson, S., House, C. H. (2013) Seeding Life on the Moons of the Outer Planets via Lithopanspermia. *Astrobiology*.
- Yan, B., Dai, Q., Liu, X., Huang, S., Wang, Z. (1996) Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant and Soil* **179:**261-268.

- Yu-Qung, Z., Mei-Lin, T., Wei-De, S., Yu-Zhen, Z., Yue, D., Yan, M., Wen-Ling, Z. (2004) Immobilization of L-asparaginase of the microparticles of the natural silk serum protein and its characters. *Biomaterials* **25**:3151-3759.
- Zerges, W. (2002) Does complexity constrain organelle evolution? *Trends Plant Sci.* 7:175–182.
- Zhang, T., Wei, J. (2011) Survival analyses of symbionts isolated from Endocarpon pusillum Hedwig to desiccation and starvation stress. *Sci China Life Sci* **54**:480-489.
- Zubrin, R. (1993) A Calendar for Mars. Ad Astra 5:25.
- Zwicke, M., Picon-Cochard, C., Morvan-Bertrand, A., Prud'homme, M. P., Volaire, F. (2015) What functional strategies drive drought survival and recovery of perennial species from upland grassland? *Annals of Botany* 1-15.