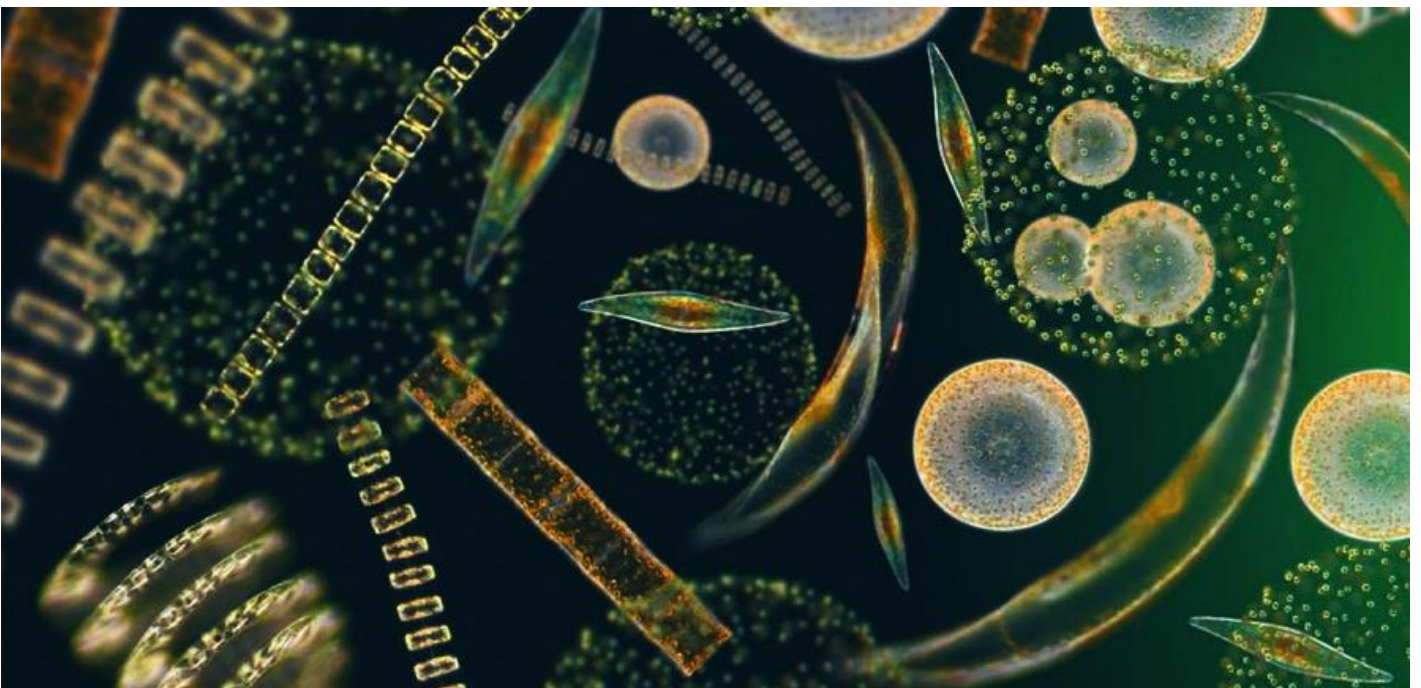


ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ & ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗΣ

Διατμηματικό Π.Μ.Σ. Ωκεανογραφίας & Διαχείρισης Θαλασσίου
Περιβάλλοντος

*“ Απομόνωση και χαρακτηρισμός κατατεθειμένων στελεχών φυτοπλαγκτού
(Τράπεζα Μικροφυκών) από παράκτια θαλάσσια συστήματα της Ανατολικής
Μεσογείου ”*



ΕΙΡΗΝΗ ΓΡΑΤΣΙΑ
Μεταπτυχιακή Διατριβή
ΑΘΗΝΑ 2017

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ & ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗΣ

**Διατμηματικό Π.Μ.Σ. Ωκεανογραφίας & Διαχείρισης Θαλασσίου
Περιβάλλοντος**

*“ Απομόνωση και χαρακτηρισμός κατατεθειμένων στελεχών
φυτοπλαγκτού (Τράπεζα Μικροφυκών) από παράκτια θαλάσσια
συστήματα της Ανατολικής Μεσογείου”*

Επιβλέπουσα: Ομότιμη Καθηγήτρια Οικονόμου-Αμίλλη Αθηνά

ΕΙΡΗΝΗ ΓΡΑΤΣΙΑ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

ΑΘΗΝΑ 2017

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Α. Οικονόμου-Αμίλλη, Ομότιμη Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)
2. Α. Παρμακέλης, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ
3. Ε. Φουντουλάκη, Ερευνήτρια Β' στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο Π.Μ.Σ Ωκεανογραφίας & Διαχείρισης Θαλασσίου Περιβάλλοντος, θέλω να ευχαριστήσω όσους συνετέλεσαν στην επιτυχή ολοκλήρωσή τους.

Θα ήθελα και από τη θέση αυτή να ευχαριστήσω την Ομότιμη Καθηγήτρια κ. Οικονόμου-Αμίλλη Αθηνά που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο “Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Φυκολογίας” του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής σε θέματα της ειδικότητάς της. Στη συνέχεια, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον κ. Τζοβενή Ιωάννη, ερευνητικό συνεργάτη της κ. Οικονόμου-Αμίλλη, για τη διαμόρφωση του θέματος και την καθοδήγησή του σε κάθε στάδιο της εργασίας αυτής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Παρμακέλη Αριστείδη, ο οποίος διέθεσε το “Εργαστήριο Μοριακής Οικολογίας” στον Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής και παρακολούθησε το μοριακό τμήμα της εργασίας. Επιπροσθέτως, ευχαριστώ και την Δρ. Φουντουλάκη Ελένη, Ερευνήτρια Β’ του ΕΛΚΕΘΕ, η οποία μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ στο Ινστιτούτο Ιχθυοκαλλιεργειών στον Άγιο Κοσμά στην Αττική, στο εργαστήριο Διατροφής & Παθολογίας Υδρόβιων Οργανισμών, καθώς και την Αντιγόνη Βασιλάκη για την πολύτιμη βοήθειά της. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. κ. Γιαννούτσου Ελένη, ΕΔΙΠ του Τομέα Βοτανικής του Τμήματος Βιολογίας που διέθεσε το μικροσκόπιο αντίθεσης διαφορικής συμβολής (Nomarski), καθώς και την Δρ. κ. Πηνελόπη Σωτηρίου για τη βοήθειά της.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τη λύπη μου που ο εκλιπών Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Βιολογίας Δανιήλ Δανηλίδης δεν είναι δυνατόν να παρακολουθήσει την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Τον ευχαριστώ για τη στήριξή του κατά τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Ιδιαίτερες θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην Υποψήφια Διδάκτορα Χατζηστρούντσιου Ξανθή, η οποία με την πολύχρονη εμπειρία της στο αντικείμενο φρόντισε να ενσωματωθώ γρήγορα στο εργαστήριο. Να τονίσω ακόμη, ότι η εργασία αυτή δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την παρουσία και τη στήριξη των συναδέλφων μου στο Μεταπτυχιακό Ωκεανογραφίας, Ελένης Ευρυγένη και Αλέξανδρου Ντζουβάρα, οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου σε όλες τις φάσεις της διατριβής, υπέρ του δέοντος. Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον προπτυχιακό φοιτητή Μανώλη Μεραμβελιωτάκη, για το χρόνο που διέθεσε ώστε να ολοκληρωθεί ένα σημαντικό κομμάτι της εργασίας.

Κυρίως όμως, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την αγάπη και κατανόηση που έδειξαν και μετά το πέρας των βασικών μου σπουδών. Τελευταίους και μη εξαιρετέους, ευγνωμονώ τους συμφοιτητές μου από το ΜΔΕ για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε, την παιδική μου φίλη Σοφία Ζυγούμη για την πολυετή στήριξή της, καθώς και τις Μαργαρίτα Θωμοπούλου, Νατάσσα Κανάλη, Μυρτώ Μίχου και Φωτεινή Μπαρτζώκα, οι οποίες, αν και δεν συνεχίσαμε σε κοινούς ερευνητικούς δρόμους, ήταν σε όλη τη διάρκεια δίπλα μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα πράσινα φυτά (green plants/Viridiplantae) είναι από τις πιο κυρίαρχες ομάδες πρωτογενών παραγωγών στη Γη. Περιλαμβάνουν τα «πράσινα» φύκη, καθώς και τα εμβρυόφυτα, κοινώς γνωστά ως τα φυτά της ξηράς. Τα «πράσινα» φύκη παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία και είναι ευρέως διαδεδομένα σε υδάτινα και επίγεια περιβάλλοντα, έχουν μάλιστα διαδραματίσει έναν κρίσιμο ρόλο στο παγκόσμιο οικοσύστημα για εκατοντάδες εκατομμυρίων έτη (Falkowski *et al.* 2004, O’Kelly 2007, Leliaert *et al.* 2011). Αντιθέτως, τα φυτά της ξηράς είναι βασικά δομικά βιολογικά συστατικά των γήινων οικοσυστημάτων (Lewis & Mc Court 2004, O’Kelly 2007).

Τα μικροφύκη είναι (1) ιδιαιτέρως ποικιλόμορφα, (2) συχνά αυτότροφα και (3) αρκετά ανεξερεύνητα. Ακόμη, φέρουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά στη φυσιολογία τους, που τα καθιστούν πολύ χρήσιμα στη φαρμακοβιομηχανία, στην ανθρώπινη διατροφή, στις υδατοκαλλιέργειες κλπ. Η ταξινομική, βιοχημική και μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών αυτών είναι απαραίτητη, καθώς αποτελεί το πρώτο βήμα στη βέλτιστη χρήση τους τόσο για επιστημονικούς όσο και βιομηχανικούς σκοπούς.

Στην παρουσιαζόμενη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η απομόνωση, η καλλιέργεια, και ο βιοχημικός και μοριακός προσδιορισμός έντεκα (11) στελεχών μικροφυκών, τα οποία προέρχονται από παράκτια συστήματα της Ανατολικής Μεσόγειου και είναι κατατεθειμένα στην Τράπεζα Μικροφυκών του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ. Τα στελέχη που αναπτύσσονται στην Τράπεζα αυτή δυνητικά αποτελούν βάση για πιθανή αξιοποίησή τους σε υδατοκαλλιέργειες, στη βιομηχανία ή στην παραγωγή βιοκαυσίμων. Τα αποτελέσματα της εν λόγω διπλωματικής εργασίας, έδωσαν τη δυνατότητα να ταξινομηθεί σε επίπεδο γένους η πλειονότητα των επιλεγέντων στελεχών. Συγκεκριμένα, οκτώ (8) από τα στελέχη εντάχθηκαν ταξινομικά στο γένος *Tetraselmis*. στην οικογένεια Chlorodendrophyceae, ενώ τα υπόλοιπα τρία (3) στην οικογένεια Trebouxiophyceae, και ειδικότερα στα γένη *Picochlorum*, ή *Nannochloris*. Επιπλέον με την ανάλυση του βιοχημικού προφίλ των λιπαρών οξέων και των χρωστικών, ολοκληρώθηκε ο χαρακτηρισμός των στελεχών, ώστε αυτά δύνανται στο μέλλον να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω επιστημονικούς και εμπορικούς σκοπούς.

Τέλος, η εργασία αυτή ανοίγει νέες προοπτικές για τη συστηματική και οικολογική μελέτη των μικροφυκών και συγκεκριμένα, υποδεικνύει την ανάγκη για την αναβάθμιση των κλειδών που χρησιμοποιούνται για τη μορφολογική παρατήρησή τους, για την αναζήτηση περισσότερων και κατάλληλων γονιδίων για τη μοριακή φυλογενετική μελέτη τους, αλλά και την περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών που επηρεάζουν τη διαφοροποίηση και την εξέλιξη των οργανισμών αυτών, στα περιβάλλοντα όπου επιβιώνουν.

ABSTRACT

The subkingdom of green plants (Viridiplantae) is one of the most dominant groups of primary producers on Earth. They include "green" algae, as well as embryophytes, commonly known as land plants. "Green" algae are highly diverse and widespread in aquatic and terrestrial environments and played a crucial role in the world ecosystem for hundreds of millions of years (Falkowski *et al.* 2004, O'Kelly 2007, Leliaert *et al.* 2011). On the contrary, land plants are essentially structural biological components of earth ecosystems (Lewis & McCourt 2004, O'Kelly 2007).

Microalgae are (1) particularly variable, (2) often autotrophic and (3) quite unexplored. They also have particular characteristics in their physiology, making them very useful in the pharmaceutical industry, human nutrition, aquaculture, etc. The taxonomic, biochemical and molecular identification of these strains is essential, as it is the first step in their optimal use for both scientific as well as industrial purposes.

In the presented diploma thesis the isolation, cultivation, and biochemical and molecular determination of eleven (11) microalgae strains were carried out, which originate from coastal systems of the Eastern Mediterranean, and were deposited at the Microalgae Bank of the Department of Ecology and Taxonomy (Faculty of Biology, NKUA). The strains deployed in this Bank are potentially the basis for their potential exploitation in aquaculture, industry or biofuel production. The results of this diploma thesis have made it possible to rank at the level of the majority of the selected strains. Specifically, eight (8) of the strains were taxonomically included in the genus *Tetraselmis* in the family Chlorodendrophyceae, while the remaining three (3) in the Trebouxiophyceae family, and in particular in the genera *Picochlorum*, or *Nannochloris*. In addition, with the analysis of the biochemical profile of fatty acids and pigments, the characterization of the strains has been completed so that these can be used in the future for further scientific and commercial purposes.

Finally, this work opens up new perspectives for the systematic and ecological study of microalgae and indicates the need for upgrading the keys used for their morphological observation. Moreover, the search for more appropriate genes for a molecular phylogenetic study is necessary and for further exploring the mechanisms that affect the differentiation and evolution of these organisms in whatever environment they survive.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

ARA	Arachidonic acid/Αραχιδονικό οξύ
DHA	Docosahexaenoic acid/Δοκοεξανοικό οξύ
FA	Fatty acids/Λιπαρά οξέα
EPA	Eicosapentaenoic acid/Εικοσαπεντανοικό οξύ
MUFA	Monounsaturated fatty acids/Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
NL	Neutral lipids/Ουδέτερα λιπίδια
PUFA	Polyunsaturated fatty acids/Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
SAFA	Saturated fatty acids/Κορεσμένα λιπαρά οξέα
TAG	Triacylglycerol/Τριακυλογλυκερόλη
TFA	Total fatty acids/Συνολικά λιπαρά οξέα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	- 1 -
1.1 Γενικά για τα φύκη	- 1 -
1.2 Μεσόγειος Θάλασσα	- 2 -
1.3 Συστηματική μελέτη των μικροφυκών	- 3 -
1.3.1 Ενδοσυμβίωση & Προέλευση	- 3 -
1.3.2 Τρέχουσα ταξινομική θέση των ‘Πράσινων’ φυκών.....	- 6 -
1.3.3 Χρήση μοριακών δεικτών στη συστηματική των φυκών.....	- 9 -
1.4 Βιοχημικά χαρακτηριστικά των μικροφυκών	- 11 -
1.4.1 Λιπιδικό περιεχόμενο στα μικροφύκη.....	- 11 -
1.4.2 Φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες.....	- 12 -
1.5 Περιγραφή των Κλάσεων & των Γενών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία	- 13 -
Κλάση Chlorodendrophyceae.....	- 13 -
Κλάση Trebouxiophyceae	- 16 -
1.6 Εμπορική & ερευνητική χρήση.....	- 18 -
1.6.1 Τράπεζες μικροφυκών	- 18 -
1.6.2 Βιομηχανικές χρήσεις των μικροφυκών.....	- 19 -
1.7 Σκοπός της εργασίας	- 23 -
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 25 -
2.1 Περιοχές δειγματοληψίας.....	- 25 -
2.2 Καλλιέργεια & απομόνωση στελεχών	- 26 -
2.2.1 Απομόνωση στελεχών φυτοπλαγκτού.....	- 27 -
2.2.2 Καλλιέργεια & συντήρηση των απομονωθέντων στελεχών	- 28 -
2.3. Κλασική ταξινομική.....	- 30 -
2.3.1 Φωτονική μικροσκοπία	- 30 -
2.3.2 Κλείδες	- 31 -
2.4. Μοριακές αναλύσεις	- 31 -
2.4.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA.....	- 31 -
2.4.2 Απλή Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	- 32 -
2.4.3 Ανάλυση και απεικόνιση δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA)	- 33 -
2.4.4 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης.....	- 35 -
2.4.5 Βάσεις Δεδομένων.....	- 36 -
2.4.6 Προγράμματα ανάλυσης αλληλουχιών & φυλογενετικών δέντρων.....	- 36 -
2.5 Βιοχημικές αναλύσεις	- 36 -

2.5.1 Ανάλυση χρωστικών.....	- 36 -
2.5.2 Μελέτη λιπιδικού προφίλ	- 37 -
2.5.4 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (TLC) με χρήση πλακιδίων σιλκόνης.....	- 38 -
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	- 40 -
3.1 Μορφολογική ανάλυση.....	- 40 -
3.1.1 Στελέχη με μαστίγια	- 40 -
3.1.2 Κοκκοειδή στελέχη.....	- 48 -
3.2 Μοριακές αναλύσεις	- 52 -
3.2.1 Εξαγωγή συνολικού γονιδιακού DNA	- 52 -
3.2.2 Ενίσχυση γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	- 53 -
3.2.3 Καθαρισμός προϊόντων PCR προς αλληλούχιση	- 55 -
3.2.4 <i>In silico</i> ανάλυση αποτελεσμάτων.....	- 56 -
3.5 Βιοχημικές αναλύσεις	- 61 -
3.5.1 Ανάλυση λιπαρών οξέων.....	- 61 -
3.5.2 Ανάλυση χρωστικών ουσιών	- 63 -
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	- 64 -
4.1 Μορφολογική ταξινόμηση των απομονωθέντων στελεχών.....	- 64 -
4.2 Μοριακή ταξινόμηση των απομονωμένων στελεχών	- 64 -
4.3 Ταξινομική με βάση το βιοχημικό προφίλ των στελεχών.....	- 66 -
4.4 Δυνητικές χρήσεις των υπό μελέτη στελεχών.....	- 67 -
4.5 Προβλήματα στη μελέτη των μικροφυκών	- 68 -
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	- 71 -
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	- 73 -
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	- 82 -
Π.1.: Αναλυτικός κατάλογος με το σύνολο των αρχικών μικτών καλλιεργειών.....	- 82 -
Π.2.: Λίστες κατατεθειμένων αλληλουχιών στελεχών της Genbank.....	- 83 -

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά για τα φύκη

Ορισμός των φυκών & περιβάλλοντα διαβίωσης

Τα φύκη (ενικός: το φύκος, alga, πληθυντικός: τα φύκη, algae) ορίζονται ως οι υδρόβιοι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί οι οποίοι δεν έχουν βλαστούς, μίσχους, φύλλα, ρίζες και δεν σχηματίζουν σπέρματα, άνθη ή καρπούς, όπως τα ανώτερα φυτά (Raven *et al.* 1986).

Σύμφωνα με τον Lee (1989), οποιοσδήποτε οργανισμός με χλωροφύλλη-α και θαλλό μη διαφοροποιημένο σε ρίζες, φύλλα και βλαστό, θεωρείται φύκος. Ως “φύκη” νοείται μια ετερογενής συνάθροιση οργανισμών με τα παραπάνω χαρακτηριστικά, οι οποίοι κυμαίνονται σε μέγεθος από μικροσκοπικά μονήρη κύτταρα έως τα γιγαντιαία θαλάσσια μακροφύκη και ανήκουν σε ποικίλες εξελικτικές σειρές. Κατά συνέπεια, τα φύκη καθορίζονται μεν βάσει των μορφολογικών και άλλων ταξινομικών γνωρισμάτων, ωστόσο σημαντική είναι η θεώρησή τους βάσει και οικολογικών γνωρισμάτων.

Τα φύκη είναι ως επί το πλείστον φωτοσυνθετικά είδη που παράγουν οξυγόνο και ζουν σε υδατικά ενδιαιτήματα. Επιπροσθέτως, τα φύκη δεν διαθέτουν τα σωματικά και αναπαραγωγικά γνωρίσματα των φυτών της ξηράς που αντιπροσωπεύουν προσαρμογές στον χερσαίο τρόπο ζωής. Αυτή η έννοια του φύκους περιλαμβάνει τόσο τα φωτοσυνθετικά πρώτιστα, τα οποία είναι ευκαρυωτικά, όσο και τα προκαρυωτικά κυανοβακτήρια, επίσης γνωστά ως κυανοπράσινα φύκη. Επομένως τα κυανοβακτήρια συμπεριλαμβάνονται επίσης σε αυτόν τον ορισμό, παρά την προκαρυωτική τους οργάνωση.

Αρκετά σαφή γνωρίσματα χαρακτηρίζουν τα φύκη-ευκαρυώτες, ενώ τα φύκη-προκαρυώτες στερούνται τέτοιων γνωρισμάτων. Μολονότι ορισμένοι άλλοι προκαρυώτες που δεν ανήκουν στα κυανοβακτήρια είναι επίσης φωτοσυνθετικοί, αυτοί δεν παράγουν οξυγόνο (σε αντίθεση με τα κυανοβακτήρια, τα φωτοσυνθετικά πρώτιστα, καθώς και τα φυτά της ξηράς). Ως εκ τούτου, στην εφαρμοσμένη φυκολογία ο όρος μικροφύκη (microalgae) αναφέρεται με την αυστηρή έννοια στα μικροσκοπικά μονήρη φύκη και στα φωτοσυνθετικά βακτήρια (κυανοβακτήρια) που παράγουν οξυγόνο (Graham *et al.* 2009).

Ο όρος μικροφύκη (microalgae) αναφέρεται τόσο στα κυανοβακτήρια όσο και στα μικρών-διαστάσεων (και ποικίλης ταξινομικής διαφοροποίησης) λοιπά φύκη, τα οποία απαντώνται σε ποικίλους υδροβιοτόπους παγκοσμίως (κυρίως κατανεμημένα στις υδατικές μάζες, αλλά και στην επιφάνεια όλων των τύπων εδαφών, σε βράχους, πέτρες, ξύλα, ακόμα και σε ψυχρές ερημικές περιοχές). Παρά το γεγονός ότι τα πλείστα ζουν «ελευθέρως», ένας συγκεκριμένος αριθμός μικροφυκών ζει σε συμβιωτική σχέση με ποικιλία άλλων οργανισμών. Για παράδειγμα, πολλά φύκη

ζουν επιφυτικά σε άλλα φυτά ή επιζωικά στην επιφάνεια ζώων, ενώ άλλα επιβιώνουν ως ενδοφυτικά (τα μεν πρώτα προσκολλώνται και αναπτύσσονται χωρίς να παρασιτούν, ενώ τα δεύτερα απαντώνται εντός των ιστών).

1.2 Μεσόγειος Θάλασσα

Συνθήκες & χαρακτηριστικά της Ανατολικής Μεσογείου

Η Μεσόγειος Θάλασσα έχει βάθος -κατά μέσο όρο- 1500m, ενώ το βαθύτερο σημείο της εντοπίζεται έξω από το Ιόνιο Πέλαγος, σε βάθος 5267m. Τα οικοσυστήματα της Μεσογείου είναι από τα πλέον πλούσια του πλανήτη, τουλάχιστον σε αριθμό ειδών. Η επιφάνεια της Μεσογείου αντιστοιχεί σε μόλις 0,8% της συνολικής επιφάνειας και στο 0,32% του όγκου όλων των ωκεανών. Εν τούτοις, φιλοξενεί μεγάλη ποικιλία οργανισμών, με περισσότερα από 12.000 είδη φυτών και ζώων.

Η Μεσόγειος θάλασσα αποτελεί ένα περιβάλλον που είναι ιδιαίτερος ενδιαφέρον για οικολογικές έρευνες καθώς παρέχει ένα εύρος τροφικών συνθηκών, περιλαμβάνοντας ακραία ολιγοτροφία ιδίως το καλοκαίρι όταν η υδάτινη στήλη είναι πολύ στρωματοποιημένη (Berman *et al.* 1985). Ενώ το N:P είναι κοντά στην αναλογία Redfield (16:1) στους περισσότερους ωκεανούς, τα νερά ύδατα της Μεσογείου έχουν μεγαλύτερη αναλογία N:P, ειδικά στην ανατολική λεκάνη γεγονός που οδηγεί σε έντονη έλλειψη αζώτου (Moutin & Raimbault 2002).

Ένα σύμπλεγμα κυκλοφορίας θερμότητας και αλατότητας μαζί με τοπικά υδροδυναμικά χαρακτηριστικά, επίσης συμβάλλει στην εγκαθίδρυση πολλών διαφορετικών ωκεάνιων περιοχών καθ' όλη την έκταση της Μεσογείου (Manca *et al.* 2004). Για παράδειγμα, η ανταλλαγή υδάτινων μαζών του Ατλαντικού και της Μεσογείου στο στενό του Γιβραλτάρ επάγει έντονες διαφοροποιήσεις στην αλατότητα και θερμοκρασία (Gascard & Richez 1985).

Συγκεκριμένα, η ανατολική Μεσόγειος είναι μία σχετικώς μικρή λεκάνη, που επιτρέπει μια συνοπτική ανάλυση της μεταβλητότητας σε διαφορετικά χωρικά επίπεδα και περιλαμβάνει υδροδυναμικές διαδικασίες που είναι αρκετά όμοιες με αυτές που παρατηρούνται στον ανοιχτό ωκεανό (Vidussi *et al.* 2001). Επομένως, αυτή η λεκάνη μπορεί να εξυπηρετήσει ως μία ενδιαφέρουσα περίπτωση μελέτης (Malanotte-Rizzoli *et al.* 1996) ως προς την επίδραση των παραγόντων στη σύσταση των φυτοπλαγκτικών κοινωνιών. Επιπροσθέτως, εφ' όσον η εύρωτη ζώνη της ανατολής Μεσογείου παρουσιάζει έλλειψη σε θρεπτικά κατά τη μεγαλύτερη διάρκεια του έτους, η λεκάνη αυτή θεωρείται η περισσότερο ολιγοτροφική περιοχή σε σύγκριση με τους περισσότερους ωκεανούς του κόσμου (Vidussi *et al.* 2001).

Είναι γνωστόν ότι οι φυσικές διαδικασίες επηρεάζουν τη δομή των πλαγκτικών κοινωνιών (Vidussi *et al.* 2001). Οι κινήσεις του νερού, όπως δίνες και ρεύματα, δύνανται να προκαλέσουν κάθετη ανάδευση, η οποία μπορεί να ενισχύσει τη μεταφορά θρεπτικών από βαθύτερες υδάτινες μάζες στα επιφανειακά στρώματα (Legendre & Demers 1984). Αυτή η διαθεσιμότητα νέων θρεπτικών ενισχύει τη βιομάζα του φυτοπλαγκτού και την παραγωγή του. Τα εξωγενή νιτρικά κατά κανόνα χρησιμοποιούνται για το μεγαλύτερο φυτοπλαγκτόν (microphytoplankton), ενώ οι αναγεννημένες μορφές του αζώτου (αμμώνιο και ουρία) είναι η πιθανή πηγή για το μικρότερου μεγέθους φυτοπλαγκτόν (picophytoplankton και nanophytoplankton) (Vidussi *et al.* 2001).

1.3 Συστηματική μελέτη των μικροφυκών

1.3.1 Ενδοσυμβίωση & Προέλευση

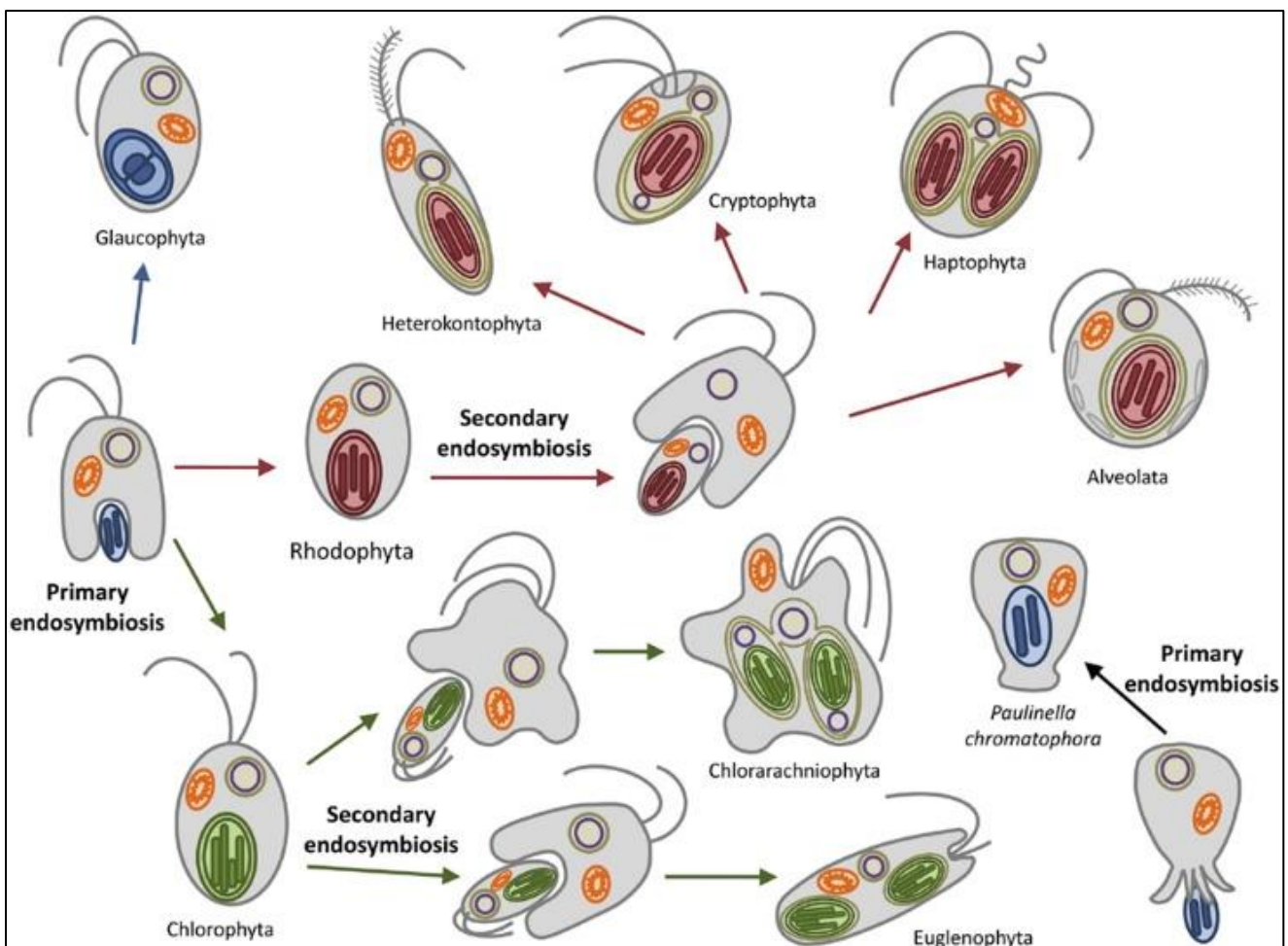
Κατά τη διάρκεια της ιστορίας της Γης, η εμφάνιση και η εξαφάνιση οργανισμών που είναι προσαρμοσμένοι στο εκάστοτε περιβάλλον έχει επαναληφθεί συχνά, και μερικές φορές αυτοί οι οργανισμοί έχουν μεταβάλει σημαντικά τη διαμόρφωσή του (Kopp *et al.* 2005, Scott *et al.* 2008). Το καλύτερο παράδειγμα είναι αυτό της οξυγόνωσης του ωκεανού και της ατμόσφαιρας που ξεκίνησε πριν 3.500 εκατομμύρια χρόνια με τη συμβολή των φωτοσυνθετικών κυανοβακτηρίων (Yoon *et al.* 2004).

Η προέλευση των Πράσινων φυτών ξεκινά με ένα πρώτο γεγονός ενδοσυμβίωσης, κατά το οποίο ένα ετερότροφο ευκαρυωτικό κύτταρο-ξενιστής απορρόφησε με φαγοκύτωση ένα φωτοσυνθετικό κυανοβακτήριο (Margulis 1974) πιθανώς πριν από 1,500–1,600 εκατομμύρια χρόνια (Hedges *et al.* 2004, Yoon *et al.* 2004). Το κυανοβακτήριο αυτό σταδιακά ενσωματώθηκε και τελικά εξελίχθηκε σε ένα μεμβρανικό οργανίδιο, το πλαστίδιο. Αυτό το πρώιμο γεγονός ενδοσυμβίωσης αποτελεί ορόσημο για την προέλευση των πρώιμων φωτοσυνθετικών ευκαρυωτών και έδωσε το έναυσμα για τη γένεση τριών αυτότροφων γενεαλογικών σειρών με πρώιμα πλαστίδια: τα πράσινα φυτά, τα ερυθρά φύκη (ροδοφύκη) και τα γλαυκόφυτα (Leliaert *et al.* 2011) [Εικόνα 1.1].

Από αυτό το σημείο έναρξης, η φωτοσύνθεση εξαπλώθηκε ευρέως μεταξύ διαφορετικών ευκαρυωτικών Πρωτίστων μέσω δευτερογενών και τριτογενών γεγονότων ενδοσυμβίωσης, τα οποία περιελάμβαναν εγκόλπωση είτε πράσινων είτε ερυθρών φυκών από μη-φωτοσυνθετικά Πρωτίστα (McFadden 2001). Η μεταγενέστερη διαφοροποίηση των πρώιμων πλαστιδίων-που-περιείχαν-ευκαρυώτες αποτέλεσε την έναρξη της πράσινης γενεαλογικής σειράς (green lineage) (Archibald 2009, Keeling 2010), όπως και της ερυθράς γενεαλογικής σειράς (red lineage) (Falkowski *et al.* 2004) [Εικόνα 1.1]. Αυτές οι δύο σειρές αποκλίνουν πριν από περίπου 1,100 εκατομμύρια χρόνια, σύμφωνα

με υπολογισμούς μοριακών ρολογιών (Yoon *et al.* 2004), οριοθετώντας την αρχή της διαφοροποίησης των φυκών στον ωκεανό.

Τα δευτερεύοντα γεγονότα ενδοσυμβίωσης που περιελάμβαναν πράσινα φύκη ως αυτότροφο συμμετέχοντα έδωσε το έναυσμα στη δημιουργία τριών ομάδων φυκών: τα χλωραραχνιόφυτα (chlorarachniophytes), τα φωτοσυνθετικά ευγληνοειδή (euglenids) και τα 'πράσινα' δινομαστιγωτά (dinoflagellates). Οι υπόλοιπες ευκαρυωτικές ομάδες φυκών, δηλ. τα κρυπτόφυτα (cryptophytes), απτόφυτα (haptophytes), τα φωτοσυνθετικά σταχομαστιγωτά (stramenopiles) (π.χ. διάτομα/diatoms, χρυσοφύκη/chrysophytes και φαιοφύκη) και δινομαστιγωτά, απέκτησαν πλαστίδια από ένα προγονικό ερυθρό φύκος, είτε από ένα ή περισσότερα γεγονότα ενδοσυμβίωσης (Archibald 2009, Bodyl *et al.* 2009, Baurain *et al.* 2010) [Εικόνα 1.1].

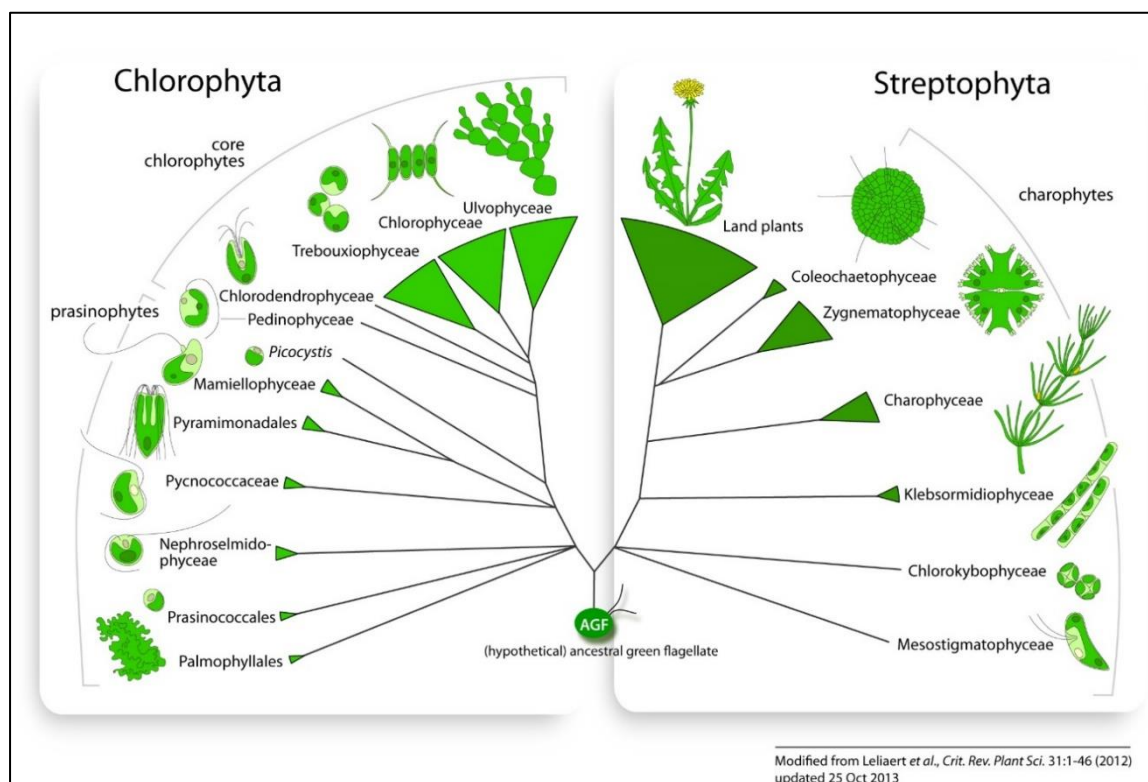


Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση της πρωτογενούς και της δευτερογενούς ενδοσυμβίωσης [Πηγή: <https://theendosymbiotichypothesis.wordpress.com/>]

Ένας αριθμός θεμελιωδών διαφορών υπάρχει μεταξύ των μελών των δύο αυτών σειρών συγκεκριμένα στο περιεχόμενο των χρωστικών και στη σύνθεση των πλαστιδιακών γονιδίων (Leliaert *et al.* 2012). Τα πράσινα φύκη περιέχουν χλωροφύλλη b ως την κύρια επικουρική χρωστική, ενώ τα φύκη της

ερυθράς σειράς έχουν κυρίως χλωροφύλλη c (ο χλωροπλάστης τους εξελίχθηκε από ένα Ροδόφυτο μετά από δευτερογενή ενδοσυμβίωση), γεγονός που επηρεάζει την απορροφητικότητα τους σε φως και τελικά την εξάπλωσή τους σε υδάτινα περιβάλλοντα (Leliaert *et al.* 2012). Φύκη από την ερυθρά σειρά συνήθως προέρχονται από δευτερογενή ή τριτογενή ενδοσυμβίωση και έχουν έναν χλωροπλάστη που περιβάλλεται από τρεις ή τέσσερις μεμβράνες, ενώ φύκη από την πράσινη γενεά προέρχονται συνήθως από πρώιμη ενδοσυμβίωση και έχουν έναν χλωροπλάστη που περιβάλλεται από δύο μόνο μεμβράνες.

Μία πρόωρη διάσπαση στην εξέλιξη των πράσινων φυτών [Εικόνα 1.2], οδήγησε στις δύο θεμελιώδεις γενεαλογικές σειρές, οι οποίες μεταγενέστερα ακολούθησαν ριζικά διαφορετικές εξελικτικές τροχιές (Lemieux *et al.* 2007, Leliaert *et al.* 2011). Η μία γενεά είναι το φύλο Chlorophyta, η οποία διαφοροποιήθηκε ως πλαγκτόν στους ωκεανούς και οδήγησε στα σύγχρονα πρασινόφυτα (prasinophytes) και στα ‘βασικά’ χλωρόφυτα (core chlorophytes) που εποίκισαν τα παράκτια και ωκεάνια υδάτινα οικοσυστήματα. Η δεύτερη γενεά είναι το φύλο Streptophyta, με αντιπροσώπους που εξελίχθηκαν σε περιβάλλοντα γλυκού νερού και γήινα ενδιαιτήματα και εποίκισαν την ξηρά πριν από



Εικόνα 1.2: Απεικόνιση της διάσπασης στις δύο θεμελιώδεις γενεαλογικές σειρές των Πράσινων φυτών [Πηγή: Leliaert *et al.*, 2012]

476–432 εκ. χρόνια, δίνοντας γένεση στα σημερινά φυτά της ξηράς. Τα πράσινα μικροφύκη αποτελούν τη βάση της πράσινης γενεαλογικής σειράς (Nakayama *et al.* 1998), οδηγώντας στην υπόθεση ότι ο κοινός πρόγονος των πράσινων φυκών και των φυτών ξηράς θα μπορούσε να είναι ένα

αρχέγονο πράσινο μαστιγωτό, πολύ στενής συγγένειας με τα Chlorophyta (Leliaert *et al.* 2012). Τα πράσινα μικροφύκη αποτελούν τη βάση της πράσινης γενεαλογικής σειράς (Nakayama *et al.* 1998), οδηγώντας στην υπόθεση ότι ο κοινός πρόγονος των πράσινων φυκών και των φυτών ξηράς θα μπορούσε να είναι ένα αρχέγονο πράσινο μαστιγωτό, πολύ στενής συγγένειας με τα Chlorophyta (Leliaert *et al.* 2012).

Τα Πρασινοφύκη (prasinophytes) χαρακτηρίζονται από έναν αριθμό ξεχωριστών χαρακτηριστικών, πολλά εκ των οποίων είναι επίσης κοινά με τα φυτά της ξηράς (Graham *et al.* 2009). Οι χλωροπλάστες είναι έγκλειστοι από μία διπλή μεμβράνη με τα θυλακοειδή ομαδοποιημένα σε ελάσματα (lamellae) και περιέχουν χλωροφύλλη α και β μαζί με μια ομάδα συνοδευτικών χρωστικών, όπως καρωτίνη και ξανθοφύλλες. Τα πυρηνοειδή, όταν υπάρχουν, είναι ενσωματωμένα μέσα στον χλωροπλάστη και περιβάλλονται από άμυλο που είναι το κύριο απόθεμα πολυσακχαριτών. Τα περισσότερα ‘πράσινα’ φύκη έχουν συμπαγή κυτταρικά τοιχώματα με ένα περίβλημα ινών που απαρτίζεται κατά βάση από κυτταρίνη. Τα μαστιγωτά κύτταρα είναι ισόκοντα, δηλ. τα δύο μαστίγια είναι όμοια σε δομή, αν και ενδέχεται να διαφέρουν στο μήκος. Η περιοχή μεταξύ των μαστίγιων και του βασικού σώματος (basal body) (flagellar transition zone) χαρακτηρίζεται από αστεροειδή δομή (stellate structure), η οποία είναι ορατή σε τομή με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Η δομή αυτή έχει εννέα άκρα και συνδέει εννέα ζεύγη μικροσωληνίσκων (microtubules) (Melkonian 1984).

**Διάφορα ονόματα έχουν προταθεί για τη γενεαλογική σειρά που αποτελεί τα πράσινα φύκη και τα φυτά της ξηράς: “Viridiplantae” ή “Viridiaeplantae” (Cavalier-Smith, 1981, 1998), “Chlorobiota” ή “Chlorobionta” (Jeffrey, 1971, 1982), “Chloroplastida” (Adl *et al.* 2005), ή απλά “πράσινα φυτά” (Sluiman *et al.*, 1983) ή “green lineage”.*

1.3.2 Τρέχουσα ταξινόμική θέση των ‘Πράσινων’ φυκών

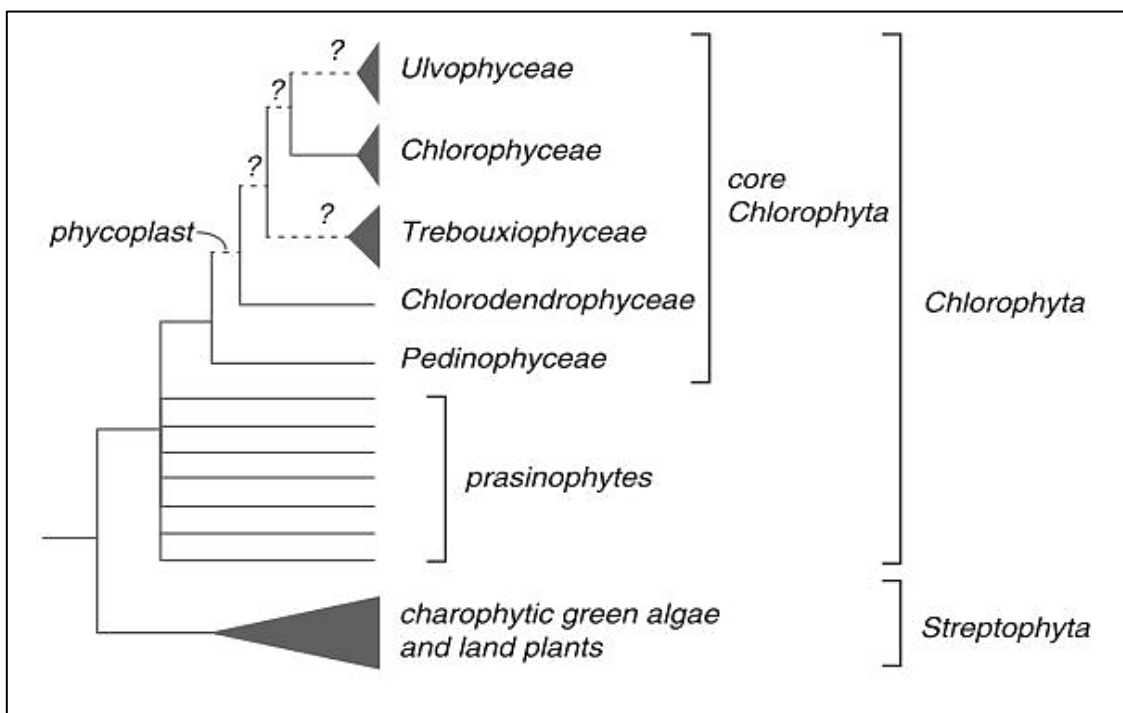
Η ανοικοδόμηση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ‘πράσινων φυκών’ και των φυτών ξηράς είναι αναγκαία για την αναγνώριση των ιδιαιτεροτήτων ως προς την ποικιλομορφία των πράσινων φυκών και των φυτών ξηράς. Η μοριακή φυλογενετική έχει μεταβάλει δραματικά τις απόψεις στις σχέσεις των ‘πράσινων φυκών’ και της εξέλιξης.

Ο αριθμός των γενεαλογικών σειρών των πρασινοφύτων (prasinophytes) έχει αυξηθεί λόγω της διαθεσιμότητας των νέων περιβαλλοντικών ακολουθιών. Οι φυλογενετικές σχέσεις στο φύλο Chlorophyta (στην ελληνική βιβλιογραφία αναφέρονται συνήθως ως ‘χλωροφύκη’ αποδίδοντας τον όρο chlorophytes, διαφοροποιώντας τον νεοεισαχθέντα όρο των prasinophytes ως ‘πρασινόφυτα’)

έχουν υπάρξει πολύ καιρό σε αμφιβολία, ιδιαιτέρως στα υψηλότερα ταξινομικά επίπεδα (τάξη, κλάση) (Fučíková *et al.* 2014c).

Το φύλο Chlorophyta ανήκει στο βασίλειο των φυτών (Plantae/Viridiplantae) και αποτελείται από ευκαρυώτες. Τα Chlorophyta αναθεωρήθηκαν από τους Mattox & Stewart (1975), οι οποίοι πρότειναν τη διαίρεση των Chlorophyta σε τέσσερις κύριες κλάσεις: τα Prasinophyceae, Charophyceae, Ulvophyceae και Chlorophyceae (Stewart & Mattox, 1978). Παρά το γεγονός ότι αυτή η άποψη μερικώς επιβεβαιώθηκε με μοριακές αναλύσεις (Charpman *et al.* 1998), ήταν γνωστό από την αρχή ότι τα πρασινόφυτα (prasinophytes) συνθέτουν μία πολυφυλετική συνάθροιση (φυλογενετικούς κλάδους χωρίς κοινό πρόγονο) (Christensen 1962).

Σήμερα, το όνομα κλάσης Prasinophyceae δε χρησιμοποιείται πλέον και έχει αντικατασταθεί από το γενικό όρο prasinophytes, ο οποίος εκούσια δεν έχει φυλογενετικό νόημα (Leliaert *et al.* 2012, Fučíková *et al.* 2014c, Tragin *et al.* 2016). Σύμφωνα με την τρέχουσα ταξινομική αντίληψη, το φύλο Chlorophyta απεικονίζεται συντιθέμενο από δύο βασικές ομάδες: τα prasinophytes και τα 'γνήσια' ("core") chlorophytes (Leliaert *et al.* 2012, Fučíková *et al.* 2014c, Tragin *et al.* 2016) [Εικόνα 1.3].



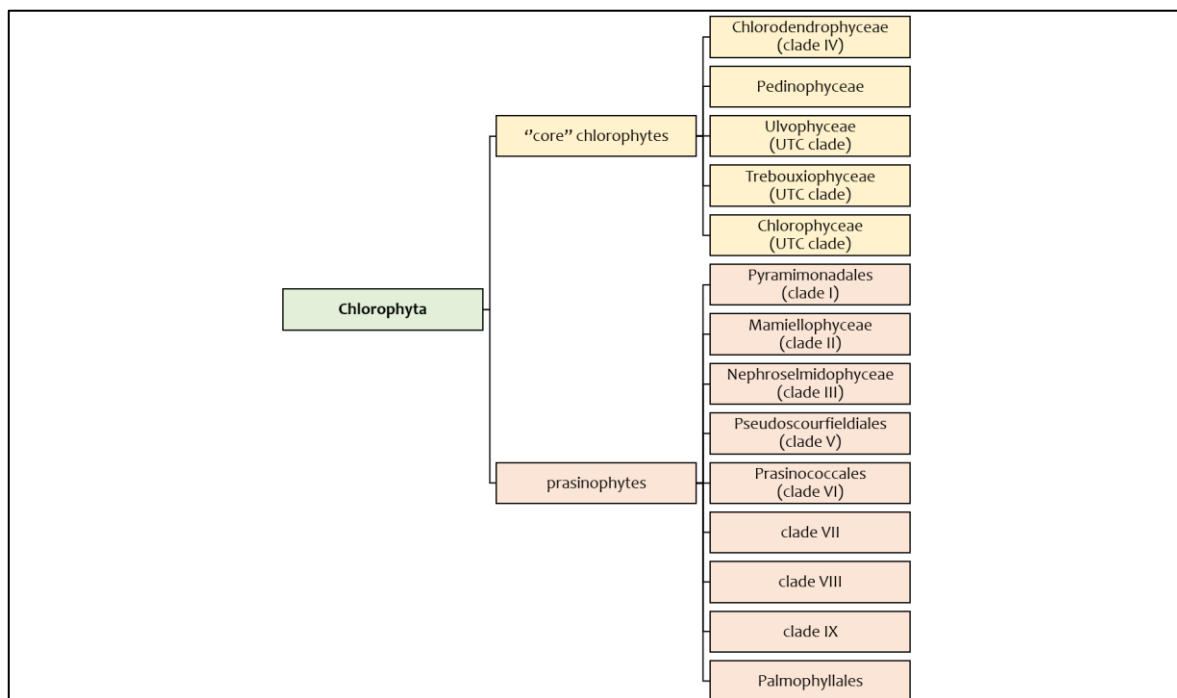
Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση της τρέχουσας ταξινομικής κατάταξης του φύλου Chlorophyta και των σχέσεων μεταξύ των κλάσεων [Πηγή: Fučíková *et al.* 2014c]

Τα prasinophytes επί του παρόντος, αποτελούνται από τουλάχιστον εννέα βασικές γενεαλογικές σειρές μικροφυκών [Εικόνα 1.4], οι οποίες δημιουργούν μία παραφυλετική ομάδα και ανταποκρίνονται σε διαφορετικά ταξινομικά επίπεδα (τάξη, κλάση, μη καθορισμένοι κλάδοι) (Marin & Melkonian 2010, Leliaert *et al.* 2011, Fučíková *et al.* 2014c), με τη μεγαλύτερη πιθανότητα να

ανέλθουν όλες στο επίπεδο της κλάσης στο μέλλον (Leliaert *et al.* 2012). Οι σειρές αυτές μοιράζονται κοινά αρχέγονα χαρακτηριστικά όπως μαστίγια και οργανικές φολίδες (organic scales).

Πρόγονοι των πρασινοφύτων (prasinophytes) έδωσαν γένεση σε ποικίλα από μορφολογική και οικολογική άποψη ‘τυπικά’ Chlorophyta, τα οποία περιλαμβάνουν τρεις βασικές κλάσεις, τα Ulvophyceae, Trebouxiophyceae και Chlorophyceae (UTC). Ο όρος “UTC clade,” πρόσφατα αντικαταστάθηκε με τον όρο ‘γνήσια (core) Chlorophyta’ με την προσθήκη δύο μικρότερων, πρώιμης-απόκλισης (early diverging) γενεαλογικών σειρών, τα Chlorodendrophyceae και τα Pedinophyceae (Fučíková *et al.* 2014c, Tragin *et al.* 2016). Ο κλάδος UTC μαζί με τα Chlorodendrophyceae χαρακτηρίζονται από έναν νέο τρόπο κυτταρικής διαίρεσης, με διαμεσολαβητή τον φυκοπλάστη [Εικόνα 1.3], ο οποίος απουσιάζει από τα πρασινόφυτα (prasinophytes) και τα Pedinophyceae και δευτερευόντως χάθηκε στα Ulvophyceae (Leliaert *et al.* 2012, Marin 2012).

Τα Πρασινόφυτα είναι δυνατόν να διαχωριστούν σε τρεις άτυπες ομάδες (Marin & Melkonian 2010). Η μία ομάδα περιλαμβάνει τρεις ‘τυπικές’ (basal) σειρές (Prasinococcales/clade VI, Pyramimonadales/clade I, Mamiellophyceae/clade II). Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τρεις ‘ενδιάμεσης (intermediate) απόκλισης’ σειρές (Pseudoscourfieldiales/clade V, clade VII, clade VIII, clade IX, Palmophyllales).



Εικόνα 1.4: Σύγχρονος διαχωρισμός του φύλου Chlorophyta

Nephroselmidophyceae/clade III) και μία τρίτη ομάδα περιέχει τις ‘ύστερης (‘late’) απόκλισης’ σειρές (Pedinophyceae και Chlorodendrophyceae/clade IV).

Κάποιες ομάδες αντιπροσωπεύονται κυρίως από ακολουθίες που έχουν ανακτηθεί από καλλιέργειες μικροφυκών [π.χ. στα Nephroselmidophyceae και στα ‘τυπικά’ χλωρόφυτα (‘core’ chlorophytes), ενώ

άλλες ομάδες είναι κατά βάση ή εξ ολοκλήρου μη καλλιεργημένες (περιβαλλοντικές ακολουθίες) (π.χ. Prasinophyte clade IX)]. Η γεωγραφική κατανομή των ειδών που λαμβάνεται από τις δύο περιπτώσεις είναι αρκετά διαφορετική (Tragin *et al.* 2016).

1.3.3 Χρήση μοριακών δεικτών στη συστηματική των φυκών

Η εισαγωγή μοριακών φυλογενετικών μεθόδων έθεσε ένα νέο πλαίσιο για την ανακατασκευή της εξελικτικής ιστορίας της πράσινης γενεαλογικής σειράς. Οι αναλύσεις ακολουθιών DNA ξεκίνησαν στα μέσα του 1980 με τις πρώτες φυλογενετικές αναλύσεις για τα πράσινα φυτά να προέρχονται από δεδομένα 5.8S nrDNA ακολουθιών (Hori *et al.* 1985, Hori & Osawa 1987). Έπειτα, ακολούθησαν οι αναλύσεις των 18S και 28S nrDNA ακολουθιών (Gunderson *et al.* 1987, Perasso *et al.* 1989, Buchheim *et al.* 1990, Zechman *et al.* 1990, Chapman *et al.* 1991, Mishler *et al.* 1992, Chapman *et al.* 1998).

Οι πρωταρχικές μοριακές μελέτες προηγούνται της μεθόδου PCR και κλωνοποίησης και αναφέρονται σε λίγα είδη (Leliaert *et al.* 2012). Η προοδευτικά πυκνότερη δειγματοληψία χλωροπλαστικών και μιτοχονδριακών ακολουθιών, συνδυαστικά με περισσότερο εκλεπτυσμένες αναλύσεις και τη χρήση της βιοπληροφορικής, έχουν βελτιώσει πλέον σε μεγάλο βαθμό την κατανόηση για την εξέλιξη των πράσινων φυτών τα τελευταία χρόνια (Fučíková *et al.* 2014c, Lemieux *et al.* 2014a, 2014b, Turmel *et al.* 2013, 2015).

Η δυσκολία έγκειται στο ότι φαίνεται να υπάρχουν αντιφατικά μηνύματα, όχι μόνο μεταξύ των συνόλων δεδομένων από διαφορετικά οργανικά διαμερίσματα (πυρήνας, μιτοχόνδριο, χλωροπλάστης), αλλά και μεταξύ μεμονωμένων γονιδίων από το ίδιο οργανίδιο (Fučíková *et al.* 2016).

1.3.3.1 Χρήση ριβοσωμικών γονιδίων

Η χρήση των ριβοσωμικών ακολουθιών για τη φυλογενετική ανάλυση έχει επιλεγεί επειδή κατέστη δυνατή η απόκτηση αρκετού RNA για αλληλούχιση τα πρώτα χρόνια και αργότερα επειδή οι περιοχές των γονιδίων ήταν αρκετά συντηρημένες ώστε να σχεδιαστούν καθολικοί εκκινητές (Leliaert *et al.* 2012). Το ριβοσωμικό RNA υπάρχει επίσης σε όλα τα ζωντανά κύτταρα και παρά το γεγονός ότι υφίσταται συνήθως σε πολλά αντίγραφα στο γονιδίωμα, η συντονισμένη εξέλιξη (concerted evolution) εξομαλύνει την ποικιλομορφία των αλληλουχιών και κατά συνέπεια θεωρείται ότι μειώνει την επικινδυνότητα υπαρξης παράλογων αλληλουχιών (Leliaert *et al.* 2012).

Αλληλουχίες DNA που κωδικοποιούν RNA της μικρής υπομονάδας των κυτοπλασματικών ριβοσωμάτων (SSU rDNA) (16S rDNA στους προκαρυωτικούς, και 18S rDNA στους ευκαρυωτικούς

οργανισμούς) είναι ιδιαίτερες χρήσιμες στην αξιολόγηση των σχέσεων συγγενείας μεταξύ των υψηλότερων ταξινομικών μονάδων, συμπεριλαμβανομένων των κλάσεων και αθροισμάτων των φυκών, όπως επίσης και σε μελέτες βιοποικιλότητας (Graham *et al.* 2009).

Το πυρηνικά κωδικοποιημένο 18S rDNA γονίδιο έχει υπάρξει μέχρι πρόσφατα η κύρια πηγή δεδομένων για την εξαγωγή φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των πράσινων φυκών (Proschold & Leliaert 2007), συμπληρωματικά με το 28S rDNA (π.χ. Buchheim *et al.* 2001, Shoup & Lewis 2003), την ακτίνη (An *et al.* 1999) και τα χλωροπλαστικά γονίδια *rbcL*, *tufA* και *atpB* (π.χ. Daugbjerg *et al.* 1994, Daugbjerg *et al.* 1995, Hayden & Waaland 2002, Nozaki *et al.* 2003, Zechman 2003, Rindi *et al.* 2007).

1.3.3.2 Χρήση χλωροπλαστικών γονιδίων

Τα δεδομένα από χλωροπλαστικές ακολουθίες χρησιμοποιούνται ευρέως για την εξαγωγή συμπερασμάτων αναφορικά με τη φυλογένεση των φυτών και των φυκών. Με την αυξανόμενη διαθεσιμότητα ολόκληρων χλωροπλαστικών γονιδιωμάτων, εγείρεται η ευκαιρία να επιλυθούν αρχαίες αποκλίσεις οι οποίες μέχρι τώρα ήταν προβληματικές. Από την άλλη πλευρά, η ακριβής ανάλυση μεγάλων σειρών δεδομένων ποικίλων γονιδίων μπορεί να είναι μεγάλη πρόκληση, καθώς είναι πιθανόν τα δεδομένα αυτά να αμφισβητηθούν με συστηματικές προκαταλήψεις και συγκρουόμενα σήματα (Fučíková *et al.* 2016).

Τα οργανδιακά γονιδιώματα στα Viridiplantae παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία ως προς τη δομή, το μέγεθος και το περιεχόμενο (Lemieux *et al.* 2014a, 2014b, Turmel *et al.* 2015). Μέχρι πρόσφατα, αυτή η ποικιλομορφία είχε καταγραφεί με τη χρήση μόνο ενός ή δύο αντιπροσώπων από κάθε κύρια γενεαλογική σειρά, με έντονη εξαίρεση τα εμβρύοφυτα. Τα τελευταία έτη περισσότερες ερευνητικές εργασίες ασχολούνται με τον χαρακτηρισμό και την ποικιλία χλωροπλαστικών (Lemieux *et al.* 2014a) και μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων (Fučíková *et al.* 2014a, Farwagi *et al.* 2015) με περισσότερα δείγματα ανά κλάση, τάξη και οικογένεια πράσινων φυκών.

Παρά τα πιθανά θέματα που ενδέχεται να προκύψουν, η χρήση χλωροπλαστικών γονιδίων για φυλογενετικές αναλύσεις, είναι αρκετά υποσχόμενη για την επίλυση των βαθύτερων σχέσεων μεταξύ των γενεαλογικών σειρών των πράσινων φυτών (Fučíková *et al.* 2016). Από άποψη χρησιμότητας, τα χλωροπλαστικά δεδομένα έχουν ένα διακριτό πλεονέκτημα έναντι των μιτοχονδριακών, κυρίως λόγω μεγαλύτερου και πιο συνεχούς αριθμού γονιδίων, αλλά και λόγω καλύτερων δεδομένων δειγματοληψίας (Fučíková *et al.* 2014a, Lemieux *et al.* 2014a, 2014b, Turmel *et al.* 2013).

Το *rbcL* γονίδιο της μικρής υπομονάδας της RuBisCO, έχει υπάρξει βασική πηγή δεδομένων για την εξαγωγή φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των πράσινων φυκών, ωστόσο δεν υπάρχουν ακόμη επαρκείς πληροφορίες στις βάσεις δεδομένων.

1.4 Βιοχημικά χαρακτηριστικά των μικροφυκών

Πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες, χρωστικές, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία συνθέτουν το βιοχημικό προφίλ των μικροφυκών. Μεταξύ αυτών, τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες αποτελούν τα βασικά συστατικά. Οι πρωτεΐνες (6–52%) των μικροφυκών είναι πλούσιες σε απαραίτητα αμινοξέα και η απόδοσή τους εξαρτάται από τον τρόπο καλλιέργειας και τη στέρηση θρεπτικών. Τα μικροφύκη είναι επίσης μια καλή πηγή υδατανθράκων, ειδικότερα στη μορφή αμύλου, κυτταρίνης και άλλων πολυσακχαριτών και η βιομάζα είναι εξόχως εξαρτώμενη από το είδος του οργανισμού, τις συνθήκες καλλιέργειας και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Ansari 2016).

1.4.1 Λιπιδικό περιεχόμενο στα μικροφύκη

Τα λίπη είναι κύριοι πρωτογενείς μεταβολίτες των μικροφυκών. Ανάλογα με την πολικότητά τους, τα λιπίδια των μικροφυκών ταξινομούνται γενικά σε πολικά (δομικά) και μη-πολικά ουδέτερα (αποθηκευτικά) λιπίδια. Τα πολικά διακρίνονται περαιτέρω σε φωσφολιπίδια και γλυκολιπίδια. Η λειτουργία των μη πολικών λιπιδίων, που υφίστανται κυρίως στη μορφή TAG, είναι η αποθήκευση ενέργειας.

Στα φυτά και στα μικροφύκη, η σύνθεση των λιπαρών οξέων (FAs) πραγματοποιείται στα πλαστίδια και η σύνθεση των TAG πραγματοποιείται είτε στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), είτε όπως πρόσφατα αναγνωρίστηκε, στους πλαστιδιακούς φακέλους (Liu & Benning 2013). Τα TAGs που συντίθενται *de novo*, εναποτίθενται σε ξεχωριστές σφαιρικές δομές που αποκαλούνται σταγόνες λιπιδίων (LDs) και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ή στην περίπτωση των *plastoglobuli* στο πλαστίδιο (Goold *et al.* 2015, Nojima *et al.* 2017). Τα οργανίδια αποθήκευσης λιπιδίων (γνωστά και ως *lipid bodies*, *oil bodies*, ή *oil globules*) είναι οργανίδια παρόντα σχεδόν σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Ding *et al.* 2013).

Πολλά μικροφύκη είναι ικανά να συσσωρεύουν μεγάλο ποσό λιπιδίων στα κύτταρά τους (Sheehan *et al.* 1998) ειδικά στη μορφή τριακυλογλυκερολών (TAG). Τα μικροφύκη έχουν ιδιαίτερη σταθερότητα στα λιπίδια σε σύγκριση με τα συμβατικά PUFAs, επειδή είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά

καρωτινοειδή και βιταμίνες και επειδή τα λιπίδια είναι ενσωματωμένα στο κυτταρικό τοίχωμα. Κατά μέσο όρο, τα λιπιδικά περιεχόμενα τυπικώς κυμαίνονται από 15 ως 60% του ξηρού βάρους, αναλόγως όμως με συγκεκριμένα είδη και τις συνθήκες καλλιέργειάς τους, η παραγωγή λιπιδίων εκτείνεται από 2 ως 75% (Mata *et al.* 2010). Σε ακραίες περιπτώσεις, μπορεί να φτάσει το 70%–90% του ξηρού βάρους (Chisti 2007, Yan & Schenk 2011), όπως στο πράσινο φύκος *Botryococcus braunii* που μπορεί να παράγει έλαιο έως το 86% του βάρους του (Brown *et al.* 1969). Το είδος αυτό προορίζεται για την παραγωγή ελαίου στο κοντινό μέλλον, όμως έχει το βασικό μειονέκτημα τον χαμηλό ρυθμό αναπαραγωγής και την ευκολία μόλυνσης στην καλλιέργεια. Ως εκ τούτου, οι λιπιδικές παραγωγικότητες μικροφυκών όπως τα *Nannochloropsis*, *Chlorella*, *Tetraselmis* και *Pavlova* είναι πιο υψηλές (Huerlimann *et al.* 2010).

Η παραγωγικότητα των λιπιδίων μπορεί να αυξηθεί δραματικά με εξωτερική εφαρμογή επιβαρυντικών παραγόντων και θεωρείται ως στρατηγική επιβίωσης για τα μικροφύκη σε δυσμενείς συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν τη στέρηση θρεπτικών, την έκθεση σε χημικά, τη διαφοροποίηση της αλατότητας, της θερμοκρασίας, του pH και/ή της ακτινοβολίας (Chisti 2009, Miao & Wu 2006, Rodolfi 2009). Υπό αυτές τις συνθήκες, τα μικροφύκη αλλάζουν το μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης λιπαρών, προς αποθήκευση των ουδέτερων λιπιδίων, με κυρίαρχη μορφή αυτή των TAGs.

1.4.2 Φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες

Ένας τρόπος αντιμετώπισης από τα φύκη της διακύμανσης του φωτεινού περιβάλλοντος επιτυγχάνεται με τη διαμόρφωση διαφόρων επικουρικών φωτοσυνθετικών χρωστικών ουσιών, οι οποίες έχουν διαφορετικές ιδιότητες απορρόφησης φωτός. Η παρουσία τέτοιων χρωστικών ερμηνεύει τις παραλλαγές χρωματισμού μεταξύ των φυκών. Οι επικουρικές χρωστικές ουσίες ή βοηθητικές χρωστικές ουσίες (accessory pigments) έχουν την ικανότητα να απορροφούν σε χαμηλότερα μήκη κύματος, σε σχέση με τη χλωροφύλλη α. Η χλωροφύλλη b, η οποία παράγεται από χλωροφύκη (και φυτά της ξηράς) καθώς και ορισμένα κυανοβακτήρια, είναι ένα παράδειγμα μιας τέτοιας επικουρικής χρωστικής ουσίας. Το β-καρωτίνιο, παραγόμενο από πολλούς τύπους φυκών, είναι άλλο ένα παράδειγμα. Οι ποικίλες εξελικτικές σειρές των φυκών έχουν διαμορφώσει διαφορετικές ακολουθίες επικουρικών χλωροφυλλών, καρωτινοειδών και φυκοβιλινών. Τα χλωροφύκη και τα φυτά της ξηράς συνήθως φαίνονται πράσινα επειδή οι άφθονες χλωροφύλλες α και b δεν συγκαλύπτονται από μεγάλες ποσότητες επικουρικών χρωστικών διαφορετικής χροιάς (π.χ. χλωροφύλλη c) (Graham *et al.* 2009).

1.5 Περιγραφή των Κλάσεων & των Γενών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Κλάση Chlorodendrophyceae

Τα Chlorodendrophyceae (clade IV, Guillou *et al.* 2004) είναι μία μικρή κλάση των πράσινων φυκών, αποτελούμενη από τα γένη *Tetraselmis* and *Scherffelia* (Massjuk & Lilitska 2006, Leliaert *et al.* 2012, Arora *et al.* 2013, Tragin *et al.* 2016), τα οποία περιλαμβάνουν είδη γλυκού και αλμυρού νερού. Παρά το γεγονός ότι παραδοσιακά θεωρούνταν μέλη των πρασινοφύτων, αυτά τα μονοκύτταρα μαστιγωτά μοιράζονται αρκετά δομικά χαρακτηριστικά με τα γνήσια (core) Chlorophyta (Trebouxiophyceae, Ulvophyceae, Chlorophyceae, Pedinophyceae), συμπεριλαμβανομένων της κλειστής μίτωσης και του φυκοπλάστη (Mattox & Stewart 1984, Melkonian 1990, Sym & Pienaar 1993, Leliaert *et al.* 2012). Η χρήση του φυκοπλάστη ως μεσολαβητή στην κυτταρική διαίρεση, φαίνεται να είναι μία πρόιμη καινοτομία που έλαβε χώρα κατά την εξέλιξη των γνήσιων χλωροφύτων (Turmel *et al.* 2016). Η φυλογενετική σχέση με τα γνήσια χλωρόφυτα επιβεβαιώθηκε αργότερα από μοριακά δεδομένα (Fawley *et al.* 2000, Guillou *et al.* 2004, Marin 2012). Πρόσφατα, ενοποιήθηκαν μαζί με τον UTC Ulvophyceae-Trebouxiophyceae-Chlorophyceae (UTC) κλάδο και αποτελούν πλέον τα ‘γνήσια χλωρόφυτα (‘core’ chlorophytes) (Fučíková *et al.* 2014c, Tragin *et al.* 2016, Turmel *et al.* 2016).

Τα κινητά κύτταρα των Chlorodendrophyceae είναι γενικά πλευρικός συμπίεσμένα, και φέρουν τέσσερα ίδια και ομοδυναμικά μαστίγια που εξέρχονται από ένα ανώτερο βοθρίο του κυττάρου. Τα κύτταρα συνήθως περιβάλλονται από θήκη (Manton & Parke 1965, Sym & Pienaar 1993). Τα κύτταρα γενικώς έχουν έναν μονό χλωροπλάστη, ο οποίος περιλαμβάνει μία εμφανή οπτική κηλίδα και ένα πυρηνοειδές (μόνο στα *Tetraselmis*). Η αναπαραγωγή είναι άγνωστη στην κλάση αυτή (Arora *et al.* 2013).

Τα περισσότερα Chlorodendrophyceae απαντώνται ως πλαγκτικοί ή βενθικοί οργανισμοί σε θαλάσσια περιβάλλοντα, όπου μερικές φορές παρουσιάζονται σε πυκνούς πληθυσμούς, προκαλώντας πληθυσμιακές εξάρσεις (blooms) σε παλιρροϊκές υδατοσυλλογές ή ακτές. Κάποια είδη απαντώνται και σε γλυκών-υδάτων ενδιαιτήματα (John *et al.* 2002). Μερικά είδη έχουν περιγραφεί ως ενδοσυμβιώτες θαλάσσιων ζώων, όπως το *Tetraselmis convolutae* το οποίο αποτελεί προαιρετικό συμβίωτη του σκόληκα *Symsagittifera* (*Convoluta*) (Parke & Manton 1965, Provasoli *et al.* 1968, Serodio *et al.* 2011, Arora *et al.* 2013). Πιο συγκεκριμένα, έχουν ανευρεθεί σε παράκτια και ωκεάνια εύκρατα ύδατα στον Βόρειο Ειρηνικό ωκεανό και στη Μεσόγειο (Tragin *et al.* 2016). Συγκριτικά με άλλες κλάσεις φυκών, η ομάδα αυτή φαίνεται να είναι περιορισμένη συνήθως στο κάτω μέρος της εύρωτης ζώνης, σε βάθος μικρότερο των 60m (Tragin *et al.* 2016).

Περαιτέρω, Chlorodendrophyceae έχουν ανευρεθεί σε ανοξικά ιζήματα (Edgcomb et al. 2011) αλλά και σε κρύα ιζήματα μεθανίου (Takishita et al. 2007) και έχουν διατηρηθεί καλλιέργειές τους από ιζήματα (Tragin et al. 2016). Περιβαλλοντικές ακολουθίες έχουν υποδείξει την ύπαρξή τους και στη Μεσόγειο, στις Ισπανικές ακτές (Massana et al. 2004, Viprey et al. 2008). Είδη της κλάσης αυτής έχουν ανακτηθεί κυρίως από επιφανειακά ύδατα των λεκανών του Ιονίου and Tyrrhenian Basins, οι οποίες χαρακτηρίζονται από χαμηλό ποσοστό θρεπτικών και υψηλή θερμοκρασία και αλατότητα (Viprey et al. 2008)

Τα *Tetraselmis* και *Scherffelia* είναι δύο σχετικώς μικρά γένη. Για το γένος *Scherffelia* αναφέρονται περίπου 10 επαρκώς περιγραφέντα είδη (Agora et al. 2013), αλλά μόνο το είδος *Scherffelia dubia* έχει μελετηθεί και απομονωθεί. Η βασική διαφορά του γένους αυτού από το *Tetraselmis* έγκειται στην έλλειψη πυρηνοειδούς (Melkonian & Preisig 1986). Οι τετραμερείς δομές των γονιδιωμάτων των γενών *Scherffelia* και *Tetraselmis* είναι μοναδικές ανάμεσα σε όλα τα γνήσια χλωρόφυτα (core chlorophytes) που έχουν ερευνηθεί (Turmel et al. 2016).

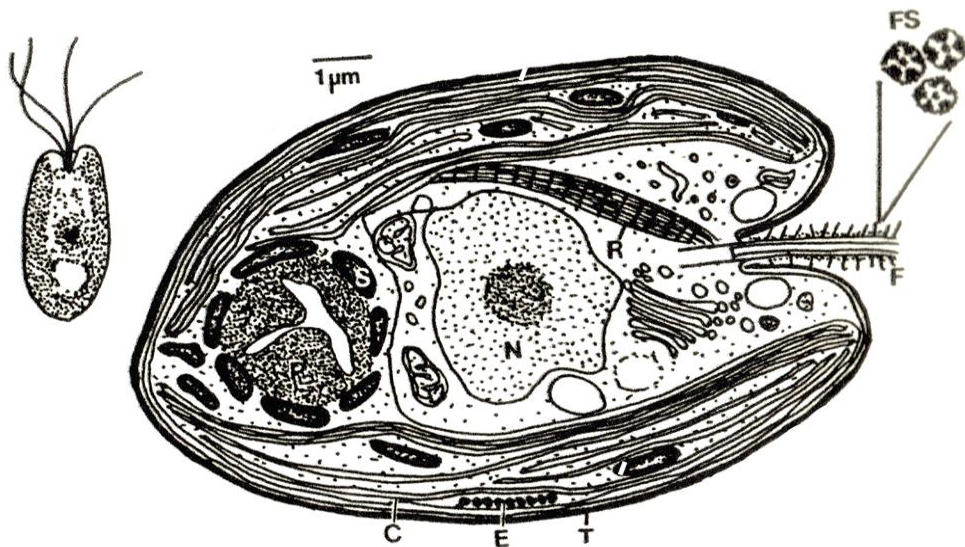
Γένος *Tetraselmis*

Το *Tetraselmis* αποτελεί ένα γένος του οποίου η συστηματική και η μορφολογία έχει σε μεγάλο βαθμό διευκρινιστεί (Parke & Manton 1965, McLachlan & Parke 1967, Melkonian 1979, Melkonian & Robenek 1979, Norris 1980, Norris et al. 1980, Hori et al. 1982, 1983, 1986, Throndsen & Zingone, 1988, Becker et al. 1990, 1991, 1994, Marin et al. 1993, 1996, Marin & Melkonian 1994). Το γένος *Tetraselmis* συνήθως απαντάται σε θαλασσινό νερό και λιμνοθάλασσες. Τα κύτταρα είναι ελλειπτικά-ωοειδή, κατά μέσο όρο διαστάσεων από 15 ως 20μm, και περιβάλλονται από ευκρινή θήκη που δημιουργείται από συνένωση πολλών μικρών ακτινωτών φολιδών (stellate scales) σε κρυσταλλοειδή διάταξη που παράγονται στο οργανίδιο Golgi (Lee 1989). Μερικά είδη ενδέχεται να απαντώνται ως μαστιγωτά (motile cells), ή ως ένα έμμοно κύτταρο (resting cell) εδραζόμενο με έναν βλεννώδη μίσχο, παρά το γεγονός ότι όλα τα μέλη της κλάσης φέρουν μαστίγια (Proskauer 1950, Norris et al. 1980, Sym&Pienaar 1993). Τα μαστιγοφόρα κύτταρα έχουν τέσσερα μαστίγια που αναδύονται από ένα επάκριο βοθρίο (apical pit) στη θήκη, σε δύο ζεύγη (Hori et al. 1982). Τα κινητά κύτταρα δεν επιδίδονται σε κολύμβηση για μεγάλες χρονικές περιόδους, ενώ τα μαστίγια ενίοτε χάνονται.

Στο γένος αυτό υπάρχει ένας κυπελλοειδής χλωροπλάστης με ένα σφαιρικό πυρηνοειδές (Lee 1989). Ο πυρήνας εντοπίζεται στο κέντρο του κυττάρου και τα σωμάτια Golgi ανευρίσκονται μπροστά από αυτόν. Υπάρχουν δύο τεράστιοι ριζοπλάστες που είναι συνδεδεμένοι στα βασικά σωμάτια (basal bodies), εμφανίζονται στο κύτταρο σε κάθε πλευρά του πυρήνα, και είναι προσδεμένοι στο πλασμαλήμμα (Lee 1989).

Το γένος *Tetraselmis*, του οποίου διάφορα είδη έχουν απομονωθεί από υφάλμυρες λιμνοθάλασσες, έχει διαχωριστεί σε τέσσερα υπο-γένη (Hori *et al.* 1982, 1983, 1986). Έχουν αναφερθεί περίπου 26 είδη από θαλάσσια και γλυκέων-υδάτων ενδιαιτήματα (Sym & Pienaar 1993, Arora *et al.* 2013) και περιλαμβάνει είδη που παλαιότερα ήταν κατατεθειμένα ως *Platymonas*, *Prasinocladus* και *Aulacochlamys* (Norris *et al.* 1980, Sym & Pienaar 1993). Οι περιγραφές των ειδών ήταν βασισμένες σε χαρακτηριστικά ορατά στην οπτική μικροσκοπία, όπως το μέγεθος των κυττάρων και το σχήμα, η δομή των οπίσθιων λοβών του κυττάρου (anterior cell lobes), η μορφολογία των χλωροπλαστών, η θέση του στίγματος, καθώς και το σχήμα και η θέση του πυρηνοειδούς (Proskauer 1950, Butcher 1952, 1959). Πολλά από αυτά τα χαρακτηριστικά έχουν μεγάλη ποικιλομορφία και άρα είναι ακατάλληλα για ακριβή αναγνώριση ειδών (Arora *et al.* 2013). Πιο πρόσφατα, χαρακτήρες ορατοί με την ηλεκτρονική μικροσκοπία, όπως η δομή του πυρηνοειδούς και οι τρίχες των μαστίγιων, έχουν προταθεί για τον διαχωρισμό των ειδών του γένους (Parke & Manton 1965, McLachlan & Parke 1967, Melkonian 1979, Melkonian & Robenek 1979, Norris *et al.* 1980, Hori *et al.* 1982, 1983, 1986, Throndsen & Zingone 1988, Becker *et al.* 1990, 1994, Marin *et al.* 1993, 1996, Marin & Melkonian 1994).

Η ποικιλομορφία των *Tetraselmis* σε τροπικά κλίματα δεν έχει ερευνηθεί επαρκώς. Το πιο πρόσφατο είδος που έχει καθιερωθεί, είναι το *Tetraselmis indica*, το οποίο απομονώθηκε από αλυκές στην Ινδία (Arora *et al.* 2013). Το είδος αυτό βάσει της τοποθεσίας δειγματοληψίας του, φαίνεται να προτιμάει υπεράλμυρα περιβάλλοντα, χωρίς να αποκλείεται η επιβίωσή του και σε άλλα θαλάσσια περιβάλλοντα.



Εικόνα 1.5: Απεικόνιση ενός τυπικού κυττάρου *Tetraselmis*. (C) χλωροπλάστης, (E) οφθαλμική κηλίδα, (T) θήκη, (N) πυρήνας, (S) αμυλόκοκκοι γύρω από το πυρηνοειδές, (R) ριζοπλάστης, (F) μαστίγιο, (FS) μαστιγιακά scales [Πηγή: Tomas (1997)]

Κλάδος UTC (Ulvophyceae, Trebouxiophyceae And Chlorophyceae)

Κλάση Trebouxiophyceae

Ο κλάδος των UTC (Ulvophyceae, Trebouxiophyceae και Chlorophyceae) παρουσιάζει ευρεία μορφολογική ποικιλότητα. Τα Trebouxiophyceae είναι μια ιδιαίτερα πλούσια σε είδη κλάση που περιλαμβάνει συμβιώτες με μύκητες (π.χ. λειχήνες) (Friedl & Bhattacharya 2002) όπως επίσης και ελεύθερης διαβίωσης πράσινα φύκη. Άλλα μέλη αυτής της κλάσης, είναι φωτοσυνθετικοί ενδοσυμβιώτες σε διάφορα Πρώτιστα, σπονδυλωτά και φυτά γλυκού και αλμυρού νερού (Karakashian & Karakashian 1965, Tremouillaux-Guiller *et al.* 2002, Lewis & Muller- Parker 2004, Hoshina & Imamura 2008, Summerer *et al.* 2008, Letsch *et al.* 2009). Μέλη αυτής της ομάδας παρουσιάζουν αξιοσημείωτη οικολογική προσαρμοστικότητα και απαντώνται σε ωκεάνια, χερσαία και αεριοχερσαία (aeroterrestrial) περιβάλλοντα.

Τα Trebouxiophyceae αντιπροσωπεύονται κυρίως από κοκκοειδή κύτταρα και κύτταρα με μαστίγια σε παράκτια θαλάσσια περιβάλλοντα αλλά και σε περιβάλλοντα της ξηράς. Χαρακτηριστικά γένη είναι τα *Picochlorum* (2 μm διάμετρος), *Chlorella* (1.5 με 10 μm διάμετρος), *Elliptochloris* (5 με 10 μm διάμετρος) και *Chloroidium* (~ 15 μm διάμετρος) (Darienکو *et al.* 2010). Τα Trebouxiophyceae επίσης συμπεριλαμβάνουν είδη που έχουν χάσει τη φωτοσυνθετική τους ικανότητα και έχουν εξελίξει ελεύθερο ή παρασιτικό τρόπο ζωής (π.χ. *Prototheca* και *Helicosporodinium*) (Leliaert *et al.* 2012).

Οι φυλογενετικές μελέτες με βάση το γονίδιο 18S rDNA έχουν αναγνωρίσει πολλαπλές γενεαλογικές σειρές εντός των Trebouxiophyceae όπως για παράδειγμα τις τάξεις Chlorellales, Trebouxiales, Microthamniales, και τα γένη *Prasiola*, *Choricystis/Botryococcus*, *Watanabea*, *Oocystis* και *Geminella*. Μεταξύ αυτών των ομάδων, υπάρχει και ένας αριθμός που αποτελείται από μονάχα ένα είδος ή γένος (π.χ. *Xylochloris*, *Leptosira*, *Lobosphaera*). Οι αλληλεξαρτήσεις μεταξύ των περισσότερων σειρών των Trebouxiophyceae δεν έχουν ακόμα επιλυθεί (Lemieux *et al.* 2014).

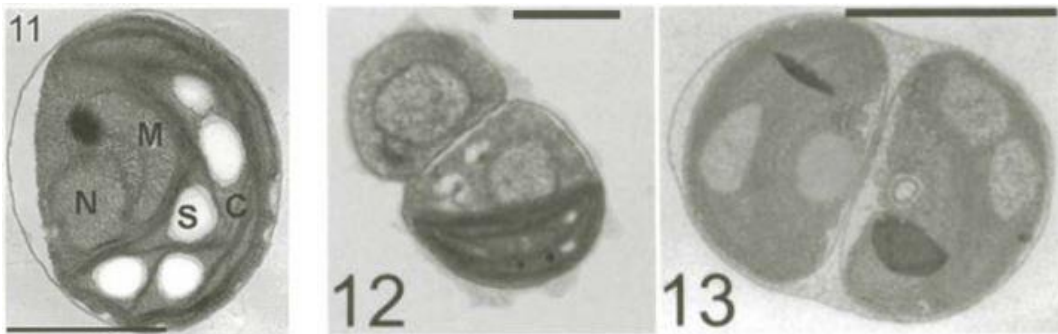
Οι ακολουθίες των Trebouxiophyceae φαίνεται να είναι περιορισμένες σε επιφανειακά ύδατα, σε αντίθεση με εκείνη των Chlorodendrophyceae που φαίνεται να απαντώνται κατά προτίμηση βαθιά στην εύφωτη ζώνη, σε βάθος κάτω από τα 60m (Tragin *et al.* 2016). Επίσης, έχουν ανευρεθεί και στη Μεσόγειο θάλασσα (Viprey *et al.* 2008).

Τα Trebouxiophyceae είχαν αρχικά οριστεί με βάση δομικά χαρακτηριστικά (CCW κατεύθυνση μαστιγιακής συσκευής, μη-μόνιμη μετακεντρική άτρακτο,, και κυτοκίνηση υποβοηθούμενη από τον φυκοπλάστη) (Mattox and Stewart 1984) και ο ορισμός τους δόθηκε αργότερα από δεδομένα του γονιδίου 18S (Kantz *et al.* 1990, Friedl 1995, Wolf *et al.* 2003).

Γένη *Picochlorum*/*Nannochloris*/*Nanochlorum*

Τα κύτταρα είναι πράσινα, σφαιρικά ή ωοειδή, με διάμετρο 1.5-3 μm, αναπτυσσόμενα σε υγρό έδαφος, και σε γλυκά ή αλμυρά νερά. Διαθέτουν έναν πυρήνα, ένα μιτοχόνδριο, έναν πλευρικό χλωροπλάστη και το πυρηνοειδές απουσιάζει, όπως και τα μαστίγια, τα οποία είναι ορατά στο TEM. Οι χρωστικές του χλωροπλάστη περιλαμβάνουν χλωροφύλλες a, b. Η αναπαραγωγή γίνεται με αυτοσπóρια δίνοντας γένεση σε δύο ή περισσότερα θυγατρικά κύτταρα. Εγγενής αναπαραγωγή αναφέρεται αλλά δεν έχει παρατηρηθεί (Adl *et al.* 2013). Βιβλιογραφικά, οι αναλύσεις του 18S rRNA σε περιβαλλοντικές ακολουθίες, δείχνουν διαφοροποιήσεις των *Picochlorum* από άλλα μέλη των Trebouxiophyceae (Henley *et al.* 2004).

Δεν είναι σαφές, ακόμα και σήμερα, ποιες είναι οι ακριβείς διαφοροποιήσεις μεταξύ των γενών και με την ανάλυση περαιτέρω γονιδίων, πολλά γένη ανακαλύπτεται ότι είναι συγγενή με άλλα είδη. Αρκετά γένη, όπως και το *Picochlorum* μετακινήθηκαν/μετακινούνται σε ομάδες που περιέχουν είδη *Nannochloris* και στη συνέχεια μετονομάστηκαν (Henley *et al.* 2004, Not *et al.* 2012). Η ανεκτικότητα στην αλατότητα και το εύρος διαβίωσης, όπως επίσης και ο τρόπος διαίρεσης των κυττάρων, είναι πιθανότατα σημαντικά στον διαχωρισμό όλων αυτών των γενών μεταξύ τους



Εικόνα 1.6: Απεικόνιση τυπικών κυττάρων *Picochlorum* (11 & 13) & *Nannochloris* (12). (C) χλωροπλάστης, (N) πυρήνας, (M) μιτοχόνδριο, (S) αμυλόκοκκοι. Στην εικόνα 12 παρατηρείται ένα παράδειγμα δυαδικής σχάσης (*binary fission*) σε κύτταρα *Nannochloris*, σε αντίθεση με τον σχηματισμό αυτοσπορίων (*autospore formation*) στο *Picochlorum* sp. στη Εικόνα 13 [Πηγή: Henley *et al.*, 2004]

1.6 Εμπορική & ερευνητική χρήση

1.6.1 Τράπεζες μικροφυκών

Στις τελευταίες δεκαετίες, πολλοί ερευνητές έχουν δημιουργήσει εκτενείς συλλογές μικροφυκών σε πολλές χώρες. Μέχρι σήμερα, περίπου τα 30000 των 50000 ειδών έχουν αναγνωρισθεί και φυλάσσονται σε συλλογές διαφόρων ερευνητικών ιδρυμάτων (Richmond *et al.* 2004, Mata *et al.* 2010). Για παράδειγμα, η μεγαλύτερη συλλογή είναι εγκατεστημένη στο Πανεπιστήμιο της Coimbra στην Πορτογαλία (Collection of Freshwater Algae) (ACOI) και διατηρεί περίπου 3000 στελέχη αναγνωρισμένα σε επίπεδο γένους και 1000 είδη φυτοπλαγκτού. Ακόμη, το Πανεπιστήμιο του Göttingen στη Γερμανία (Culture Collection of Algae) (SAG) ξεκίνησε στις αρχές του 1920 και διατηρεί περισσότερα από 2000 στελέχη και περισσότερα από 1000 διαφορετικά είδη γλυκού και θαλασσινού νερού. Περίπου το 77% των στελεχών της συλλογής SAG είναι πράσινα φύκη και περίπου 8% κυανοβακτήρια. Ορισμένα από αυτά είναι ροδοφύκη γλυκού νερού και άλλα από αλμυρά περιβάλλοντα.

Επιπλέον, το Πανεπιστήμιο του Texas στην Αμερική (Culture Collection of Algae) που ιδρύθηκε το 1953 διατηρεί περισσότερα από 3000 διαφορετικά στελέχη (UTEX), εκπροσωπώντας περίπου 2000 διαφορετικά είδη γλυκού νερού (εδαφικά πράσινα φύκη και κυανοβακτήρια), αλλά περιλαμβάνει και αντιπροσώπους από τα βασικότερα taxa φυκών, όπως πολλά είδη πράσινων μακροφυκών θαλασσινού νερού και ροδοφύκη. Επιπροσθέτως, 2500 στελέχη φυκών και πρωτοζώων είναι κατατεθειμένα στην Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), η οποία εδρεύει στη Σκωτία. Στην Ασία, το National Institute for Environmental Studies Collection (NIES), στην Ιαπωνία, διατηρεί μία συλλογή με περισσότερα από 2000 στελέχη, από 700 περίπου διαφορετικά είδη φυκών. Το CSIRO Collection of Living Microalgae (CCLM), στην Αυστραλία, διατηρεί περίπου 800 στελέχη διαφορετικών μικροφυκών, περιλαμβάνοντας εκπροσώπους από την πλειονότητα των κλάσεων των μικροφυκών θαλασσινού και γλυκού νερού, με τα περισσότερα από αυτά να έχουν απομονωθεί από τα νερά της Αυστραλίας.

Η Τράπεζα Καλλιέργειών Μικροφυκών που στεγάζεται στον Τομέα 'Οικολογίας και Ταξινομικής' του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών αποτελείται από περίπου 120 είδη μικροφυκών (Χλωροφύκη, Δινομαστιγωτά, Διάτομα, Κυανοβακτήρια), η πλειονότητα των οποίων έχει απομονωθεί από ελληνικές λιμνοθάλασσες και αλυκές που ευρίσκονται στις ακτές του Ιονίου Πελάγους, ενώ ορισμένα προέρχονται από τράπεζες στελεχών φυκών του εξωτερικού (CCAP, SAG, UTEX). Τα παραπάνω στελέχη ανανεώνονται με τη μέθοδο του εμβολιασμού, σε θάλαμο νηματικής ροής (LFC), σε μηνιαία βάση, με κατάλληλα θρεπτικά μέσα.

1.6.2 Βιομηχανικές χρήσεις των μικροφυκών

Οι άνθρωποι χρησιμοποιούν τα φύκη σε ποικίλες τεχνολογικές εφαρμογές. Επί παραδείγματι, τα φύκη παρέχουν βασικά σύνεργα εργαστηρίου στη γενωμική (genomics), την πρωτεομική (proteomics) και σε άλλες ερευνητικές εφαρμογές. Οι άνθρωποι χρησιμοποιούν επίσης τα φύκη ως περιβαλλοντικούς δείκτες, για να εκτιμήσουν την κατάσταση ποιότητας των σύγχρονων υδατικών οικοσυστημάτων και για να οδηγηθούν σε συμπεράσματα επί των περιβαλλοντικών συνθηκών του παρελθόντος. Οι μεταβολές των φυκών στη σύνθεση κοινωμών χρησιμοποιούνται ως δείκτες περιβαλλοντικής αλλαγής. Τα φύκη εφαρμόζονται επίσης σε εργαστηριακές βιοαναλύσεις για την παρακολούθηση της ποιότητας του νερού που θα χρησιμοποιηθεί ως πόσιμο ή για άλλους σκοπούς.

Επίσης, τα φύκη έχουν ενσωματωθεί σε συστήματα εφαρμοσμένης μηχανικής σχεδιασμένα για τον καθαρισμό υδάτων και αέρος. Τεχνικές γενετικής μηχανικής επιτρέπουν βελτιωτικές μετατροπές των φυκών με κατεύθυνση που ενισχύει την τεχνολογική τους χρησιμότητα. Τεχνολογικές μέθοδοι που ενέχουν φύκη δυνητικά κατοχυρώνονται με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας και αποτελούν τη βάση για νέες εταιρείες ή βιομηχανίες.

Τα φύκη είναι πρωτογενείς παραγωγοί στις τροφικές αλυσίδες των υδατικών συστημάτων, ενώ μερικά είδη αποτελούν την προτιμώμενη τροφή για υδρόβια ζώα που εκτρέφονται σε υδατοκαλλιέργειες ή εκτίθενται σε ενυδρεία. Ορισμένα φύκη αποτελούν πολύτιμη τροφή του ανθρώπου, ενώ άλλα είναι πηγές πηκτικών ενώσεων ευρέως χρησιμοποιούμενων στη βιολογική έρευνα και στη βιομηχανία. Διαφόρων τύπων φύκη είναι γνωστόν ότι παράγουν ενώσεις χρήσιμες ως αντιβιοτικά ή για τη θεραπεία του καρκίνου. Προσφάτως, έχει διερευνηθεί η υποστηρικτική παραγωγή βιοκαυσίμων από φύκη ως υποκατάσταση των διαρκώς μειούμενων αποθεμάτων πετρελαίου. Η πλειοψηφία των προϊόντων που παράγονται από φύκη, καθώς και η εμπορική τους αξία, έχουν επισκοπηθεί από τους Radmer & Parker (1994) και Radmer (1996). Τα φύκη είναι πηγές διαφόρων τύπων τροφών και βιομηχανικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των ανανεώσιμων καυσίμων.

Το ενδιαφέρον για αυτές τις ομάδες αυτότροφων οργανισμών έγκειται στη δυνητική χρήση τους με παρόμοια τρόπο με τους ετερότροφους οργανισμούς, στην παραγωγή βιομάζας για διατροφή, ιχθυοτροφές, καλλυντικά κλπ. με τη χρήση ηλιακής ενέργειας. Οι απαρχές της εφαρμοσμένης φυκολογίας φαίνεται να ανάγονται πίσω στην εδραίωση της καλλιέργειας του γένους *Chlorella* από τον Beijerinck (1890).

Πλεονεκτήματα χρήσης μικροφυκών

Η μετάβαση στα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς, όπως τα μικροφύκη, μπορεί να συμβάλει στη μείωση των απαιτήσεων γης λόγω της τεκμηριωμένα περισσότερης παραγωγής ενέργειας/εκτάριο και λόγω

της έλλειψης αναγκαιότητας αρόσιμης γης για καλλιέργεια. Επιπροσθέτως, το βιοντίζελ φαίνεται να έχει χαμηλότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις μέσω του τρόπου που παράγεται και χρησιμοποιείται, εξασφαλίζοντας το ίδιο επίπεδο απόδοσης των υπαρχόντων καυσίμων (Reinhardt *et al.* 2008), γεγονός που εξασφαλίζεται στην καλλιέργεια μικροφυκών, ειδικά σε συνδυασμό με άλλες αειφόρες διαδικασίες (Ansari *et al.* 2016). Επίσης, η καλλιέργεια μικροφυκών δεν σχετίζεται άμεσα με την ανθρώπινη κατανάλωση (Mata *et al.* 2010).

Η έρευνα προσανατολίζεται πολύ στα πλεονεκτήματα της χρήσης μικροφυκών για την παραγωγή βιοντίζελ και άλλων χρήσεων σε σύγκριση με τις ήδη διαθέσιμες πρώτες ύλες (Sheehan *et al.* 1998, Li *et al.* 2008). Από πρακτικής άποψης, είναι τα μικροφύκη εύκολα στην καλλιέργεια, δύνανται να αναπτύσσονται με λίγη ή καθόλου προσοχή, χρησιμοποιούν πόρους νερού οι οποίοι είναι αχρείαστοι στην ανθρώπινη κατανάλωση και είναι εύκολο να διατηρήσουν θρεπτικά. Τα μικροφύκη αναπαράγονται χρησιμοποιώντας τη φωτοσύνθεση για να μετατρέψουν την ηλιακή ενέργεια σε χημική, συμπληρώνοντας έναν ολόκληρο κύκλο ανάπτυξης μέσα σε μερικές μέρες. Επιπροσθέτως, έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σχεδόν παντού, απαιτώντας ηλιακό φως και απλά θρεπτικά στοιχεία, και παρά το γεγονός ότι οι ρυθμοί ανάπτυξης είναι δυνατόν να επιταχυνθούν με την προσθήκη συγκεκριμένων θρεπτικών και επαρκή αερισμό (Aslan *et al.*, 2006, Pratoomyot *et al.* 2005, Renaud *et al.* 1999).

Διαφορετικά είδη μικροφυκών δύνανται να προσαρμοστούν ώστε να ζουν σε μία ποικιλία περιβαλλοντικών παραμέτρων. Τοιουτοτρόπως, είναι πιθανόν να συνυπάρχουν είδη που να απαιτούν συγκεκριμένα τοπικά περιβάλλοντα ή χαρακτηριστικά ανάπτυξης, κάτι το οποίο δεν μπορεί να συμβεί με τις παρούσες πρώτες ύλες για βιοντίζελ (π.χ. soybean, rapeseed, sunflower και palm oil). Τα φύκη αυτά διαθέτουν πιο αυξημένα ποσοστά ανάπτυξης και παραγωγικότητας σε σύγκριση με την κλασσική καλλιέργεια φυτών ξηράς και θάλασσας, απαιτώντας πολύ λιγότερο χώρο γης (Chisti 2007).

Έτσι, ο ανταγωνισμός για αρόσιμη γη με άλλα φυτά για ανθρώπινη κατανάλωση, μειώνεται κατά πολύ. Τα μικροφύκη έχουν χρησιμοποιηθεί ώστε να εφοδιάσουν με πρώτη ύλη για διαφόρων ειδών καύσιμα όπως το βιοντίζελ, το μεθάνιο, το υδρογόνο και η αιθανόλη μεταξύ άλλων. Το βιοντίζελ από τα φύκη δεν περιέχει θείο και έχει την ίδια απόδοση με το ντίζελ πετρελαίου, με ταυτόχρονη μείωση εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου.

1.6.2.1 Μικροφύκη & Βιοκαύσιμα

Η παραγωγή βιοκαυσίμων, αναμένεται μακροπρόθεσμα να αντικαταστήσει τα ορυκτά καύσιμα, εφ'όσον η παραγωγή τους θα μειώνει την εκπομπή υδρογονανθράκων, η καύση τους στα μέσα

μεταφοράς δεν θα είναι εξαρτημένη από τον άνθρακα (decarbonisation of transportation fuels) και κατ' επέκτασιν θα αυξάνεται η ασφάλεια της παροχής ενέργειας (Mata *et al.* 2010).

Τα πιο κοινά βιοκαύσιμα είναι το βιοντίζελ και η βιοιθανόλη, τα οποία αντιστοίχως είναι δυνατόν να αντικαταστήσουν το ντίζελ και τη βενζίνη στα σύγχρονα αυτοκίνητα με μηδενικές ή καμία μηχανικές αλλαγές στις μηχανές. Αυτά παράγονται κυρίως από βιομάζα ή ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και συνεισφέρουν σε χαμηλότερες εκπομπές καύσης σε σχέση με τα ορυκτά καύσιμα ανά μονάδα ενέργειας. Επιπλέον δύνανται να παραχθούν και με τις επικρατούσες τεχνολογίες και να διανεμηθούν μέσω του υπάρχοντος δικτύου διανομής. Ως εκ τούτου, τα κοινά βιοκαύσιμα ενδέχεται να επικρατήσουν, μέχρις ότου άλλες επιλογές όπως το υδρογόνο γίνουν διαθέσιμες (Mata *et al.* 2010).

Μεταξύ των διαφόρων δυνατοτήτων που ερευνώνται και εφαρμόζονται σε πιλοτικό επίπεδο, το πιο ενδιαφέρον σενάριο αφορά στα μικροφύκη. Τα μικροφύκη συνυπολογίζονται για την παραγωγή biodiesel, με βάση την ικανότητά τους να αναπτύσσονται ραγδαία και να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες αποθηκευτικών λιπιδίων (storage lipids), κυρίως στη μορφή των τριγλυκεριδίων (TAG). Οι οργανισμοί αυτοί δύνανται μέσω της φωτοσύνθεσης να μετατρέπουν το CO₂ και μεταλλικά στοιχεία σε βιομάζα, αλλά κάποια είδη τους αναπτύσσονται ετερότροφα (Duong *et al.* 2012).

Η βιομάζα των μικροφυκών είναι πλούσια σε λιπίδια, ενώσεις κατάλληλες για παραγωγή βιοντίζελ μέσω μετεστεροποίησης λιπαρών οξέων (FAME). Εκτός του βιοντίζελ, η βιομάζα από τα μικροφύκη είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοιθανόλης με ζύμωση (fermentation), βιομεθάνιο με αναερόβια πέψη (anaerobic digestion), βιοβουτανόλη και συνθετικό αέριο (syngas) (Ansari *et al.* 2016).

Μολονότι υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον και ταχεία ανάπτυξη στον τομέα αυτόν, η έρευνα είναι ακόμη σε πρωτογενές επίπεδο. Παρά το γεγονός ότι πολλά είδη μικροφυκών έχουν αναγνωριστεί και απομονωθεί για παραγωγή λιπιδίων, δεν υπάρχει επικρατούσα άποψη σχετικά με τα είδη στελεχών που έχουν τη μέγιστη αποδοτικότητα. Διαφορετικά είδη αναμένεται να λειτουργούν καλύτερα σε διαφορετικές γεωγραφικές, υδατικές και κλιματικές συνθήκες (Duong *et al.* 2012).

Παρά το γεγονός ότι πολλά στελέχη φυλάσσονται για ποικίλους σκοπούς (π.χ. φαρμακευτικούς, διατροφή, ενέργεια και βιομηχανικά προϊόντα), μόνο μερικές εκατοντάδες έχουν ερευνηθεί για το χημικό τους περιεχόμενο και πολύ λίγα έχουν καλλιεργηθεί σε βιομηχανικές ποσότητες. Το κόστος για τη μαζική παραγωγή βιομάζας από μικροφύκη είναι επί του παρόντος πολύ υψηλότερη σε σχέση με εκείνο από άλλες πηγές ενέργειας (Chisti 2007). Ως εκ τούτου, η επιλογή ενός μοντέλου παραγωγής με χαμηλό κόστος και ενέργεια θα διαδραμάτιζε έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην ανταγωνιστική παραγωγή biodiesel. Το μοντέλο αυτό περιλαμβάνει την επιλογή στελεχών φυτοπλαγκτού με μεγάλη

περιεκτικότητα σε λιπίδια, όπως επίσης και την επιλογή κατάλληλης τοποθεσίας για αποδοτική καλλιέργεια, συγκομιδή και τη διερεύνηση κατάλληλων μεθόδων εξαγωγής ελαίων (Duong *et al.* 2012).

1.6.2.2 Μικροφύκη και Ιχθυοκαλλιέργειες/Διατροφή

Τα θαλασσινά ψάρια απαιτούν στη διατροφή τους τα λιπαρά οξέα DHA, EPA και ARA, καθώς δεν είναι σε θέση να τα συνθέσουν και για αυτό αποτελούν τα απαραίτητα λιπαρά οξέα. Τα μικροφύκη είναι πλούσια σε θρεπτικά, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, λιπιδίων και βιταμινών (Becker 2013). Αυτά τα θρεπτικά στοιχεία καταναλώνονται από νεαρά υδρόβια ζώα με μεγάλο ποσοστό αποδοτικότητας κατά τη μετατροπή (Benemann 1992). Πολλές έρευνες έχουν υποδείξει ότι τα ω3-PUFAs στα ιχθυέλαια προέρχονται από την τροφική αλυσίδα με την κατανάλωση ω3-φωτοσυνθετικών μικροφυκών από το ζωοπλαγκτόν (Yongmanitchai & Ward 1989).

Τα πολικά λιπίδια σχηματίζουν διπλή στοιβάδα στα κύτταρα και συνήθως έχουν υψηλές ποσότητες PUFA, έχουν δε μεγάλες προοπτικές για χρήση τους ως τροφή ή στη διατροφή (Ansari 2016). Κατ' επέκταση, τα μικροφύκη είναι από τις σημαντικότερες πηγές τροφής στις ιχθυοκαλλιέργειες, λόγω της διατροφικής τους αξίας και της ικανότητας να παράγουν μεγάλες ποσότητες ω3-PUFA (Patil *et al.* 2007).

Κατ' επέκτασιν, τα πολικά λιπίδια χρησιμοποιούνται ευρέως ως τροφή σε λάρβες για σύντομο διάστημα ή ως συμπληρώματα διατροφής στις ζωοτροφές, καθώς και για τον χρωματισμό της σάρκας των σολωμοειδών (salmonids) και την επαγωγή άλλων βιολογικών διεργασιών. Ακόμη, τα πολικά λιπίδια δύνανται να χρησιμοποιηθούν για απευθείας κατανάλωση στην περίπτωση των μαλακίων και των γαρίδων ή εμμέσως ως τροφή για ζωντανά θηράματα των μικρών ψαριών (Hemaiswarya *et al.* 2011).

Το είδος και η ποσότητα των μικροφυκών επηρεάζουν άμεσα την εκκόλαψη, επιβίωση και ανάπτυξη των υδρόβιων οργανισμών (Liu *et al.* 2007). Έτσι, η καλλιέργεια για βιομάζα των μικροφυκών είναι απαραίτητη για την εξέλιξη της υδατοκαλλιέργειας. Μέχρι σήμερα, περίπου 20 μικροφύκη όπως τα *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Chaetoceros*, *Skeletonema* & *Nannochloropsis* έχουν χρησιμοποιηθεί σε υδατοκαλλιέργειες (Hemaiswarya *et al.* 2011), με την ανάπτυξη των στελεχών σε αυτότροφες συνθήκες. Ο συνδυασμός διαφορετικών ειδών μικροφυκών προσφέρει περισσότερο ισορροπημένη διατροφή και βελτιώνει την ανάπτυξη των ζώων καλύτερα σε σύγκριση με διατροφή αποτελούμενη από μόνο ένα είδος μικροφυκών (Spolaore *et al.* 2006).

Με σκοπό να χρησιμοποιηθεί στη διατροφή του ανθρώπου ή στην υδατοκαλλιέργεια, το στέλεχος πρέπει να έχει συγκεκριμένα κριτήρια, όπως ικανότητα για εύκολη καλλιέργεια, έλλειψη τοξικότητας, υψηλή διατροφική αξία με σωστό μέγεθος και σχήμα κυττάρου και ένα εύπεπτο κυτταρικό τοίχωμα ώστε να διατίθενται εύκολα τα θρεπτικά του (Raja *et al.* 2004, Patil *et al.* 2007). Το περιεχόμενο των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (π.χ. α-λινολενικό οξύ (ALA, C18:3), C20:5 εικοσαπεντανοϊκό οξύ [EPA], αραχιδονικό οξύ [ARA] και C22:6 δοκοσαεξανοϊκό οξύ [DHA]) είναι, επίσης, μεγάλης διατροφικής σημασίας (Hemaiswarya *et al.* 2011, Ansari 2016).

1.6.2.3 Μικροφύκη & άλλες χρήσεις

Τα εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA, C20:5 ω3) και το δεκαεξανοϊκό οξύ (DHA, C22:6 ω3) είναι σημαντικά ω3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), ενώ το αραχιδονικό οξύ (ARA, C20:4 ω6), είναι ένα απαραίτητο ω6-PUFA. Τα οξέα αυτά έχουν πολυάριθμες τροφικές και φαρμακευτικές εφαρμογές (Shahidi & Wanasundara 1998, Horrocks & Yeo 1999). Τα EPA και DHA είναι σημαντικά στη θεραπεία της αθηροσκλήρωσης, του καρκίνου, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της ψωρίασης και ασθενειών που παρουσιάζονται σε μεγαλύτερες ηλικιών όπως το Alzheimer (Drevon *et al.* 1993). Τα ARA και DHA είναι μεγάλης σημασίας για τον εγκέφαλο και τα αιμοφόρα αγγεία και θεωρούνται απαραίτητα για την ανάπτυξη του εγκεφάλου των νεογνών και για την ανάπτυξη του αμφιβληστροειδούς χιτώνας (Patil *et al.* 2007). Τα εικοσανοειδή όπως η προσταγλαδίνη, η προστακυκλίνη και leukotriene, προέρχονται από ω3 και ω6-PUFAs και είναι σημαντικά για την ανάπτυξη των νεογνών και την επούλωση τραυμάτων (Simopoulos 1999, Nettleton 1995). Η σύγχρονη διατροφική θεώρηση εστιάζει στα πολυάριθμα οφέλη στην υγεία που οφείλονται στη διατήρηση των επιπέδων των ω3-PUFAs (Patil & Gislørød 2006).

1.7 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρουσιαζόμενης διπλωματικής εργασίας ήταν η απομόνωση, καλλιέργεια και ο βιοχημικός προσδιορισμός διαφόρων στελεχών μικροφυκών, τα οποία προέρχονται από τη λεκάνη της Ανατολικής Μεσογείου και είναι κατατεθειμένα στην Τράπεζα Μικροφυκών του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ. Εκτός του βιολογικού και οικολογικού ενδιαφέροντος που υπονοείται, τα μικροφύκη παρουσιάζουν επίσης φυσιολογικές και βιοχημικές ιδιότητες που τα καθιστούν κατάλληλα προς εμπορική εκμετάλλευση.

Για τη μελέτη αυτή υιοθετήθηκαν τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις:

- 1) Κλασική ταξινόμηση (οπτική μικροσκοπία & μικροσκοπία Nomarski)
- 2) Μοριακή φυλογενετική ανάλυση (μελέτη του γονιδίου rbcL & 18S)
- 3) Βιοχημικές αναλύσεις (φωτοσυνθετικές χρωστικές και προφίλ λιπαρών οξέων)

Βασικός στόχος της μελέτης ήταν κατ' αρχάς η απομόνωση και διατήρηση καθαρών στελεχών. Έπειτα, η προσπάθεια διαλεύκανσης της ταξινομικής τους θέσης σε επίπεδο γένους σε σύγκριση με κατατεθειμένα στελέχη στη Genbank που προέρχονται από την ίδια ταξινομική κλάση και οικογένεια. Επιπλέον στόχος της εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός των στελεχών με βάση το προφίλ των λιπαρών τους οξέων και της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλες και η μελλοντική χρήση των στοιχείων που θα προκύψουν στη βιομηχανία (υδατοκαλλιέργειες, τρόφιμα, καλλυντικά, φάρμακα, βιοκαύσιμα).

Με την παραπάνω ερευνητική πορεία έχει γίνει προσπάθεια για μια ολοκληρωμένη μελέτη, η οποία μελλοντικά θα αποτελέσει σημαντική πληροφορία στη εξελικτική μελέτη των μικροφυκών αυτών γενικότερα, στην οικολογική μελέτη των παράκτιων συστημάτων της Μεσογείου αλλά και στην βέλτιστη χρήση των συγκεκριμένων στελεχών στη βιομηχανία.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Περιοχές δειγματοληψίας

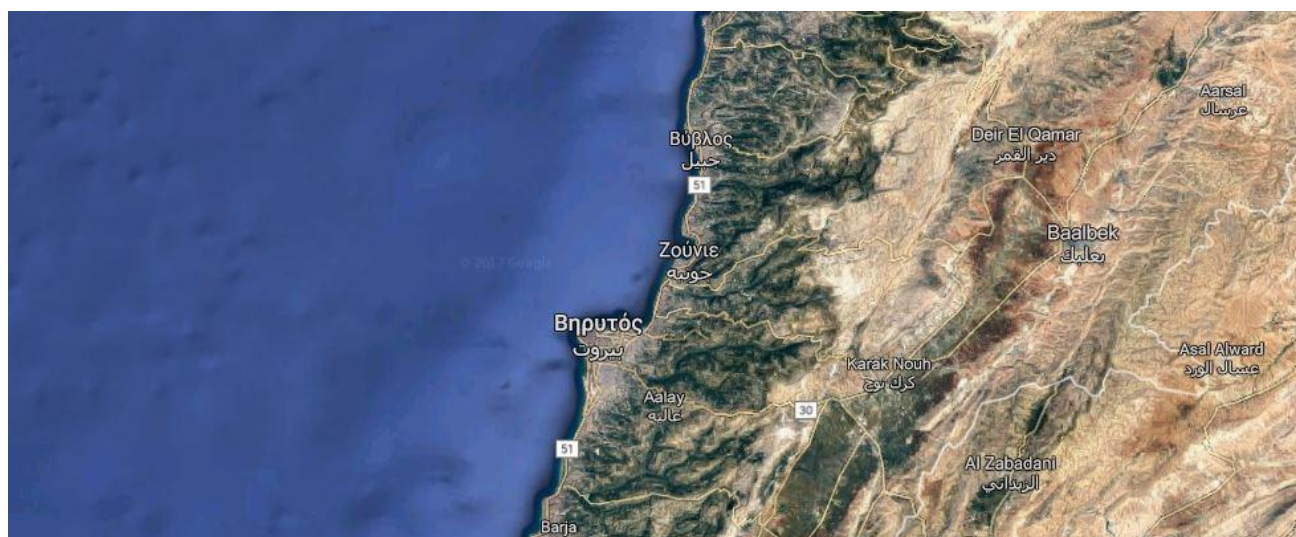
Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε παράκτια θαλάσσια οικοσυστήματα της Ανατολικής Μεσογείου και συγκεκριμένα, στην Κύπρο & στον Λίβανο στα πλαίσια του προγράμματος "Production of biodiesel in selected Mediterranean countries, Med-Algae". Αποτελεί πρόγραμμα για τη Μεσογειακή λεκάνη (συμμετέχουσες χώρες: Ελλάδα, Κύπρος, Ιταλία, Μάλτα, Αίγυπτος, Λίβανος) χρηματοδοτούμενο από την ΕΕ κατά τα έτη 2012-2015 στα πλαίσια της διασυνοριακής συνεργασίας, της Ευρωπαϊκής Πολιτικής Γειτονίας και του μηχανισμού χρηματοδότησής της (ENPI CBCMED, European Neighborhood Policy and of its financing instrument, Cross-Border Cooperation 'Mediterranean Sea Basin Program').

(βλ. λεπτομέρειες στην ιστοσελίδα (see details in www.Med-algae.com)

Τα δείγματα που προέρχονται από την περιοχή της Κύπρου, ελήφθησαν από την περιοχή Λιοπέτρι, έξω από τη Λάρνακα από αλίπεδα με εύτροφα νερά και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο Walne αλατότητας 40‰.



Τα δείγματα που προέρχονται από την περιοχή του Λιβάνου, ελήφθησαν από την περιοχή Zebel, κοντά στη Βύβλο, από θαλάσσια εύτροφα νερά και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο Walne αλατότητας 40‰.



Αρχικές καλλιέργειες	Προέλευση
Cyp1	Κύπρος
Cyp2	Κύπρος
Cyp7	Κύπρος
Cyp9	Κύπρος
Cyp10	Κύπρος
Cyp18	Κύπρος
Cyp19	Κύπρος
Cyp28	Κύπρος
Leb1	Λίβανος
Leb4	Λίβανος
Leb6	Λίβανος

2.2 Καλλιέργεια & απομόνωση στελεχών

Τα δείγματα νερού που συλλέχθηκαν μέσω του ανωτέρω προγράμματος, καλλιεργήθηκαν στο ‘Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Φυκολογίας’ του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ σε θαλασσινό νερό 40‰ εμπλουτισμένο με θρεπτικό διάλυμα Walne, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη και την αύξηση αρκετών στελεχών φυτοπλαγκτού από ποικίλες ταξινομικές ομάδες σε κάθε διαφορετική άνθιση.

2.2.1 Απομόνωση στελεχών φυτοπλαγκτού

Η απομόνωση των διαφορετικών κυρίαρχων στελεχών του μικροπλαγκτού πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και την επίστρωση σε τρυβλία petri με στερεό θρεπτικό μέσο.

2.2.1.1 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

Η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων πραγματοποιείται με σκοπό την απομόνωση ενός μικροοργανισμού, σε καθαρή καλλιέργεια. Κατά τις διαδοχικές αραιώσεις το αρχικό εμβόλιο με τη χρήση αποστειρωμένης πιπέτας, αραιώνεται σε μια σειρά δοκιμαστικών σωλήνων. Μια σειρά διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων πραγματοποιείται μεταφέροντας 1ml αρχικού δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα με 9ml υγρό θρεπτικό μέσο (αραίωση 10^{-1}), ακολούθως 1ml σε δεύτερο σωλήνα (αραίωση 10^{-2}) κ.ο.κ. Μετά από κάθε αραιώση ο επόμενος δοκιμαστικός σωλήνας θα περιέχει το 1/10 των κυττάρων, σε σχέση με τον ακριβώς προηγούμενο. Όλοι οι χειρισμοί έγιναν υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής, και οι σωλήνες περιείχαν υγρό θρεπτικό μέσο Walne κατάλληλο για την ανάπτυξη των οργανισμών.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 3 σειρές x 10 σωλήνες στην πρώτη φάση των αραιώσεων και στη συνέχεια 3 σειρές x 5 σωλήνες στη δεύτερη φάση των αραιώσεων, για τα κοκκοειδή στελέχη (Cyp7, Leb1, Leb4).

2.2.1.2 Μέθοδος επίστρωσης καλλιεργειών σε τρυβλία petri

Για την απομόνωση των υπόλοιπων στελεχών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επίστρωσης σε τρυβλία petri με Walne's μέσο 40% και 12% αгарόζη ως στερεοποιητικό μέσο. Αρχικά, εφαρμόζεται μία τριπλέτα τρυβλίων για κάθε μικτή καλλιέργεια, στα οποία αφήνεται να αναπτυχθεί 1ml καλλιέργειας σε ξεχωριστές αποικίες. Έπειτα, επιλέγονται μεμονωμένες αποικίες με τη βοήθεια του βρόχου ενοφθαλμισμού (κρίκος). Υπό ασηπτικές συνθήκες, ο βρόχος τοποθετείται επάνω από μία πηγή φλόγας μέχρι να ερυθροπυρωθεί και στη συνέχεια ψύχεται λίγο στον αέρα.

Στη συνέχεια, μία μεμονωμένη αποικία λαμβάνεται και επιστρώνεται σε παράλληλες γραμμές υπό γωνία σε νέο τρυβλίο, διασπείροντας έτσι κύτταρα σε μειούμενη πυκνότητα σε όλο το τρυβλίο (striking). Με αυτόν τον τρόπο, μεγιστοποιούνται οι πιθανότητες στα χαμηλότερα σημεία του τρυβλίου οι αναπτυσσόμενες αποικίες να αποτελούνται από ένα είδος μικροοργανισμού. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται σε νέες σειρές τρυβλίων όσες φορές χρειάζεται, έως ότου παρατηρηθούν στο

μικροσκόπιο μονά στελέχη. Τότε, οι μονές αποικίες λαμβάνονται από το τρυβλίο και τοποθετούνται σε υγρή καλλιέργεια.

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκαν 2 σειρές striking x 2 επαναλήψεις για την απομόνωση των στελεχών που διέθεταν μαστίγια (Cyp1, Cyp2, Cyp7, Cyp9, Cyp10, Cyp18, Cyp19, Cyp28, Leb6).

2.2.2 Καλλιέργεια & συντήρηση των απομονωθέντων στελεχών

Μετά από την απομόνωση στελεχών προέκυψαν μονοκαλλιέργειες μικροφυκών, οι οποίες και αποτελούν πλέον τμήμα της ‘Τράπεζας Καλλιεργειών Μικροφυκών’ του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ.

Τα απομονωθέντα στελέχη από κάθε καλλιέργεια είναι τα εξής:

Αρχικές καλλιέργειες	Προέλευση	Απομονωθέντα στελέχη
Cyp1	Κύπρος	Cyp1_1
Cyp2	Κύπρος	Cyp2_1
Cyp7	Κύπρος	Cyp7_1_1
Cyp9	Κύπρος	Cyp9_1
Cyp10	Κύπρος	Cyp10_1
Cyp18	Κύπρος	Cyp18_1
Cyp19	Κύπρος	Cyp19_1
Cyp28	Κύπρος	Cyp28_1
Leb1	Λίβανος	Leb1_1
Leb4	Λίβανος	Leb4_1_1
Leb6	Λίβανος	Leb6_1

Τα παραπάνω στελέχη ανανεώνονται με τη μέθοδο του εμβολιασμού, σε θάλαμο νηματικής ροής, σε μηνιαία βάση υπό ασηπτικές συνθήκες. Το μέσο καλλιέργειας αποτελείται από φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό κατάλληλης αλατότητας εμπλουτισμένο με θρεπτικό διάλυμα και βιταμίνες. Τα έντεκα (11) στελέχη που μελετήθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας, καλλιεργούνται όλα σε θαλασσινό νερό αλατότητας 40‰ εμπλουτισμένο με θρεπτικό διάλυμα Walne.

Οι μονοειδικές καλλιέργειες των μικροφυκών φυλάσσονται σε κλειστό θάλαμο καλλιέργειας. Οι συνθήκες που επικρατούν στον θάλαμο καλλιέργειών είναι οι εξής:

- Θερμοκρασία: 21–23°C (η θερμοκρασία ελέγχεται με θεرمόμετρα μεγίστου-ελαχίστου)
- Σχετική υγρασία αέρος: ~35%
- Ένταση φωτισμού: 25–42 $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (ο φωτισμός στον θάλαμο είναι συνεχής και παρέχεται από σύστημα λαμπτήρων φθορισμού Gro-Lux L36W/77 της Osram)

**Οι παράμετροι θερμοκρασία, σχετική υγρασία αέρος και ένταση συνεχούς φωτισμού μετρήθηκαν με τη χρήση μηχανήματος LI-COR LI-1400.*

2.2.2.1 Παρασκευή θρεπτικών διαλυμάτων

Θρεπτικό διάλυμα κατά Walne (Walne's Medium)

Διάλυμα 1°

Σε 1L απεσταγμένο νερού τοποθετούνται:

- Δινάτριο άλας του EDTA ($\text{Na}_2 \text{EDTA}$) – 45g
- Βορικό οξύ (H_3BO_3) – 33.6g
- Νιτρικό νάτριο ή νιτρικό κάλιο (NaNO_3 ή KNO_3) – 100g ή 116g
- Μονοβασικό ορθοφωσφορικό νάτριο ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) – 20g
- Χλωριούχο μαγνήσιο ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) – 0.36g
- Χλωριούχος σίδηρος ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) – 1.3g

Εν συνεχεία, το διάλυμα θερμαίνεται και αναδεύεται.

Διάλυμα 2°

Σε 100ml απιονισμένου νερού προστίθενται:

- Χλωριούχος ψευδάργυρος (ZnCl_2) – 2.1g
- Χλωριούχο κοβάλτιο ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) – 2g
- Μολυβδαινικό αμμώνιο ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) – 0.9g
- Θεϊκός χαλκός ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) – 2g
- Συμπυκνωμένο υδροχλωρικό οξύ (HCl) – 10ml

Το διάλυμα θερμαίνεται και αναδεύεται.

Τέλος, στο 1ο διάλυμα προστίθεται 1ml από το 2ο διάλυμα και ακολουθεί ανάδευση.

Διάλυμα βιταμινών

Σε 1L απιονισμένου νερού προστίθεται:

- Θειαμίνη · HCl (vit. B1) - 20mg
- Κυανοκοβαλαμίνη (vit. B12) – 10mg
- Βιοτίνη (vit. H) – 5mg

Ακόμα, προστίθενται λίγες σταγόνες HCl ώστε να μη δημιουργηθεί ίζημα.

Τα διαλύματα αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο (θερμοκρασία 121°C, πίεση 1atm) για 1h και στη συνέχεια αποθηκεύονται στους 4°C.

Τελικό θρεπτικό μέσο Walne 40‰

Σε 1L διηθημένου θαλασσινού νερού προστίθεται 1ml θρεπτικού διαλύματος κατά Walne και ακολουθεί έντονη ανάδευση.

Τέλος, η αλατότητα του διαλύματος μετράται, με διαθλασίμετρο (Atago S/Mill-E) και το θρεπτικό μέσο αποστειρώνεται.

** Το φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό προέρχεται από την περιοχή του Αγίου Κοσμά και ελήφθη με τη βοήθεια του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) όπου και πραγματοποιήθηκε το φιλτράρισμα.*

2.3. Κλασική ταξινόμική

2.3.1 Φωτονική μικροσκοπία

Η παρατήρηση των κυττάρων των στελεχών πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικά φωτονικά μικροσκόπια:

- a. Μικροσκόπιο Zeiss, με ελαιοκαταδυτικό φακό (x100) Planapo της Zeiss. Η φωτογράφιση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με σύστημα βιντεοκάμερας Sony (Τομέας Οικολογίας και Ταξινόμικης, Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ).
- b. Μικροσκόπιο AxioPlan της Zeiss, με πηγή UV, φίλτρα επιφθορισμού και οπτικό σύστημα Nomarski (differential interference contrast). Η φωτογράφιση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με σύστημα ψηφιακής κάμερας Zeiss AxioCam MRc 5 (Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ).

2.3.2 Κλείδες

Οι κλείδες που χρησιμοποιήθηκαν για την αναγνώριση των χαρακτήρων είναι των Lee (1989), Tomas (1997), Agora *et al.* (2013) για τα στελέχη με μαστίγια καθώς και δεδομένα από δημοσιευμένες εργασίες για τα κοκκοειδή στελέχη.

2.4. Μοριακές αναλύσεις

Οι μοριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο 'Εργαστήριο Μοριακής Οικολογίας' του Τομέα Οικολογίας και Ταξινόμικης, Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ.

2.4.1 Πρωτόκολλο απομόνωσης γονιδιωματικού DNA

Η εξαγωγή του γενετικού υλικού από τα κύτταρα έγινε με τη χρήση του πακέτου "Genomic DNA from Plants", της εταιρίας Macherey-Nagel, η οποία βασίζεται στη μέθοδο CTAB DNA Miniprep (Joseph D. Clark).

1. Ένας όγκος 250ml υγρής καλλιέργειας, φυγοκεντρείται στις 6000rpm.
2. Το ίζημα -περίπου 250μl- τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf και ομογενοποιείται μηχανικά με τη χρήση μικρογουδιού.
3. Το ρυθμιστικό διάλυμα PE τοποθετείται στους 65°C.
4. Στο ομογενοποιημένο δείγμα προστίθενται 400μl ρυθμιστικού διαλύματος PL1.
5. Μετά από καλή ανάδευση με τη βοήθεια του Vortex προστίθενται 10μl διαλύματος RNAase A και το δείγμα αναδεύεται ξανά.
6. Το δείγμα επωάζεται στους 65 °C για 30'.
7. Το εκχύλισμα τοποθετείται στην ειδική στήλη Nucleospin® Filter και φυγοκεντρείται για 2' στα 11.000g ώστε να δημιουργηθούν δύο φάσεις.
8. Το διαυγές διήθημα μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf.
9. Μετά την προσθήκη 450μl ρυθμιστικού διαλύματος PC το δείγμα αναδεύεται επαρκώς με τη βοήθεια του Vortex.
10. 700μl από το διάλυμα που προέκυψε στη στήλη NucleoSpin® Plant II Column μεταφέρονται και φυγοκεντρώνονται για 1' στα 11.000g.
11. Το διήθημα απορρίπτεται.
12. Ακολουθούν τρεις διαδοχικές πλύσεις:
 - a. 1η πλύση: Προσθήκη 400μl ρυθμιστικού διαλύματος PW1 στη στήλη, φυγοκέντρωση για 1' στα 11.000 g και απόρριψη του διηθήματος.

- b. 2η πλύση: Προσθήκη 700μl ρυθμιστικού διαλύματος PW2 στη στήλη, φυγοκέντρηση για 1' στα 11.000 g και απόρριψη του διηθήματος.
 - c. 3η πλύση: Προσθήκη 200μl ρυθμιστικού διαλύματος PW2 στη στήλη και φυγοκέντρηση για 1' στα 11.000g ώστε να καθαριστεί και να στεγνώσει πλήρως η μεμβράνη πυριτίου.
13. Η στήλη τοποθετείται σε νέο σωλήνα erppendorf και μετά την προσθήκη 50μl ρυθμιστικού διαλύματος PE σε αυτήν, ο σωλήνας επωάζεται για 20' στους 65 °C.
14. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1' στα 11.000g ώστε να επιτευχθεί η έκλυση του DNA. Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται για μία ακόμη φορά με το ίδιο το διήθημα.
15. Το δείγμα αποθηκεύεται στους -20°C.

2.4.2 Απλή Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η περιοχή των επιλεγμένων γονιδίων για την ταυτοποίηση των στελεχών, ενισχύθηκαν με τη διαδικασία της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης. Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) είναι μια κλασική τεχνική της μοριακής βιολογίας, εξαιρετικά ευαίσθητη γιατί επιτρέπει την ταχεία ανάλυση *in vitro*, συγκεκριμένων περιοχών DNA που περιέχονται σε ένα δείγμα, βασισμένη σε συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της αντιγραφής του DNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται μέσα σε θερμοκυκλοποιητή (thermocycler), ο οποίος έχει την ικανότητα να αυξομειώνει θερμοκρασίες με μεγάλη ταχύτητα, ακολουθώντας συγκεκριμένα και προγραμματισμένα βήματα με τη βοήθεια της δράσης ενός ενζύμου DNA πολυμεράσης. Για την ενίσχυση τμημάτων DNA στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η KAPA-Taq DNA Polymerase της εταιρίας KAPABIOSYSTEMS. Τα στάδια της PCR είναι τα εξής:

1. **Αποδιάταξη αρχικού δείγματος (initialization):** Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 95°C ώστε να καταστραφούν οι δευτεροταγείς και τριτοταγείς δομές του DNA και να περάσει από τη δίκλωνη στη μονόκλωνη μορφή του.
2. **Αποδιάταξη προϊόντων (denaturation):** Το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 94°C ώστε τα μικρά τμήματα DNA που δημιουργήθηκαν στο στάδιο της αντιγραφής να απομακρυνθούν και να περάσουν στη μονόκλωνη μορφή τους.
3. **Υβριδισμός εκκινητών (annealing):** Η θερμοκρασία μειώνεται στους 48°C ώστε οι εκκινητές να προσδεθούν στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-εκμαγείου. Η ακριβής θερμοκρασία και ο χρόνος αυτού του σταδίου εξαρτώνται από το ζεύγος των εκκινητών που έχουν επιλεγεί.
4. **Επιμήκυνση (elongation/extension):** Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 72°C, η οποία είναι και η ιδανική για τη λειτουργία της πολυμεράσης. Σε αυτό το στάδιο γίνεται η σύνθεση της

συμπληρωματικής αλυσίδας DNA από το εκμαγείο, και ο χρόνος εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος της αλληλουχίας DNA που θα ενισχυθεί.

5. **Τελική επιμήκυνση (final elongation):** Το βήμα αυτό χρησιμοποιείται ώστε να διασφαλιστεί ότι θα ολοκληρωθούν όσα μονόκλινα τμήματα μπορεί να έχουν απομείνει στο μείγμα με το πέρας τον κύκλων.
6. **Διατήρηση (pause):** Ο θερμοκυκλοποιητής παραμένει αυτόματα σε θερμοκρασία 16°C μετά το πέρας όλων των προηγούμενων σταδίων, για την προσωρινή αποθήκευση των δειγμάτων μέχρι την απομάκρυνσή τους από το μηχάνημα.
 - * Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης T_m του εκκινητή που υπολογίζεται από τον τύπο: $69.3 + 0.41 * GC\% - 650 / \text{αριθμό βάσεων εκκινητή}$. Το συνολικό T_m της αντίδρασης, καθορίζεται ώστε να είναι χαμηλότερο και από τα δύο T_m ταυτοχρόνως.
 - * Ο χρόνος επιμήκυνσης εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA που ενισχύεται με βάση τις συγκεκριμένες προδιαγραφές της θερμοανθεκτικής πολυμεράσης.

2.4.3 Ανάλυση και απεικόνιση δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA)

2.4.3.1 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης

Η παρατήρηση και ταυτοποίηση τμημάτων DNA πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Κάθε τμήμα DNA είναι εφικτό να αναλυθεί με τη βοήθεια αυτής της τεχνικής. Μια πηκτή αγαρόζης είναι ένα δίκτυο πολυμερών σακχάρων που σχηματίζουν πόρους, μέσω των οποίων τα μόρια του DNA δύνανται να κινούνται δεχόμενα την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Η συγκέντρωση αγαρόζης ρυθμίζει το μέγεθος των πόρων και ποικίλλει ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν. Τα διακριτά τμήματα των νουκλεϊνικών οξέων είναι δυνατόν να εντοπιστούν με υπεριώδη ακτινοβολία, έπειτα από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, ως φθορίζουσες ζώνες.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Ζυγίζεται κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης 2% και προστίθεται σε φιάλη με 1xTBE (Tris/Borate/EDTA).
2. Η φιάλη θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων και αναδεύεται επαρκώς ούτως ώστε να λιώσει η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διαυγές.
3. Προστίθεται στο διάλυμα βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0.005% v/v.

4. Αφού το διάλυμα κρυώσει, τοποθετείται σε ειδικό δοχείο-καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.
5. Έπειτα τοποθετείται κατάλληλη χτένα η οποία καθορίζει το μέγεθος και τον αριθμό των θέσεων των προς ανάλυση δειγμάτων.
6. Η πηκτή αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 30min.
7. Μετά την πήξη απομακρύνεται προσεκτικά η χτένα και το καλούπι με την πηκτή τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιλαμβάνει το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
8. Σε 1.5μl δείγματος προστίθενται 6.5μl dH₂O και πορτοκαλί χρωστικής (orange loading dye) και με τη βοήθεια πιπέτας τοποθετούνται στις ειδικές θέσης της πηκτής.
9. Τέλος, λαμβάνει χώρα η ηλεκτροφόρηση, προσφέροντας στη συσκευή συνεχή τάση 50-120V έως ότου το μέτωπο των μορίων προχωρήσει ικανοποιητικά.
10. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η οπτικοποίηση των μορίων DNA πραγματοποιείται σε ειδικό θάλαμο απεικόνισης πηκτωμάτων που εκπέμπει UV υπεριώδη ακτινοβολία και το πήκτωμα φωτογραφίζεται.

2.4.3.1 Διαλύματα ανάλυσης δεσοξυριβονουκλεϊνικών οξέων (DNA)

Πηκτή αγαρόζης 2%

- 2g αγαρόζης
- 100ml 1xTBE
- 5μl βρωμιούχου αιθιδίου

Τελικός όγκος 100ml

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης

- 100ml 10xTBE
- 900ml ddH₂O

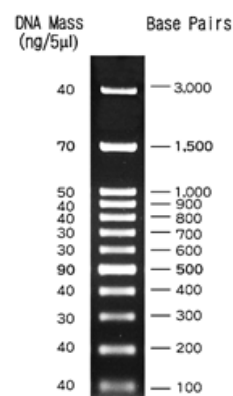
Τελικός όγκος 1000ml

Βρωμιούχο αιθίδιο

- 5mg/ml σε ddH₂O

2.4.3.2 Δείκτης μοριακών βαρών

Για την ορθή κρίση και πρόβλεψη των μεγεθών των τμημάτων DNA που απεικονίζονται στον θάλαμο ανάλυσης πηκτωμάτων, χρησιμοποιείται ο DNA Ladder HT3 RTU της εταιρίας NIPPON Genetics, με ικανότητα διαχωρισμού τμημάτων από 100-3000bp, σε 12 διαφορετικές ζώνες.



2.4.4 Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης

Ο καθαρισμός του τελικού προϊόντος που δόθηκε για αλληλούχιση έγινε με τη μέθοδο εξαγωγής σε πήκτωμα αγαρόζης σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Αρχικά πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση στα 60volt, με όλο το προϊόν της PCR σε πηκτή αγαρόζης (2%) εμποτισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο και πορτοκαλί χρωστική (orange loading dye).
2. Πραγματοποιείται αποκοπή της ζώνης του ενισχυμένου τμήματος ενδιαφέροντος, από το πήκτωμα με ειδικό νυστέρι, επάνω σε τράπεζα UV, και κάθε δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα eppendorf 1,5ml. Εάν δεν υπάρχουν περισσότερες από μία μπάντες εξ αρχής, τότε το δείγμα της PCR μεταφέρεται απ'ευθείας σε σωλήνα eppendorf.
3. Γίνεται προσθήκη 200μl ρυθμιστικού διαλύματος NTI για κάθε 100mg gel αγαρόζης, και το δείγμα επωάζεται στους 50 °C για 40min, αναδεύοντας με Vortex ανά 2-3min μέχρι να διαλυθεί τελείως το τμήμα του gel.
4. Μετά την προσθήκη 700μl δείγματος στην ειδική στήλη NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30'' και το διήθημα απορρίπτεται ώστε να γίνει δέσμευση του DNA στη στήλη.
5. Μετά την προσθήκη 700μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 στη στήλη, ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30s και το διήθημα απορρίπτεται. Σε αυτό το στάδιο, πραγματοποιείται πλύση της μεμβράνης πυριτίου.
6. Το δείγμα φυγοκεντρείται στα 11.000g για 1min για την απομάκρυνση τυχόν καταλοίπων ρυθμιστικού διαλύματος και κυρίως της αιθανόλης που περιέχεται σε αυτό, με επακόλουθη ξήρανση της μεμβράνης πυριτίου.
7. Μετά την προσθήκη 30μl ρυθμιστικού διαλύματος NE στη στήλη ώστε να πραγματοποιηθεί η έκλυση του DNA, το δείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1min και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 11.000g για 1min. Το διήθημα αποθηκεύεται στους -20°C.

2.4.5 Βάσεις Δεδομένων

- NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- BLAST: <http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- AlgaeBase: <http://www.algaebase.org/>
- WoRMS: <http://www.marinespecies.org/>

2.4.6 Προγράμματα ανάλυσης αλληλουχιών & φυλογενετικών δέντρων

Μετά την αλληλούχιση, οι αλληλουχίες στοιχίζονται στο πρόγραμμα CodonCodeAligner και διορθώνονται με βάση το αντίστοιχο χρωματογράφημα που παρέχεται. Μετά το πέρας της διόρθωσης, με τη χρήση της βάσης δεδομένων NCBI και του προγράμματος BLAST, είναι εφικτό να αναγνωρισθεί το γένος και το είδος του υπό μελέτη οργανισμού.

2.4.6.1 Πρόγραμμα PartitionFinder & MrBayes

Για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων στο πρόγραμμα MrBayes, προηγήθηκε η εύρεση του βέλτιστου μοντέλου εξέλιξης του συνόλου των δεδομένων για κάθε δέντρο, με τη χρήση του προγράμματος PartitionFinder (Lanfear *et al.* 2012).

Το MrBayes είναι ένα πρόγραμμα που χρησιμοποιεί τη Μπαγιεσιανή αλληλεπίδραση (Bayesian interference) και επιλογή μοντέλων μέσω ενός ευρέος δικτύου φυλογενετικών και εξελικτικών μοντέλων. Το MrBayes χρησιμοποιεί τη μέθοδο Markov chain Monte Carlo (MCMC) για να υπολογίσει την οπίσθια κατανομή των παραμέτρων του μοντέλου.

2.5 Βιοχημικές αναλύσεις

2.5.1 Ανάλυση χρωστικών

Συγκεκριμένα, οι χρωστικές που μελετήθηκαν είναι οι χλωροφύλλες *a*, *b* και *c*. Η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος για τη μελέτη των χρωστικών είναι η φωτομετρική, όπως αυτή περιγράφεται από τους Parsons *et al.* (1984).

1. 1ml πυκνών καλλιεργειών των υπό μελέτη στελεχών, ηλικίας περίπου ενός μηνός, διηθείται με τη χρήση συσκευής διήθησης υπό κενό, σε φίλτρα γυάλινων μικροϊνών (GFC) Whatman.
2. Στη συνέχεια, τα φίλτρα αυτά τοποθετούνται σε γυάλινους σωλήνες φυγοκέντρου που περιέχουν 5ml διαλύματος ακετόνης 90% και επωάζονται στους -18°C για 24 ώρες.

3. Τα φίλτρα ομογενοποιούνται εντός των σωλήνων φυγοκέντρησης, με τη χρήση γυάλινης ράβδου, και στη συνέχεια φυγοκεντρώνται για 10 λεπτά στις 3000rpm.
4. Το υπερκείμενο φωτομετρείται σε πλαστικές κυψελίδες των 5ml, σε αναλογικό φωτόμετρο Shimadzu UV-120-02. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε καθαρό διάλυμα ακετόνης 90%.

Τα μήκη κύματος στα οποία μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων είναι τα εξής:

- 750nm: έλεγχος, καθώς κανονικά έχουμε μηδενική απορρόφηση χλωροφυλλών
- 664, 647, 630nm: μήκη κύματος που απορροφούν οι χλωροφύλλες

Από τις αρχικές απορροφήσεις που μετρήθηκαν στα διάφορα μήκη κύματος πλην των 750nm, αφαιρέθηκαν οι απορροφήσεις κάθε δείγματος για το μήκος κύματος 750nm και προέκυψαν οι τελικές απορροφήσεις των δειγμάτων.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης χρωστικών στον μετρούμενο όγκο καλλιέργειας έγινε με τη χρήση των παρακάτω εξισώσεων (Parsons *et al.* 1984):

$$Ca = 11.85 * (OD'664) - 1.54 * (OD'647) - 0.08 * (OD'630)$$

$$Cb = 21.03 * (OD'647) - 5.43 * (OD'664) - 2.66 * (OD'630)$$

$$Cc = 24.52 * (OD'630) - 1.67 * (OD'664) - 7.60 * (OD'647)$$

2.5.2 Μελέτη λιπιδικού προφίλ

Η μελέτη του λιπιδικού προφίλ των στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της άμεσης εστεροποίησης των λιπαρών οξέων (Lepage & Roy, 1986). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται περιληπτικά ως εξής:

1. Συγκεκριμένη ποσότητα υγρής καλλιέργειας (8-50ml) διηθείται υπό κενό με φίλτρα GFC, σε τρεις επαναλήψεις (x2) και τα δείγματα διατηρούνται στην κατάψυξη μέχρι την πραγματοποίηση της ανάλυσης.
2. Τα φίλτρα τοποθετούνται σε γυάλινους σωλήνες των 35ml με βιδωτό καπάκι από τεφλόν (SIGMA) και σε αυτά προστίθεται 100μl εσωτερικό δείγμα ελέγχου (internal standard) και συγκεκριμένα το λιπαρό οξύ 19:0, 5ml μίγμα μεθανόλης-τολουόλιο (3:2), καθώς και 5ml ακετυλοχλωρίδιο: μεθανόλης (1:20). Τα δείγματα εμφυσούνται με αέριο άζωτο για την αποφυγή οξειδωσης των λιπαρών οξέων, πωματίζονται και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο βρασμού στους 100°C.

3. Μετά το πέρας μίας ώρας με ταυτόχρονη ανάδευση των σωλήνων ανά 10min, τα δείγματα αφήνονται να κρυώσουν.
4. Στα δείγματα προστίθεται 5ml απιονισμένο νερό και 5ml εξάνιο, φυγοκεντρούνται στις 3000rpm για 10min και συλλέγεται η λιπαρή φάση με πιπέτα (aspiration) σε απλούς σωλήνες των 35ml. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται ακόμη δύο φορές με την προσθήκη 3ml εξανίου αντί για νερό, ώστε να συλλεγεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα εστέρων των λιπαρών οξέων.
5. Η υγρασία της φάσης του εξανίου αφαιρείται φιλτράροντας το δείγμα στην ειδική συσκευή διήθησης έχοντας προσθέσει 1-2g θειικό νάτριο (άνυδρο sodium sulphate) και το δείγμα συλλέγεται στη φλάσκα εξάτμισης.
6. Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων συλλέγονται σε φιαλίδιο αέριας χρωματογραφίας με 1ml οκτάνιο.
7. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C.

Ο διαχωρισμός του προφίλ των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (FAME) πραγματοποιήθηκε σε αέριο χρωματογράφο (GLC Varian 3300, Sugar Land, TX, USA) στο εργαστήριο Διατροφής & Παθολογίας Υδρόβιων Οργανισμών στο Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) του Αγίου Κοσμά Αττικής.

2.5.4 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (TLC) με χρήση πλακιδίων silica gel

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (Thin-layer chromatography ή TLC) είναι η τεχνική χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται στον διαχωρισμό μη πτητικών μειγμάτων. Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος εκτελείται σε μια πλάκα από γυαλί, πλαστικό, ή φύλλο αργιλίου, που επικαλύπτεται με μια λεπτή στρώση από προσροφητικό υλικό, συνήθως διοξειδίου του πυριτίου, οξειδίου του αργιλίου, ή κυτταρίνης. Αφού το δείγμα έχει εφαρμοστεί στην πλάκα, ένας διαλύτης ή μείγμα διαλυτών ανέρχεται στην πλάκα μέσω τριχοειδούς κίνησης. Επειδή διαφορετικές αναλυόμενες ουσίες ανεβαίνουν στο πλακίδιο TLC με διαφορετικούς ρυθμούς, επιτυγχάνεται διαχωρισμός και κατ' επέκτασιν συλλογή των επιθυμητών λιπαρών οξέων.

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της προόδου μιας αντίδρασης, την ταυτοποίηση των υφιστάμενων ενώσεων σε ένα δεδομένο μείγμα και τον καθορισμό της καθαρότητας μιας ουσίας.

Στην παρούσα ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν τα Nano-SIL-20 [0.20mm (10 x 10cm)] της εταιρείας Macherey-Nagel.

1. Αρχικά, τοποθετούνται στο γυάλινο θάλαμο 50ml διαλύματος εξανίου/διεθυλεθέρα 1:1 για να πραγματοποιηθεί ενεργοποίηση των TLC πλακιδίων σιλικόνης.
2. Δύο πλακίδια τοποθετούνται κάθετα στις δύο πλευρές του θαλάμου για 30min, έως ότου το διάλυμα καλύψει όλη την επιφάνεια των πλακιδίων.
3. Στη συνέχεια, τα πλακίδια τοποθετούνται σε μεταλλικό σκεύος με την εμποτισμένη επιφάνεια προς τα επάνω και τοποθετούνται σε κλίβανο στους 110°C για 1h.
4. Μετά το πέρας της 1h, τα πλακίδια αφήνονται να κρυώσουν σε ξηραντήρα και ακολουθεί εφαρμογή του δείγματος στη βάση του πλακιδίου με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας Pasteur.
5. Το δείγμα αφήνεται έπειτα να διαχωριστεί στον θάλαμο επώασης, με 50ml διαλύματος εξανίου/διεθυλεθέρα/οξικού οξέος σε συγκέντρωση 50:20:2.
6. Η πλάκα αφαιρείται με προσοχή από τον θάλαμο, πριν το μέτωπο του διαλύτη φτάσει την κορυφή.
7. Η επιθυμητή ζώνη σημειώνεται κατά την εξαγωγή του πλακιδίου από τον θάλαμο και αυτό αφήνεται να στεγνώσει.
8. Με τη χρήση νυστεριού, απομακρύνεται η επιφάνεια σιλικόνης στο επιθυμητό σημείο και το δείγμα τοποθετείται σε γυάλινο σωλήνα φυγοκέντρου.
9. Στο σωλήνα τοποθετείται 1.5ml διαλύματος εξανίου/BHT (0.05%w/v) ώστε να αποχωριστούν τα λιπαρά οξέα από τη σιλικόνη.
10. Το δείγμα συλλέγεται με τη βοήθεια σύριγγας και επανατοποθετείται σε φιαλίδιο αέριας χρωματογραφίας.
1. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C και στη συνέχεια εφαρμόστηκαν σε αέριο χρωματογράφο (GLC Varian 3300, Sugar Land, TX, USA) σύμφωνα τους (Fountoulaki et al. 2009). Η ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε με την σύγκριση του χρόνου συγκράτησης του κάθε λιπαρού οξέως με τον αντίστοιχο χρόνο μείγματος προτύπου (Supelco 37 Component FAME Mix standard USA), ενώ η ποσοτικοποίηση με την χρήση εσωτερικού προτύπου 19:0 (methyl nonadecanoate) γνωστής συγκέντρωσης (0.1mg/μl).

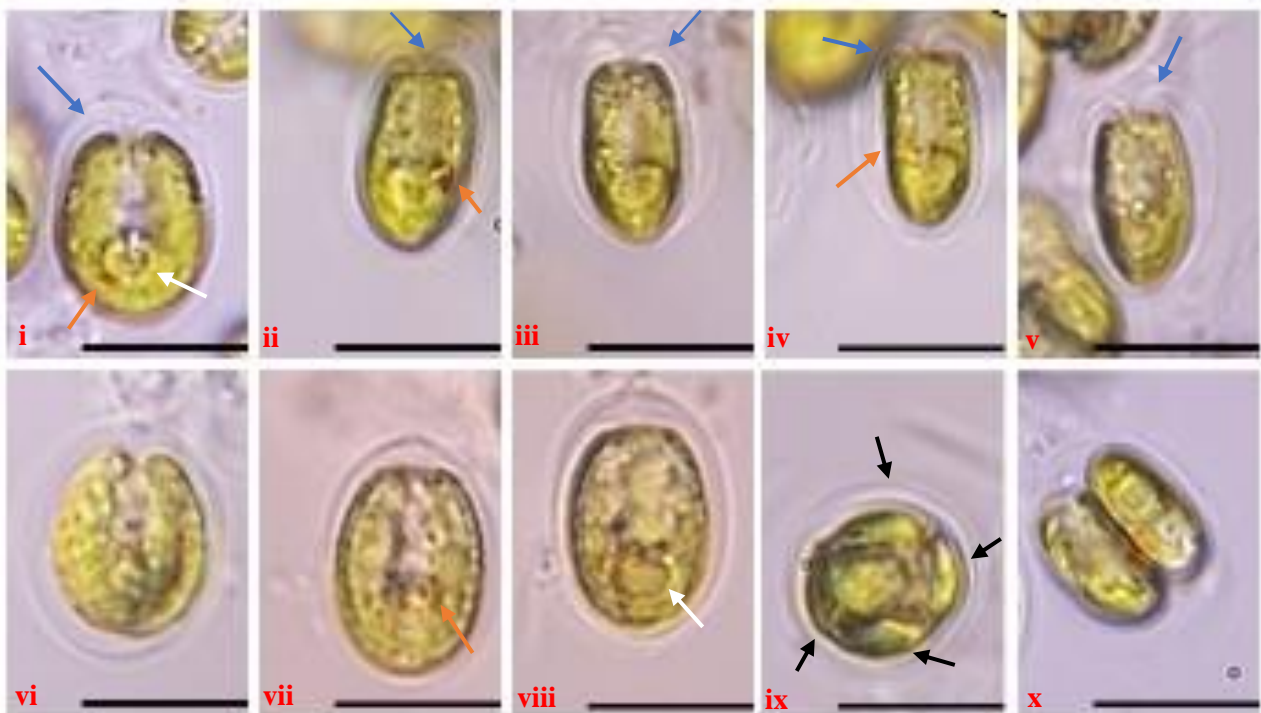
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μορφολογική ανάλυση

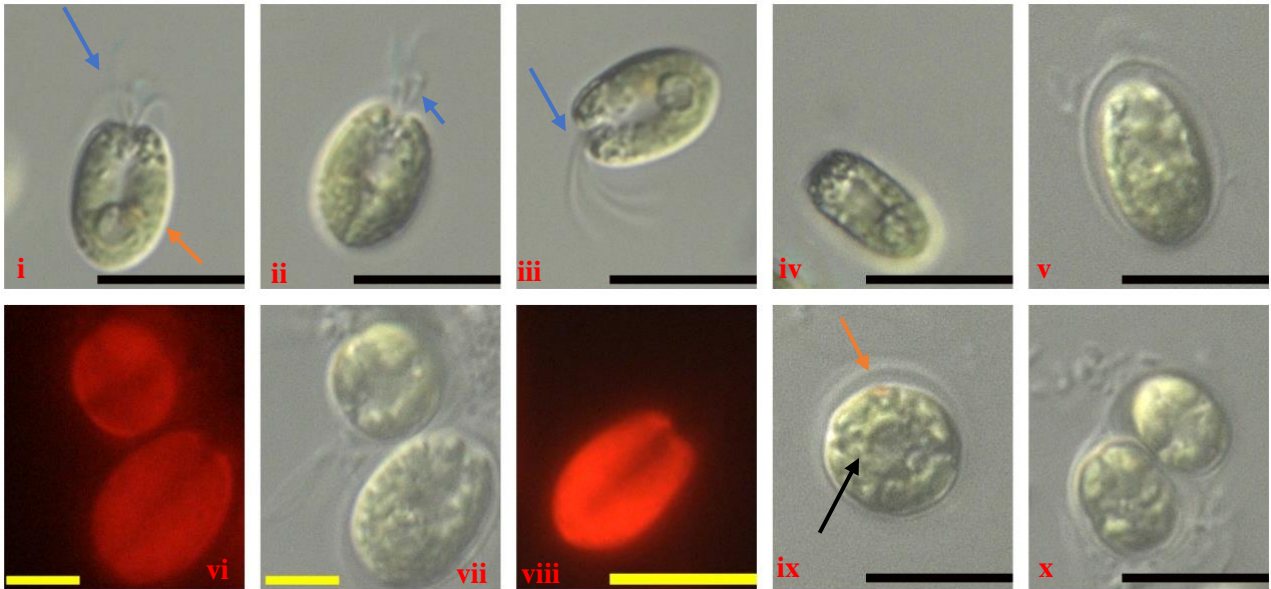
3.1.1 Στελέχη με μαστίγια

Τα στελέχη επιβιώνουν σε αλατότητα 40‰. Το χρώμα των κυττάρων είναι κίτρινο προς πράσινο. Το σχήμα των κυττάρων είναι ωοειδές, ελαφρώς συμπιεσμένο, 11-15 μm x 5-10μm. Τα μαστίγια στα κινητά κύτταρα είναι τέσσερα και εξέρχονται από φανερό βοθρίο. Το πυρηνοειδές φαίνεται τοποθετημένο στο κατώτερο ήμισυ του κυττάρου, όχι κοντά στο κέντρο και είναι ευδιάκριτο, σφαιροειδές. Η οφθαλμική κηλίδα εμφανίζεται κοντά στο πυρηνοειδές, συνήθως σε πλευρική θέση. Ο χλωροπλάστης είναι σχήματος U, μεγάλος και αποτελείται από τέσσερις λοβούς οι οποίοι είναι διακριτοί από την κατώτερη και την ανώτερη όψη του κυττάρου. Τα κύτταρα περιβάλλονται από θήκη.

3.1.1.1 Στέλεχος Cyp1_1

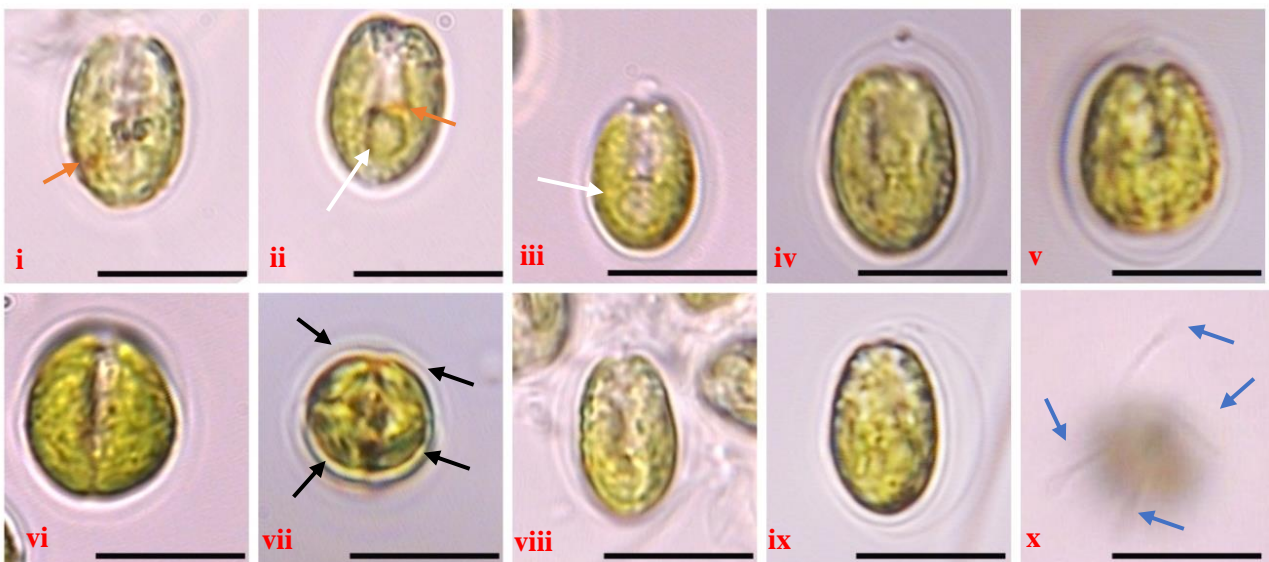


Εικόνα 3.1: [Οπτικό μικροσκόπιο]. Στην εικόνα i καταδεικνύονται με βέλη βασικοί χαρακτήρες στο ευρύ τμήμα του κυττάρου, όπως τα δύο εκ των τεσσάρων μαστίγιων (μπλε), το στρογγυλό πυρηνοειδές (λευκό) και η οφθαλμική κηλίδα (πορτοκαλί). Οι εικόνες ii-v αποτελούν διαφορετικές πλευρές των κυττάρων στις οποίες υποδεικνύονται τα μαστίγια και η οφθαλμική κηλίδα, όπου αυτή διακρίνεται. Οι εικόνες vi-viii αποτελούν κύτταρα τα οποία έχουν χάσει τα μαστίγια τους (resting cells). Η εικόνα ix αποτελεί την κάτω πλευρά του κυττάρου, στην οποία φαίνονται οι τέσσερις λοβοί που αποτελούν τον χλωροπλάστη και η x είναι μια χαρακτηριστική εικόνα κυττάρων σε διαίρεση. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10μm.



Εικόνα 3.2: [Μικροσκοπία Nomarski]. Στις εικόνες i-iii απεικονίζονται κύτταρα στην ευρεία πλευρά σε κίνηση με τα τέσσερα μαστίγια (μπλε). Οι εικόνες iv-v απεικονίζουν κύτταρα τα οποία έχουν χάσει τα μαστίγια τους (resting cells) σε πλευρικές όψεις. Οι εικόνες vi & vii αποτελούν το ίδιο στιγμιότυπο, τραβηγμένο με φθορισμό και άνευ φθορισμού. Διαφαινονται οι τέσσερις λοβοί του χλωροπλάστη από εγκάρσια όψη του κυττάρου (επάνω) καθώς και οι δύο από την πλάγια άποψη (κάτω). Η εικόνα viii αποτελεί επίσης εικόνα φθορισμού από πλάγια όψη του χλωροπλάστη. Στην εικόνα ix φαίνεται το ανώτερο μέρος του κυττάρου από το οποίο εξέρχονται τα μαστίγια (μαύρο), η οπτική κηλίδα (πορτοκαλί) και οι τέσσερις λοβοί του χλωροπλάστη. Η εικόνα x απεικονίζει τη διαίρεση κυττάρων, με εγκάρσια λήψη, όπου φαίνονται το άνω και το κάτω μέρος του κυττάρου. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10 μ m (vi & vii: 5 μ m)

3.1.1.2 Στέλεχος Cyp2_1

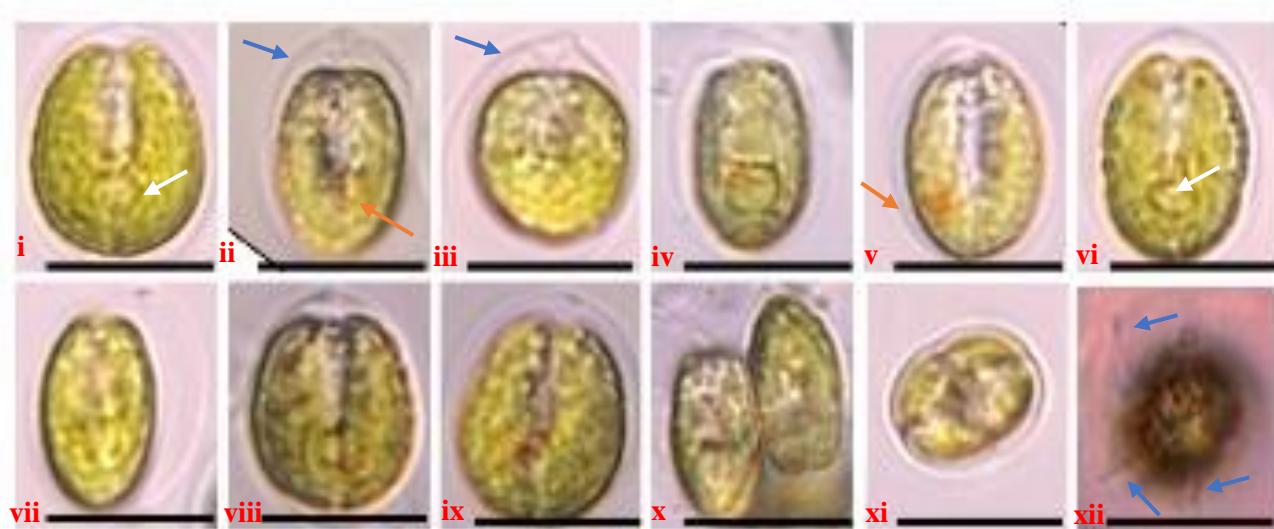


Εικόνα 3.3: [Οπτικό μικροσκόπιο]. Στην εικόνα i-ix απεικονίζονται διάφορες ευρείες (i-v) και στενές (vii-ix) όψεις των κυττάρων χωρίς μαστίγια. Με βέλη τονίζονται το πυρηνοειδές (λευκό) και η οφθαλμική κηλίδα (πορτοκαλί). Η εικόνα vii αποτελεί την κάτω πλευρά του κυττάρου, όπου φαίνονται πλαγίως οι τέσσερις λοβοί που αποτελούν τον χλωροπλάστη. Στην εικόνα x φαίνονται τα τέσσερα μαστίγια του κυττάρου (μπλε) σε κίνηση, τα οποία είναι προσκολλημένα στην καλυπτρίδα. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10 μ m.

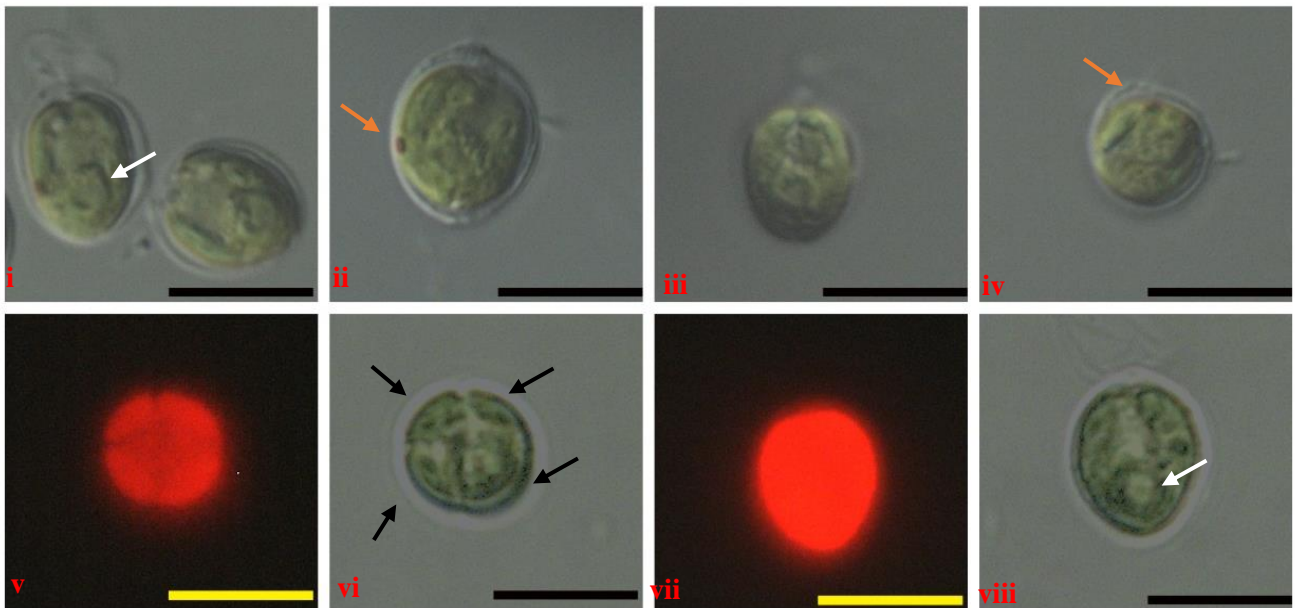


Εικόνα 3.4: [Μικροσκοπία Nomarski]. Στις εικόνες i,iv,v απεικονίζονται κύτταρα στην ευρεία πλευρά χωρίς μαστίγια. Οι εικόνες ii, iii, vi, viii απεικονίζουν κινητά κύτταρα των οποίων τα μαστίγια (μπλε) είναι διακριτά. Οι εικόνες vi & vii αποτελούν το ίδιο στιγμιότυπο, σε λήψη με φθορισμό και άνευ φθορισμού, όπου φαίνεται η πλάγια όψη με τους δύο λοβούς του χλωροπλάστη. Οι εικόνες viii & ix αποτελούν το ίδιο στιγμιότυπο σε λήψη με φθορισμό και άνευ φθορισμού. Στην εικόνα x φαίνεται το ανώτερο μέρος του κυττάρου και οι τέσσερις λοβοί του χλωροπλάστη. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10μm.

3.1.1.3 Στέλεχος Cyp9_1

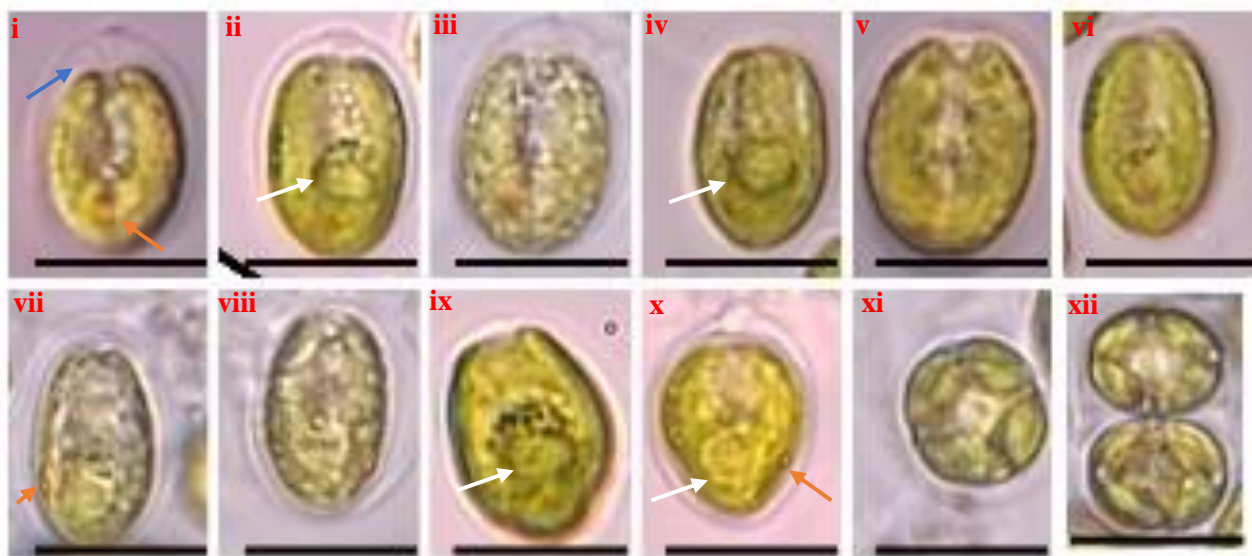


Εικόνα 3.5: (Οπτικό μικροσκόπιο). Στην εικόνα i-ix απεικονίζονται διάφορες ευρείες και στενές όψεις των κυττάρων με μαστίγια (μπλε) και άνευ μαστιγίων. Με βέλη τονίζονται το πυρηνοειδές (λευκό) και η οφθαλμική κηλίδα (πορτοκαλί). Η εικόνα xi αποτελεί την άνω πλευρά του κυττάρου, όπου διακρίνονται οι τέσσερις λοβοί που αποτελούν τον χλωροπλάστη. Στην εικόνα xii φαίνονται τα τέσσερα μαστίγια κυττάρου σε κίνηση, τα οποία είναι προσκολλημένα στην καλυπτρίδα. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10μm.

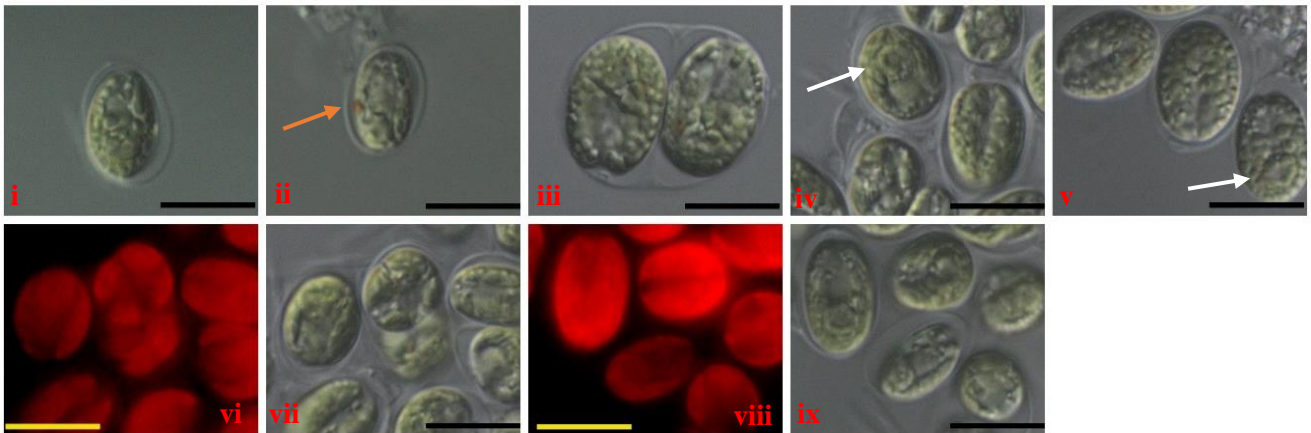


Εικόνα 3.6: [Μικροσκοπία Nomarski]. Στις εικόνες i-iv απεικονίζονται διαφορετικές όψεις των κυττάρων, όπου και σημειώνονται τα διακριτά τους χαρακτηριστικά, όπως το πυρηνοειδές (λευκό) και η οφθαλμική κηλίδα (πορτοκαλί). Οι εικόνες v & vi αποτελούν το ίδιο στιγμιότυπο, σε λήψη με φθορισμό και άνευ φθορισμού, όπου φαίνεται το κατώτερο μέρος του κυττάρου και οι τέσσερις λοβοί του χλωροπλάστη. Οι εικόνες vii & viii αποτελούν το ίδιο στιγμιότυπο με την πλάγια όψη του χλωροπλάστη σε λήψη με φθορισμό και άνευ φθορισμού. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10μm.

3.1.1.4 Στέλεχος Cyp10_1

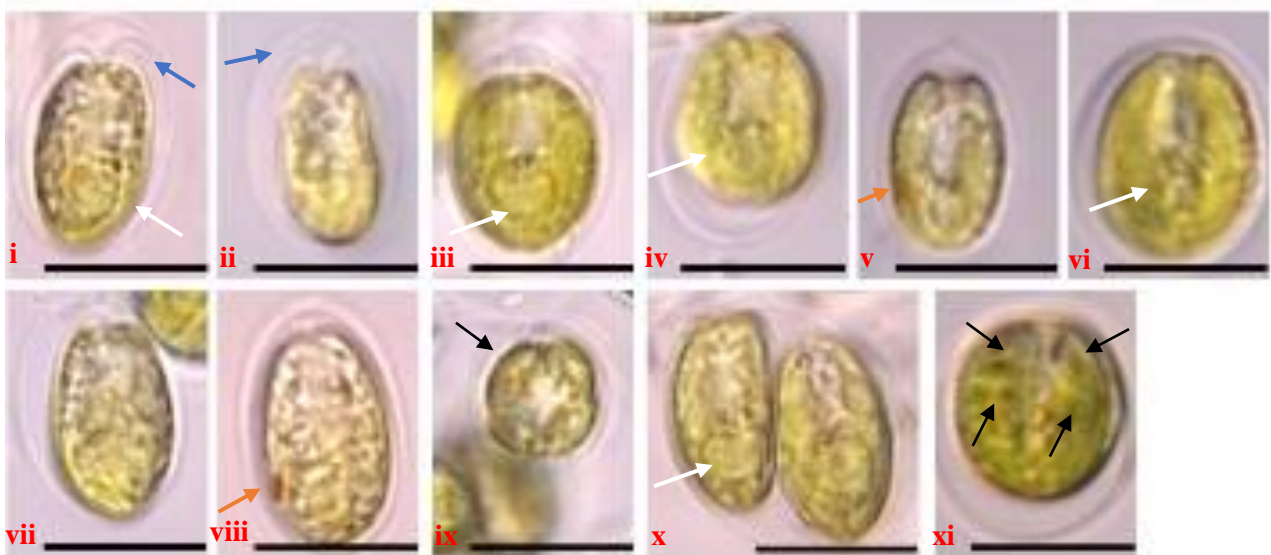


Εικόνα 3.7: [(Οπτικό μικροσκόπιο)]. Στην εικόνα i-ix απεικονίζονται διάφορες ευρείες (i-vi, ix, x) και στενές (vii, viii) όψεις των κυττάρων με μαστίγια (μπλε) και άνευ μαστιγίων. Με βέλη τονίζονται το πυρηνοειδές (λευκό), τα μαστίγια (μπλε) και η οφθαλμική κηλίδα (πορτοκαλί). Η εικόνα xi αποτελεί την άνω πλευρά του κυττάρου, στην οποία διακρίνονται οι τέσσερις λοβοί που αποτελούν τον χλωροπλάστη. Η εικόνα xii απεικονίζει τη διαίρεση κυττάρων, σε εγκάρσια λήψη και όπου φαίνονται το άνω και το κάτω μέρος του κυττάρου. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10μm.

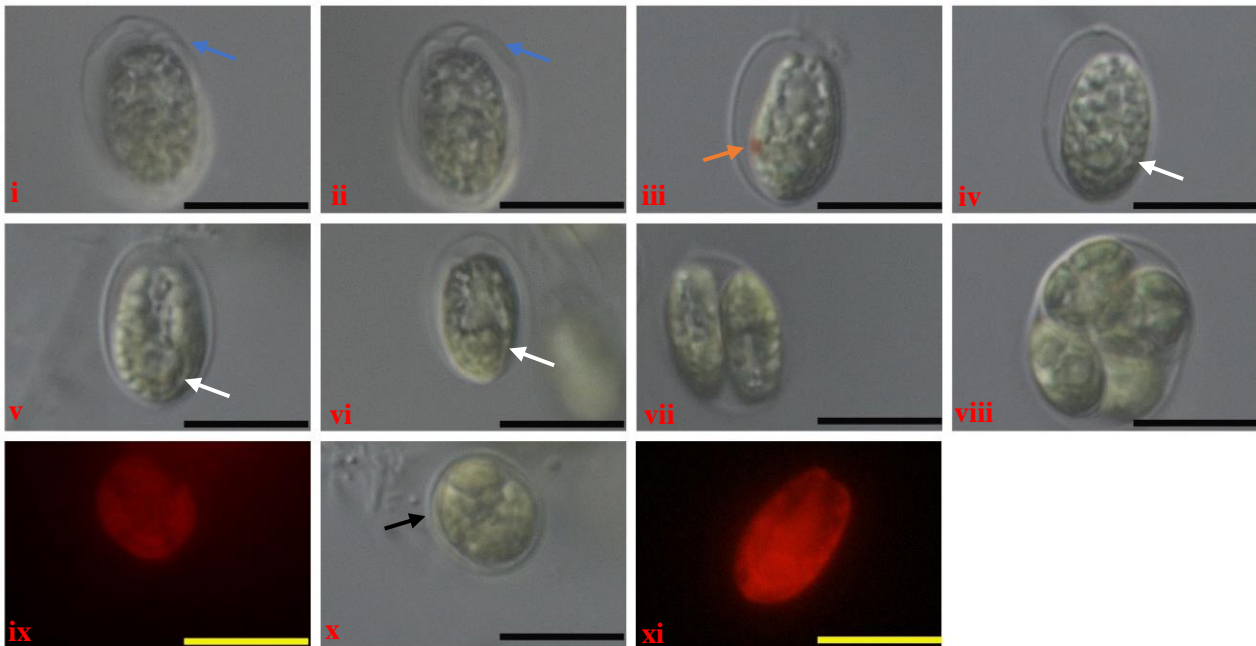


Εικόνα 3.8: [Μικροσκοπία Nomarski]. Στις εικόνες i-iv απεικονίζονται διαφορετικές όψεις των κυττάρων, όπου και σημειώνονται τα διακριτά τους χαρακτηριστικά, όπως το πυρηνοειδές (λευκό) και η οφθαλμική κηλίδα (πορτοκαλί). Τα κύτταρα δεν έχουν μαστίγια. Οι εικόνες vi & vii αποτελούν το ίδιο στιγμιότυπο, σε λήψη με φθορισμό και άνευ φθορισμού, όπου φαίνεται το ανώτερο μέρος του κυττάρου και οι τέσσερις λοβοί του χλωροπλάστη. Οι εικόνες viii & ix αποτελούν το ίδιο στιγμιότυπο με πλάγιες όψεις του χλωροπλάστη σε λήψη με φθορισμό και άνευ φθορισμού. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10μm.

3.1.1.5 Στέλεχος Cyp18_1

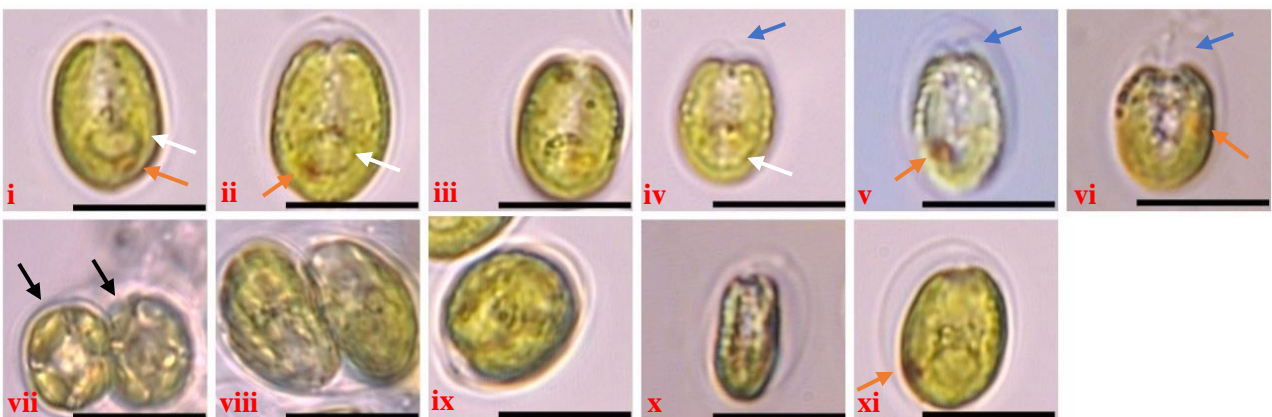


Εικόνα 3.9: [(Οπτικό μικροσκόπιο).] Στην εικόνα i-ix απεικονίζονται διάφορες ευρείες (i, iii-vi) και στενές (ii, vii, viii) όψεις των κυττάρων με μαστίγια (μπλε) και άνευ μαστιγίων. Με βέλη τονίζονται το πυρηνοειδές (λευκό), τα μαστίγια (μπλε), η οφθαλμική κηλίδα (πορτοκαλί) και οι λοβοί του χλωροπλάστη (μαύρο). Η εικόνα ix αποτελεί την άνω πλευρά του κυττάρου, σε εγκάρσια λήψη όπου διακρίνονται οι τέσσερις λοβοί που αποτελούν τον χλωροπλάστη, όπως και στην εικόνα ix. Η εικόνα x απεικονίζει τη διαίρεση κυττάρων. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10μm.

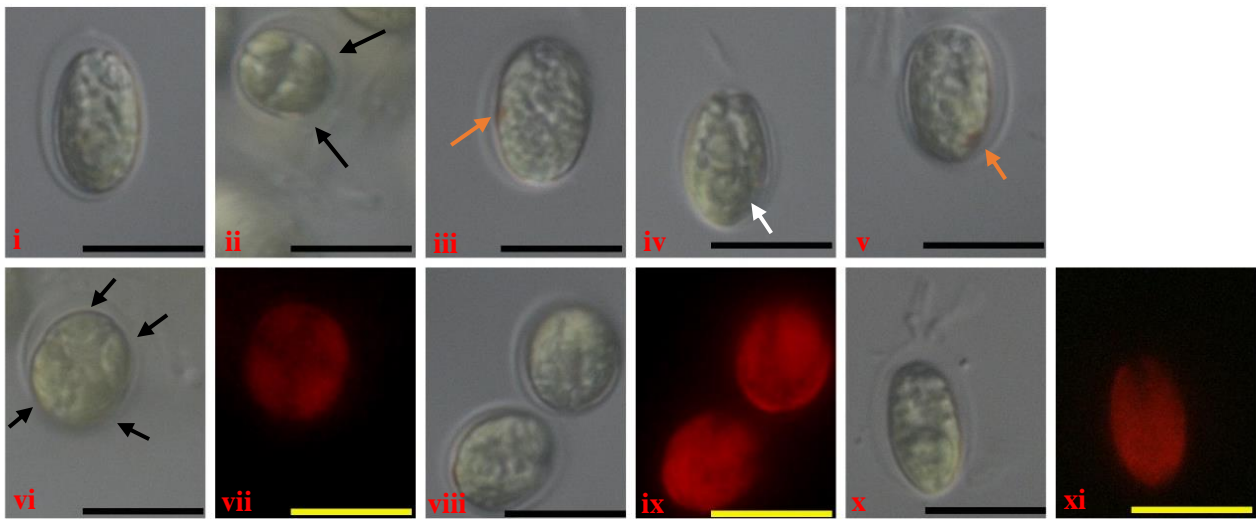


Εικόνα 3.10: [Μικροσκοπία Nomarski]. Στις εικόνες i-iv απεικονίζονται διαφορετικές όψεις των κυττάρων, όπου και σημειώνονται τα διακριτά τους χαρακτηριστικά, όπως το πυρηνοειδές (λευκό), η οφθαλμική κηλίδα (πορτοκαλί), οι λοβοί του χλωροπλάστη (μαύρο) και τα μαστίγια (μπλε). Η εικόνα vii αποτελεί μια φάση διαίρεσης των κυττάρων σε πλάγια στενή όψη. Στην εικόνα viii απεικονίζονται επίσης κύτταρα που διαιρούνται. Οι εικόνες ix & x αποτελούν το ίδιο στιγμιότυπο, σε λήψη με φθορισμό και άνευ φθορισμού, όπου φαίνεται το κατώτερο μέρος του κυττάρου και οι τέσσερις λοβοί του χλωροπλάστη. Η εικόνα xi αποτελεί φωτογράφιση φθορισμού όπου φαίνεται πλάγια όψη του χλωροπλάστη με δύο εκ των τεσσάρων λοβών. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10μm.

3.1.1.6 Στέλεχος Cyp19_1

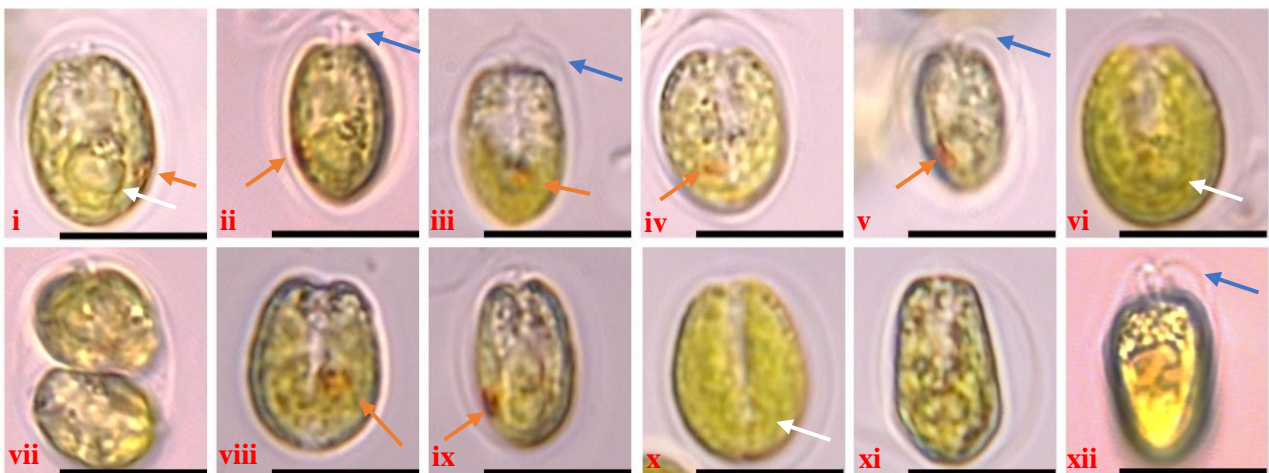


Εικόνα 3.11: [Οπτικό μικροσκόπιο]. Στις εικόνες i-vi καταδεικνύονται με βέλη βασικοί χαρακτήρες στο ευρύ τμήμα του κυττάρου, όπως τα δύο εκ των τεσσάρων μαστίγιων (μπλε), το σφαιρικό πυρηνοειδές (λευκό) και η οφθαλμική κηλίδα (πορτοκαλί). Οι εικόνες vii & viii αποτελούν εικόνες διαίρεσης των κυττάρων, από την εγκάρσια επάνω όψη όπου φαίνονται οι τέσσερις λοβοί που αποτελούν τον χλωροπλάστη και από την πλάγια όψη αντιστοίχως. Η εικόνα x αποτελεί φωτογράφιση της στενής όψης του κυττάρου. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10μm.

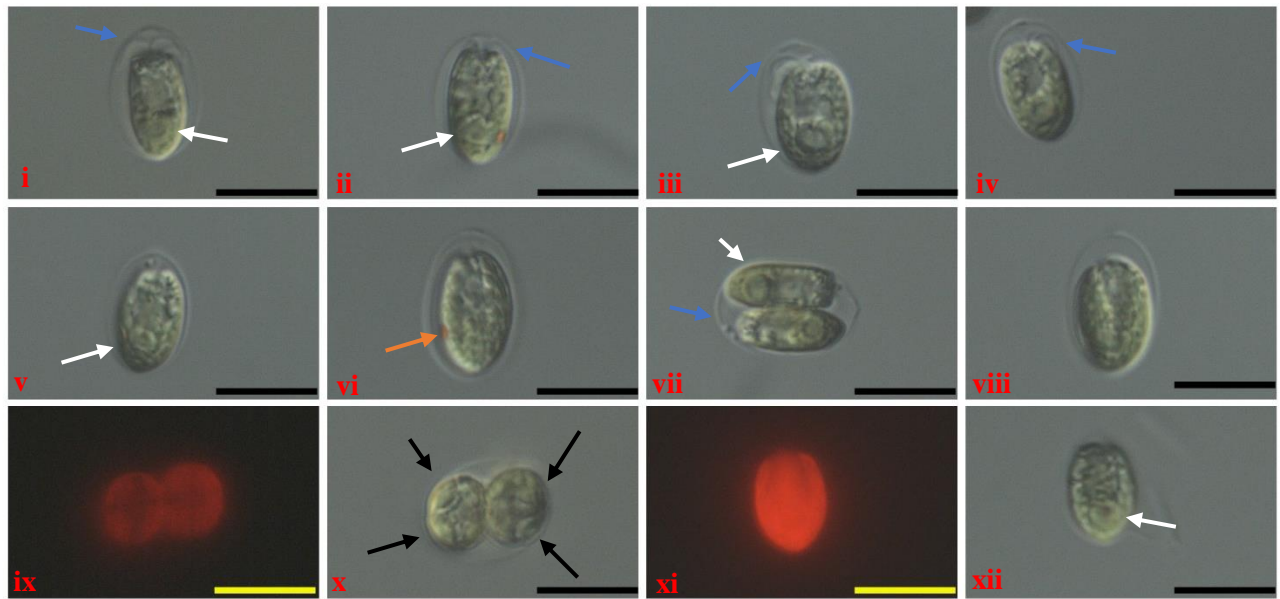


Εικόνα 3.12: [Μικροσκοπία Nomarski]. Στις εικόνες i-iv απεικονίζονται διαφορετικές όψεις των κυττάρων, όπου σημειώνονται με βέλη τα διακριτά τους χαρακτηριστικά, όπως το πυρηνοειδές (λευκό), η οφθαλμική κηλίδα (πορτοκαλί), οι λοβοί του χλωροπλάστη (μαύρο). Τα κύτταρα στις εικόνες έχουν χάσει τα μαστίγια τους. Οι εικόνες vi & vii αποτελούν το ίδιο στιγμιότυπο, σε λήψη με φθορισμό και άνευ φθορισμού, όπου φαίνεται το κάτω μέρος του κυττάρου και οι τέσσερις λοβοί του χλωροπλάστη. Οι εικόνες viii & ix αποτελούν το ίδιο στιγμιότυπο όπου φαίνεται η πλάγια & εγκάρσια όψη του χλωροπλάστη. Η εικόνα xi απεικονίζει τον χλωροπλάστη, σε λήψη από πλάγια όψη. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10μm.

3.1.1.7 Στέλεχος Cyp28_1

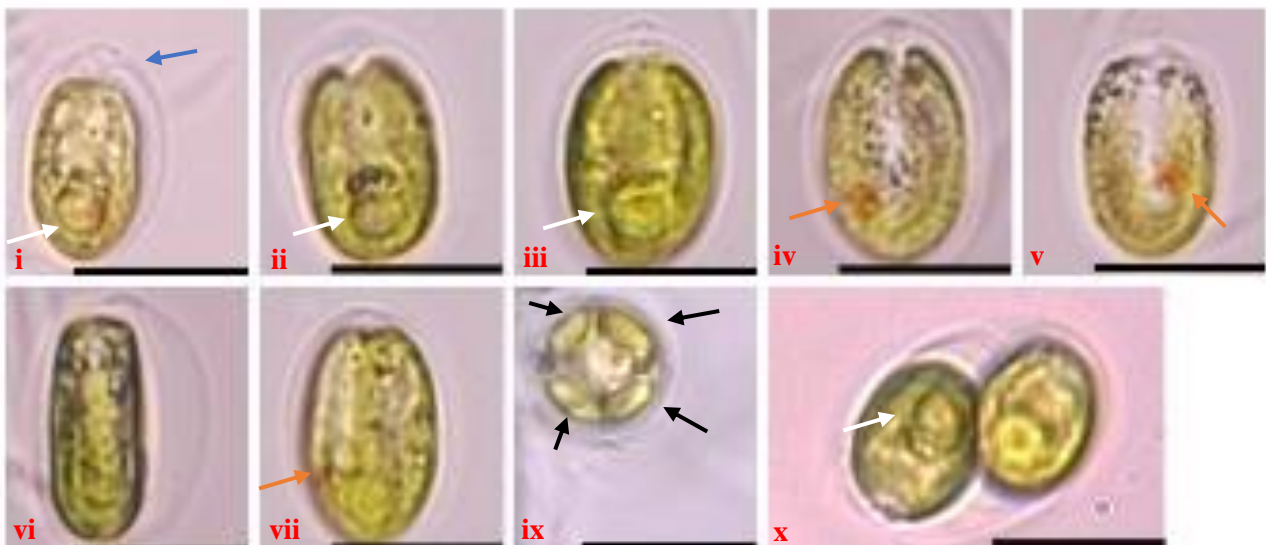


Εικόνα 3.13: [(Οπτικό μικροσκόπιο)]. Στις εικόνες απεικονίζονται διάφορες ευρείες (i, iii, iv, vi, viii, x) και στενές (ii, v, ix, xi, xii) όψεις των κυττάρων με μαστίγια (μπλε) και άνευ μαστιγίων. Με βέλη τονίζονται το πυρηνοειδές (λευκό) και η οφθαλμική κηλίδα (πορτοκαλί). Η εικόνα xi αποτελεί την άνω πλευρά κυττάρων σε διαίρεση, όπου διακρίνονται οι τέσσερις λοβοί που αποτελούν τον χλωροπλάστη. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10μm.

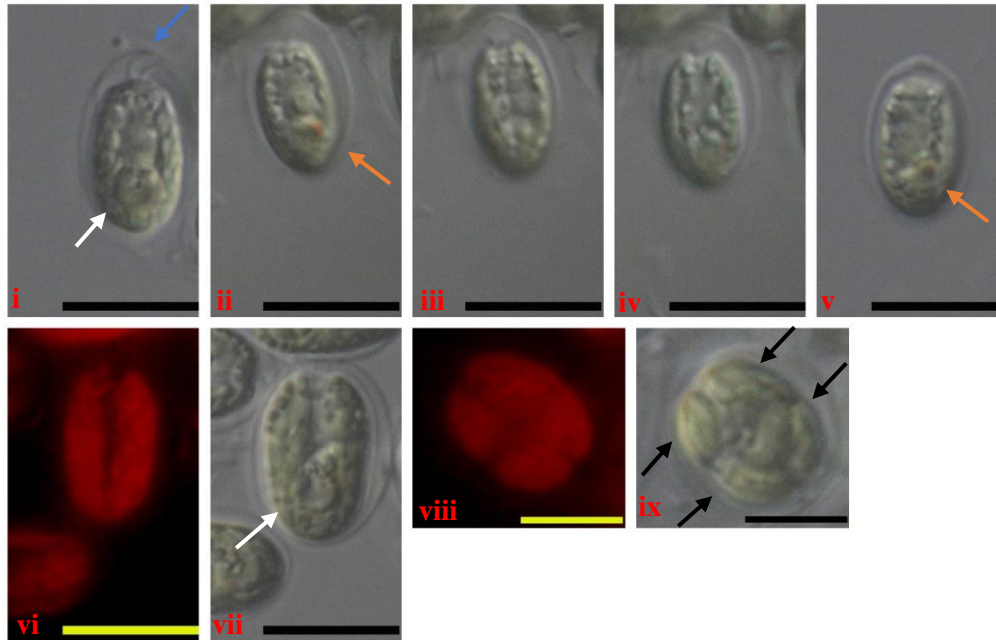


Εικόνα 3.14: [Μικροσκοπία Nomarski]. Στις εικόνες i-vi απεικονίζονται κύτταρα σε κίνηση με τα τέσσερα μαστίγια (μπλε). Τονίζονται με βέλη τα βασικά χαρακτηριστικά του κυττάρου, όπως το πυρηνοειδές με λευκό και η οφθαλμική κηλίδα με πορτοκαλί. Η εικόνα vii απεικονίζει τη διαίρεση κυττάρων σε στενή όψη. Οι εικόνες ix & xi αποτελούν το ίδιο στιγμιότυπο, σε λήψη με φθορισμό και άνευ φθορισμού. Διαφαίνονται οι τέσσερις λοβοί του χλωροπλάστη από εγκάρσια όψη του κυττάρου (πάνω) καθώς και οι δύο από την πλάγια άποψη (κάτω) στις εικόνες xi και xii. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10μm.

3.1.1.8 Στέλεχος Leb6_1



Εικόνα 3.15: [(Οπτικό μικροσκόπιο)]. Στην εικόνα i-vii απεικονίζονται διάφορες ευρείες (i-v, vii) και στενές (vi) όψεις των κυττάρων με μαστίγια και άνευ μαστιγίων. Με βέλη τονίζονται το πυρηνοειδές (λευκό), τα μαστίγια (μπλε), η οφθαλμική κηλίδα (πορτοκαλί) και οι λοβοί του χλωροπλάστη (μαύρο). Η εικόνα ix αποτελεί την άνω πλευρά του κυττάρου, σε εγκάρσια λήψη όπου διακρίνονται οι τέσσερις λοβοί που αποτελούν τον χλωροπλάστη. Η εικόνα x απεικονίζει τη διαίρεση κυττάρων. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10μm.

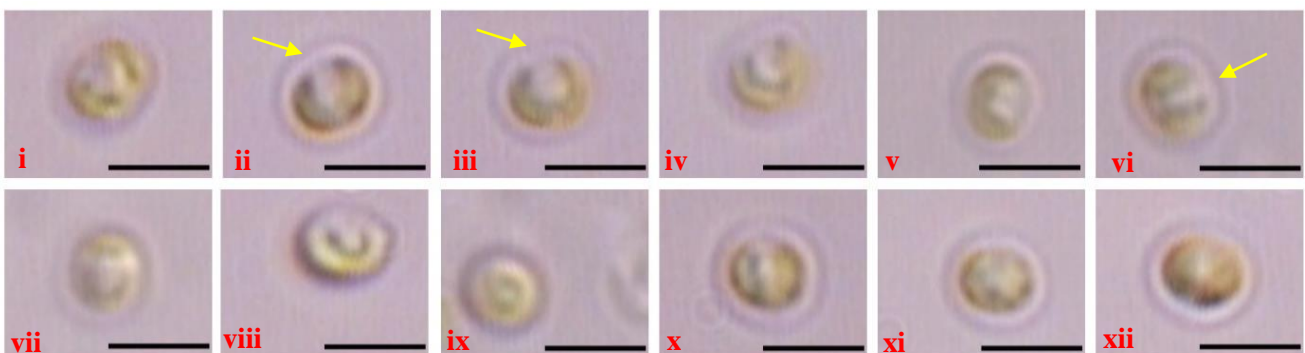


Εικόνα 3.16: [Μικροσκοπία Nomarski]. Στις εικόνες i-vι απεικονίζονται κύτταρα σε κίνηση με τα τέσσερα μαστίγια (μπλε), καθώς και μη κινητά κύτταρα. Τονίζονται με βέλη τα βασικά χαρακτηριστικά του κυττάρου, όπως το πυρηνοειδές με λευκό και η οφθαλμική κηλίδα με πορτοκαλί. Οι εικόνες vi & vii αποτελούν το ίδιο στιγμιότυπο, σε λήψη με φθορισμό και άνευ φθορισμού. Διαφαίνονται οι δύο λοβοί από την πλάγια άποψη, καθώς και στις εικόνες viii και ix οι τέσσερις λοβοί του χλωροπλάστη από εγκάρσια κάτω όψη του κυττάρου. Η κλίμακα των εικόνων είναι 10μm.

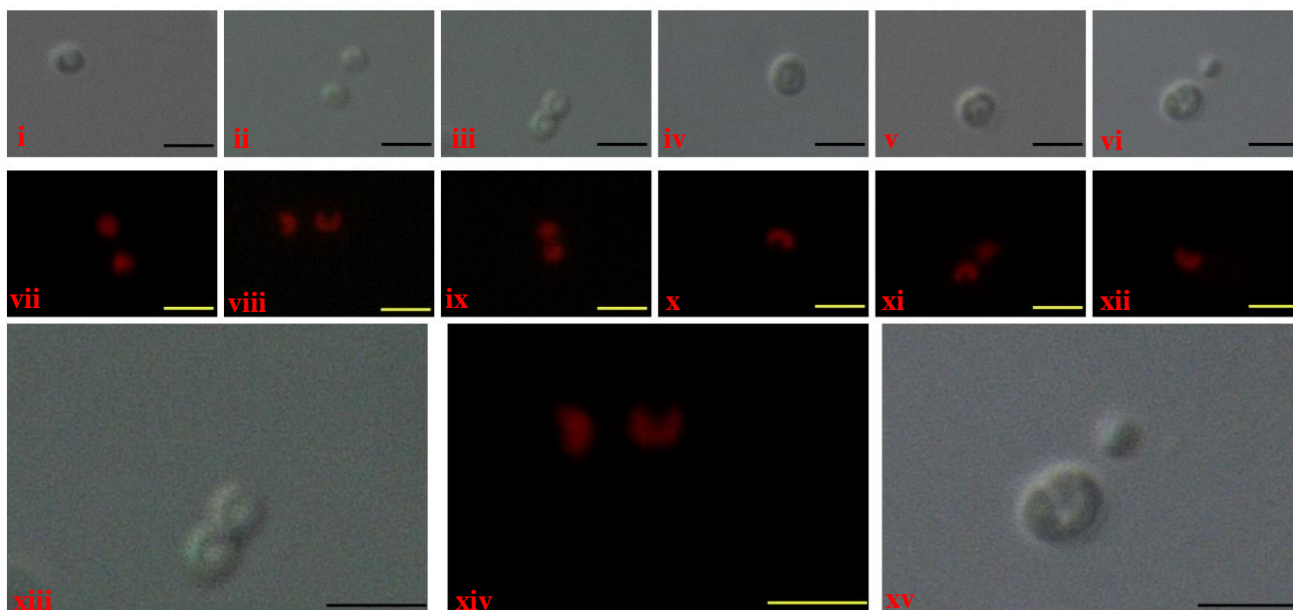
3.1.2 Κοκκοειδή στελέχη

Τα στελέχη επιβιώνουν σε αλατότητα 40‰. Η απόχρωση των κυττάρων είναι κίτρινη προς πράσινη. Το σχήμα των κυττάρων είναι σφαιρικό, ελαφρώς ωοειδές 3-4μm x 2-3μm. Τα κύτταρα δεν έχουν μαστίγια. Ο χλωροπλάστης φαίνεται να είναι ενιαίος και να έχει ημισεληνοειδές σχήμα, καθώς και να καταλαμβάνει περισσότερο από το ήμισυ ολόκληρου του κυττάρου.

3.1.2.1 Στέλεχος Cyp7_1_1

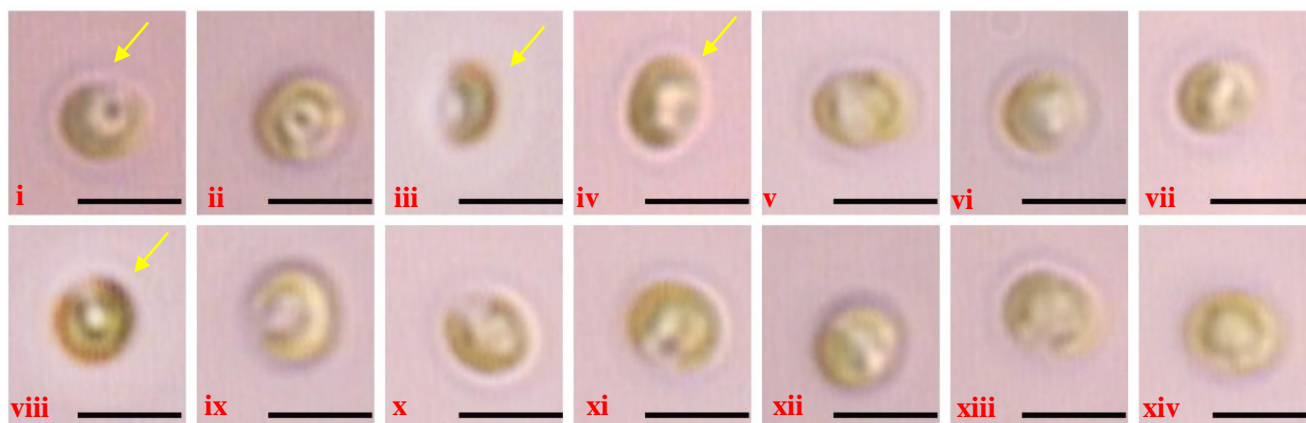


Εικόνα 3.17: [Οπτικό μικροσκόπιο]. Στις εικόνες παρατηρούνται διαφορετικές όψεις και εστιάσεις των κυττάρων, καθώς και το ιδιαίτερο σχήμα του χλωροπλάστη (κίτρινο βέλος). Η κλίμακα των εικόνων είναι 3μm.

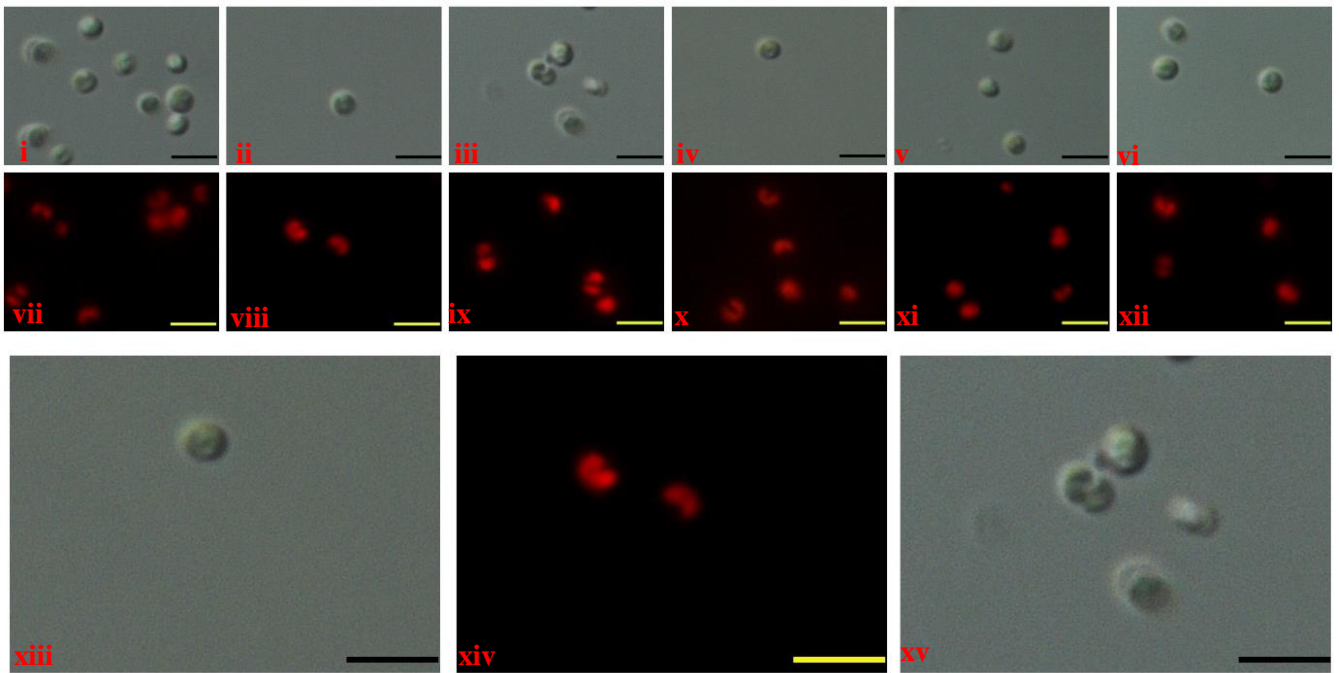


Εικόνα 3.18: [Μικροσκοπία Nomarski]. Στις εικόνες παρατηρούνται διαφορετικές όψεις και εστιάσεις των κυττάρων. Στις εικόνες, τονίζεται επίσης με τη χρήση φθορισμού (vii-xii, xiv) το σχήμα των κυττάρων και ιδιαίτερος του χλωροπλάστη. Οι φωτογραφίες xiii, xiv και xv αποτελούν μεγέθυνση των εικόνων ii, viii και vi αντίστοιχως. Η κλίμακα των εικόνων είναι 5μm.

3.1.2.2 Στέλεχος Leb1_1

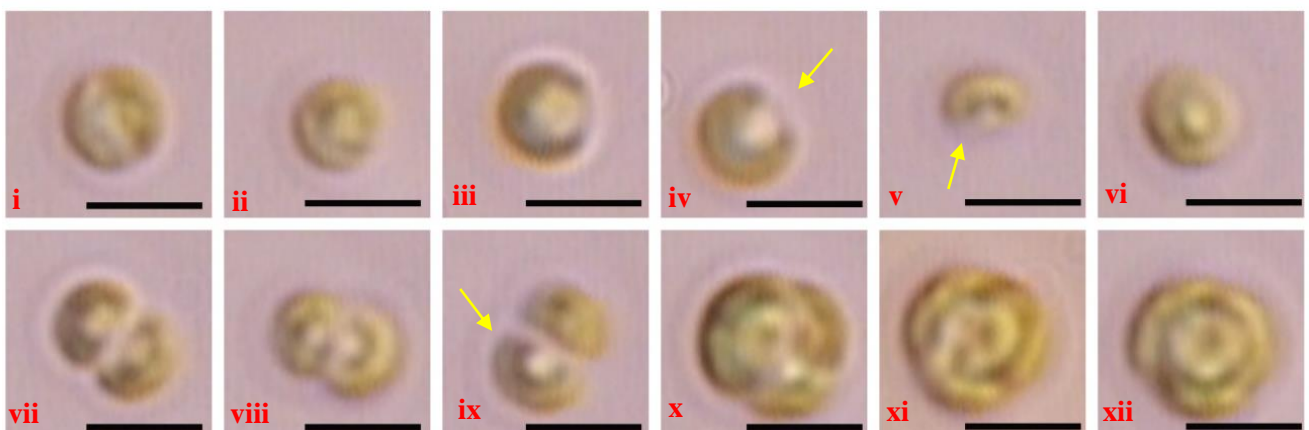


Εικόνα 3.19: [Οπτικό μικροσκόπιο]. Στις εικόνες παρατηρούνται διαφορετικές όψεις και εστιάσεις των κυττάρων, καθώς και το ιδιαίτερο σχήμα του χλωροπλάστη (κίτρινο βέλος). Η κλίμακα των εικόνων είναι 3μm.

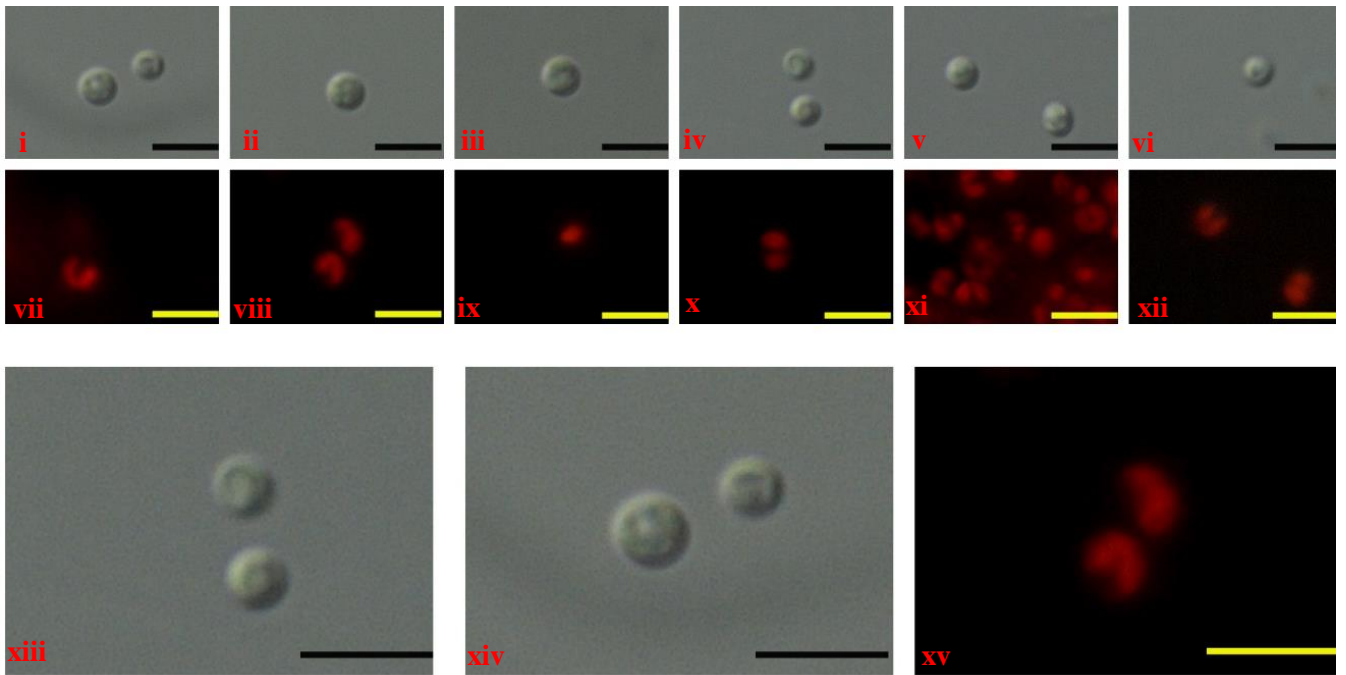


Εικόνα 3.20: [Μικροσκοπία Nomarski]. Στις εικόνες παρατηρούνται διαφορετικές όψεις και εστιάσεις των κυττάρων. Στις εικόνες τονίζεται επίσης με τη χρήση φθορισμού (vii-xii, xiv) το σχήμα των κυττάρων και ιδιαίτερος του χλωροπλάστη. Οι φωτογραφίες xii, xiv και xv αποτελούν μεγέθυνση των εικόνων iv, viii και iii αντιστοίχως. Η κλίμακα των εικόνων είναι 5μm.

3.1.2.3 Στέλεχος Leb4_1_1



Εικόνα 3.21: [Οπτικό μικροσκόπιο]. Στις εικόνες παρατηρούνται διαφορετικές όψεις και εστιάσεις των κυττάρων, καθώς και το ιδιαίτερο σχήμα του χλωροπλάστη (κίτρινο βέλος). Οι εικόνες vii-ix αποτελούν πιθανώς εικόνες διαίρεσης των κυττάρων. Οι εικόνες x-xii αποτελούν πιθανώς διαίρεση κυττάρων, διαφορετική από ό,τι στις εικόνες vii-ix. Η κλίμακα των εικόνων είναι 3μm.

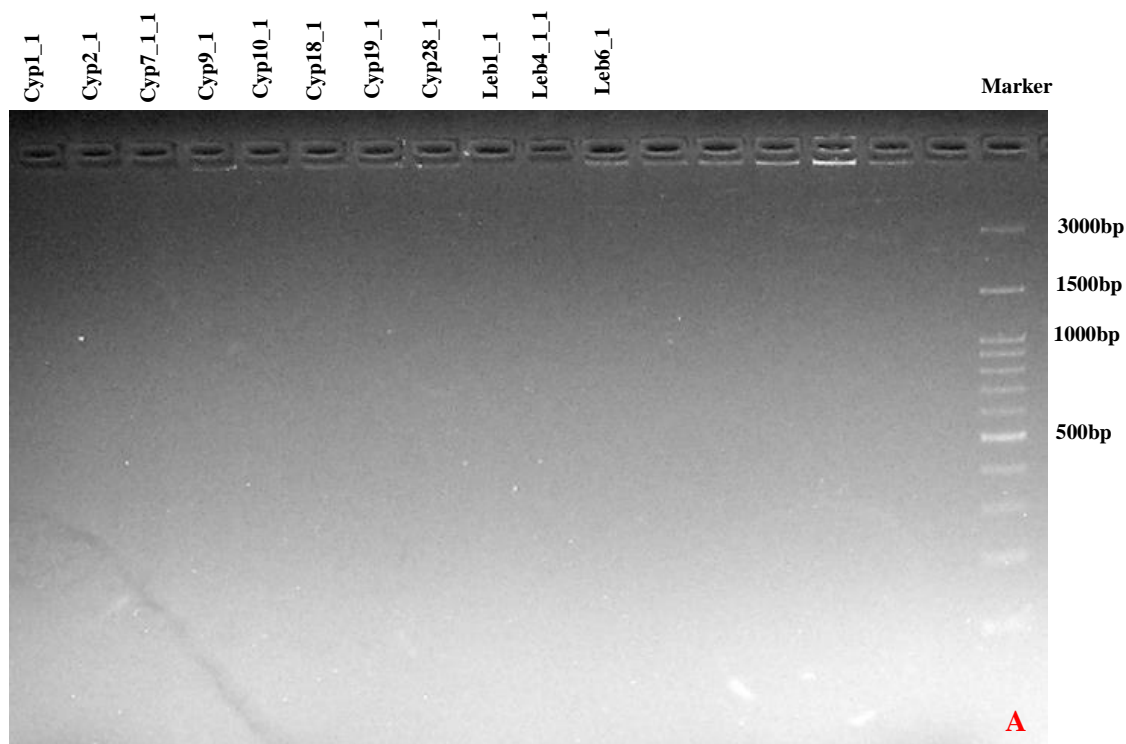


Εικόνα 3.22: [Μικροσκοπία Nomarski] Στις εικόνες παρατηρούνται διαφορετικές όψεις και εστιάσεις των κυττάρων. Στις εικόνες, τονίζεται επίσης με τη χρήση φθορισμού (vii-xii, xv) το σχήμα των κυττάρων και ιδιαίτερα του χλωροπλάστη. Οι φωτογραφίες xiii, xiv και xv αποτελούν μεγέθυνση των εικόνων iv, i και viii αντίστοιχα. Η κλίμακα των εικόνων είναι 5μm.

3.2 Μοριακές αναλύσεις

3.2.1 Εξαγωγή συνολικού γονιδιακού DNA

Πρωταρχικά, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του συνολικού γονιδιώματος των απομονωμένων στελεχών. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με το kit “Genomic DNA from Plants”, της εταιρείας Macherey-Nagel, απευθείας σε υγρό δείγμα καλλιέργειας.



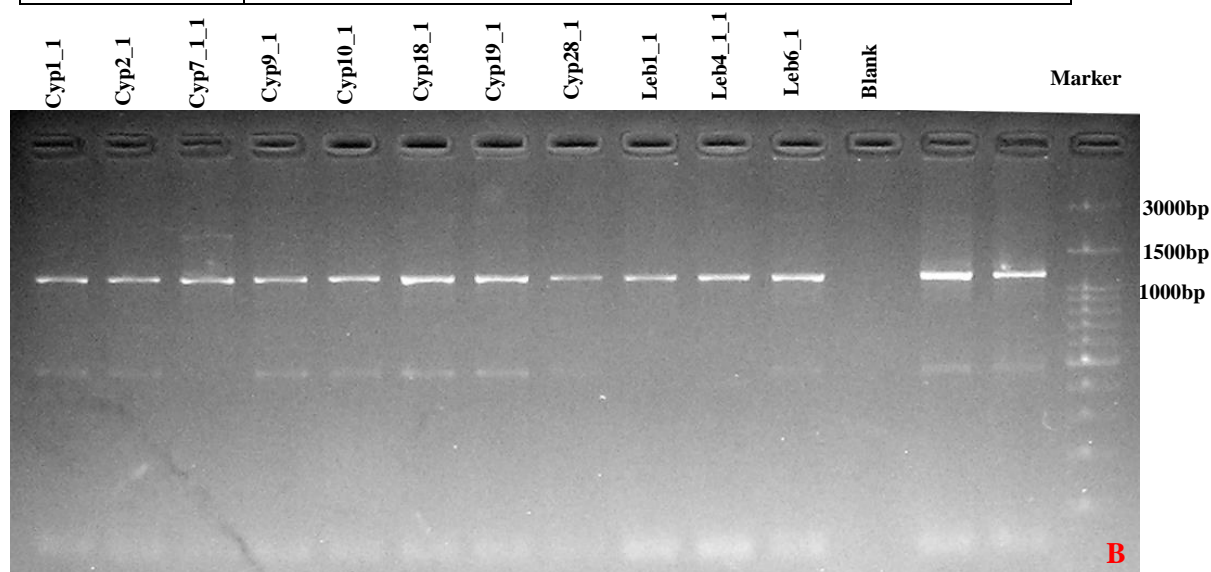
Εικόνα 3.23: [Εξαγωγή ολικού γονιδιωματικού DNA]. Στην εικόνα A απεικονίζεται η απομόνωση του συνολικού γονιδιωματικού DNA από τα επιλεγμένα στελέχη μικροφυκών. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή αραρόζης 2% με 1.5μl DNA.

3.2.2 Ενίσχυση γονιδίων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

3.2.2.1 Ενίσχυση γονιδίου *rbcL* από το συνολικό γονιδίωμα των μικροφυκών

Στη συνέχεια, το γονίδιο *rbcL* ενισχύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τους καθολικά σχεδιασμένους υποκινητές (Daugbjerg *et al.* 1994) από το συνολικό γονιδίωμα καθενός εκ των απομονωμένων στελεχών.

Primers	Sequence
RH-1S	5' ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT 3'
Ce1161R	5' CAT GTG CAA TAC GTG AAT ACC 3'



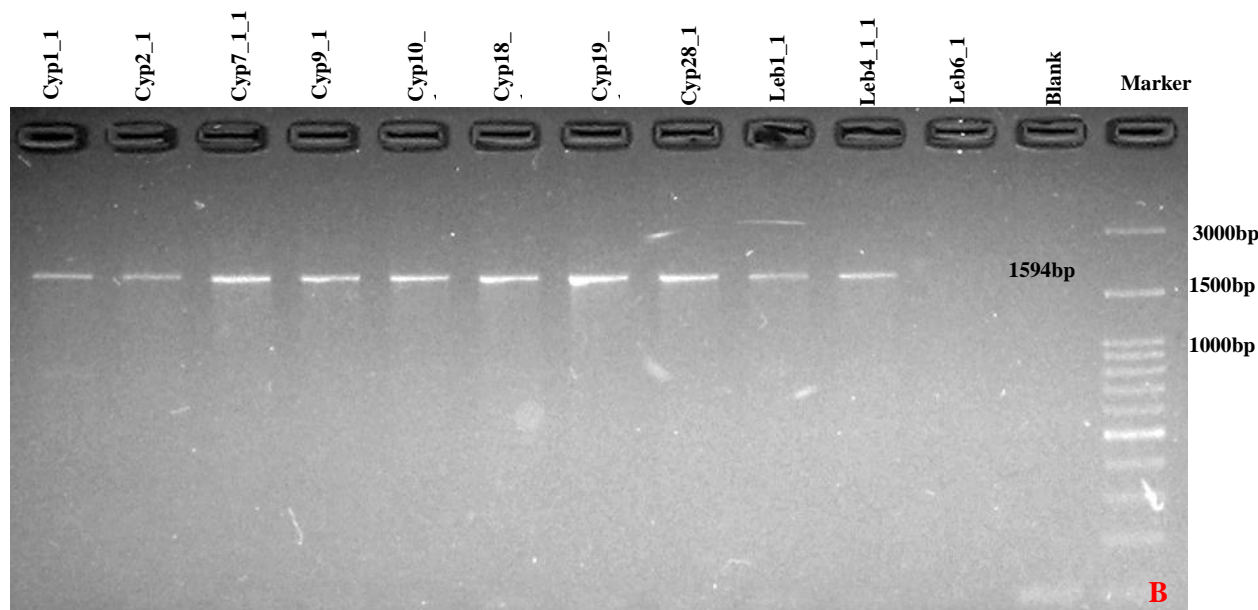
PCR Setup	25 μL	PCR Program		
Taq buffer	2,5	Stage	°C	Time
MgCl ₂	5	Pro-incubation	95	3'
dNTP's	0,5	Denaturation	94	15"
Primer A	1	Annealing	51	1'
Primer B	1	Extension	72	1,5'
K-Taq	0,1	Another Step	72	10'
BSA	2,5	Number of cycles	40	
ddH ₂ O	11,4	Standby temp.	16	

Εικόνα 3.24: [Ενίσχυση του γονιδίου *rbcL* της *RuBisCO*]. Ο πίνακας A απεικονίζει τις ακολουθίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *rbcL* από το συνολικό γονιδίωμα των επιλεγμένων στελεχών. Στην εικόνα B απεικονίζονται τα προϊόντα της PCR όλων των δειγμάτων μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (1.5μl DNA, 2% αгарόζη). Ο πίνακας C αποτελεί το αναλυτικό πρόγραμμα της PCR και αναλυτική καταγραφή των ποσοτήτων του μίγματος. Το αναμενόμενο προϊόν υπολογίστηκε στις 1161bp, όπως και επιβεβαιώνεται από τον δείκτη μοριακών μεγεθών.

3.2.2.2 Ενίσχυση του γονιδίου 18S από το γονιδίωμα των μικροφυκών

Στη συνέχεια, το ριβοσωμικό γονίδιο 18S ενισχύθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τους καθολικά σχεδιασμένους υποκινητές (Romari & Daniel Vaultot, 2004) από το συνολικό γονιδίωμα των στελεχών.

Primers	Sequence
Euk328f	5'-ACC TGG TTG ATC CTG CCA G-3'
Euk329r	5'-TGA TCC TTC YGC AGG TTC AC-3'



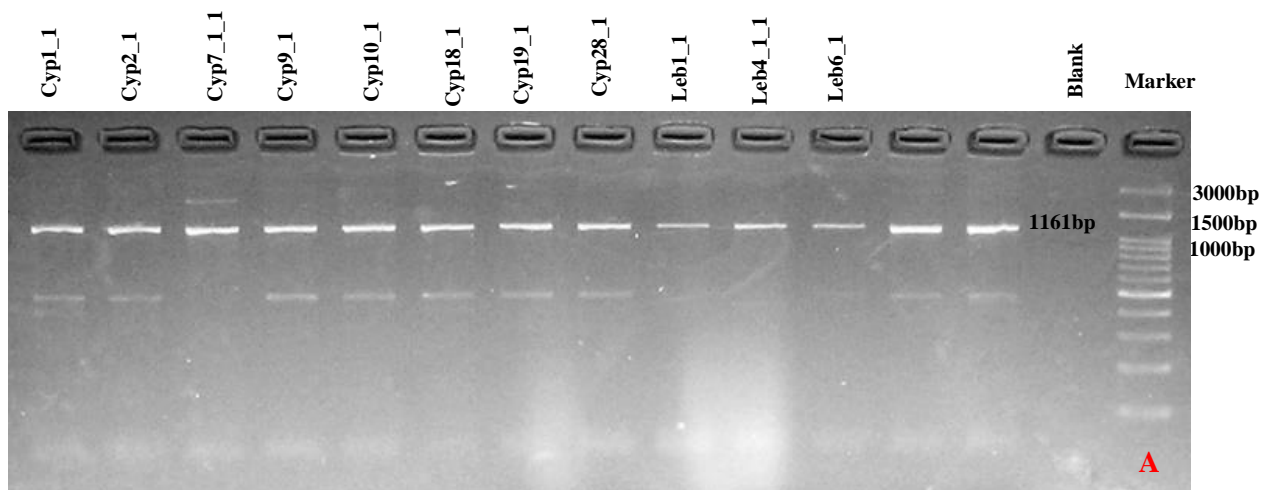
PCR Setup	25 μ L	PCR Program		
		Stage	$^{\circ}$ C	Time
Taq buffer	2,5	Pro-incubation	95	15'
MgCl ₂	1,5	Denaturation	95	1'
dNTP's	0,5	Annealing	57	1,5'
Primer A	1,5	Extension	72	1,5'
Primer B	1,5	Another Step	72	10'
K-Taq	0,1	Number of cycles	34	
BSA	2,5	Standby temp.	16	
ddH ₂ O	13,9			

Εικόνα 3.25: [Ενίσχυση του ριβοσωμικού γονιδίου 18S]. Ο πίνακας A απεικονίζει τις ακολουθίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου 18S από το συνολικό γονιδίωμα των επιλεγμένων στελεχών. Στην εικόνα B απεικονίζονται τα προϊόντα της PCR όλων των δειγμάτων μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (1.5 μ l DNA, 2% αгарόζη). Ο πίνακας C αποτελεί το αναλυτικό πρόγραμμα της PCR και αναλυτική καταγραφή των ποσοτήτων του μίγματος. Το αναμενόμενο προϊόν υπολογίστηκε στις 1594bp, όπως και επιβεβαιώνεται από τον δείκτη μοριακών μεγεθών.

3.2.3 Καθαρισμός προϊόντων PCR προς αλληλούχιση

3.2.3.1 Γονίδιο *rbcl*

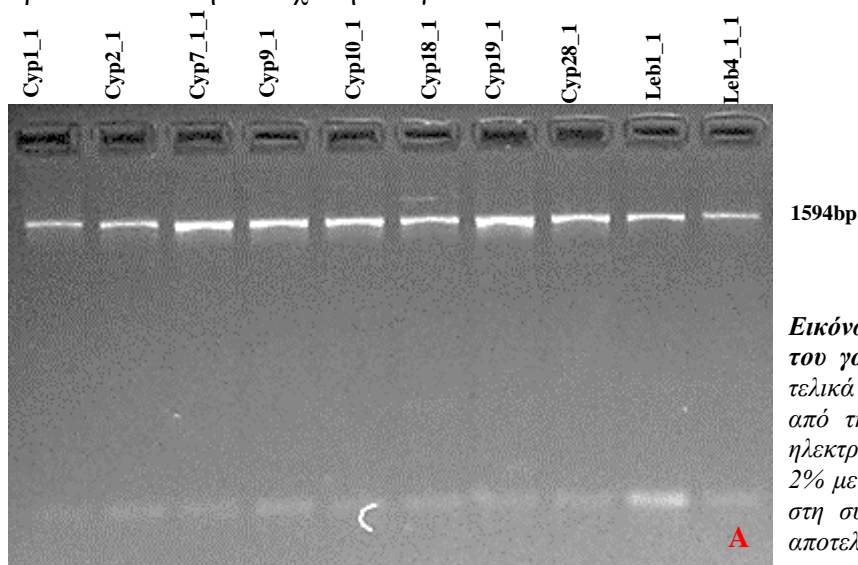
Μετά την ορθή απεικόνιση των αναμενόμενων μεγεθών στην πηκτή αγαρόζη, πραγματοποιήθηκε μία δεύτερη αντίδραση PCR, υπό τις ίδιες συνθήκες, της οποία τα προϊόντα για κάθε διαφορετικό στέλεχος, ενώθηκαν με τα αρχικά. Ο συνολικός όγκος για κάθε προϊόν, καθαρίστηκε με τη χρήση του πρωτόκολλου του kit ‘‘NucleoSpin Gel and PCR Clean-up’’, της εταιρίας Macherey-Nagel.



*Εικόνα 3.26: [Καθαρισμός τελικών προϊόντων PCR του γονιδίου *rbcl*]. Στην εικόνα A, απεικονίζονται τα τελικά προϊόντα PCR των επιλεγμένων στελεχών, έπειτα από την ένωση δύο αντιδράσεων και καθαρισμό. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 2% με 1.5μl DNA. Τα 11 δείγματα δόθηκαν προς αλληλούχιση.*

3.2.3.2 Γονίδιο 18S

Η ίδια διαδικασία όπως περιγράφεται παραπάνω, πραγματοποιήθηκε και για τα δείγματα που είχαν προέλθει από την ενίσχυση του γονιδίου 18S.



*Εικόνα 3.27: [Καθαρισμός τελικών προϊόντων PCR του γονιδίου 18S]. Στην εικόνα A, απεικονίζονται τα τελικά προϊόντα PCR των επιλεγμένων στελεχών, έπειτα από την ένωση δύο αντιδράσεων και καθαρισμό. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 2% με 1.5μl DNA. Το στέλεχος *Leb6_1* δεν αναφέρεται στη συγκεκριμένη ανάλυση, επειδή απέτυχε να δώσει αποτελέσματα.*

3.2.4 *In silico* ανάλυση αποτελεσμάτων

3.2.4.1 Επεξεργασία αλληλουχιών με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής

Οι αλληλουχίες επιβεβαιώθηκαν με τη βοήθεια των χρωματογραφημάτων που κατεδείκνυαν την ύπαρξη της αντίστοιχης νουκλεοτιδικής βάσης σε κάθε θέση. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος CodonCodeAlligner, από το οποίο και εξήχθησαν οι τελικές αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για την περαιτέρω φυλογενετική ανάλυση. Ο συνολικός αριθμός βάσεων για κάθε στέλεχος, αναγράφονται στον Πίνακα 1.

Απομονωμένα στελέχη	Μήκος αλληλουχίας rbcL	Μήκος αλληλουχίας 18S
Cyp1_1	1013bp	1576bp
Cyp2_1	1014bp	1578bp
Cyp7_1_1	1035bp	1582bp
Cyp9_1	974bp	1575bp
Cyp10_1	1014bp	1585bp
Cyp18_1	913bp	1578bp
Cyp19_1	942bp	1580bp
Cyp28_1	923bp	1580bp
Leb1_1	908bp	1574bp
Leb4_1_1	1032bp	1575bp
Leb6_1	1028bp	-

Πίνακας 3. 1: Ο συνολικός αριθμός βάσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τις φυλογενετικές αναλύσεις για τα υπό μελέτη στελέχη μετά τη διόρθωση των αλληλουχιών στο CodonCodeAlligner.

3.2.4.2 Ανάλυση αλληλουχιών με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής

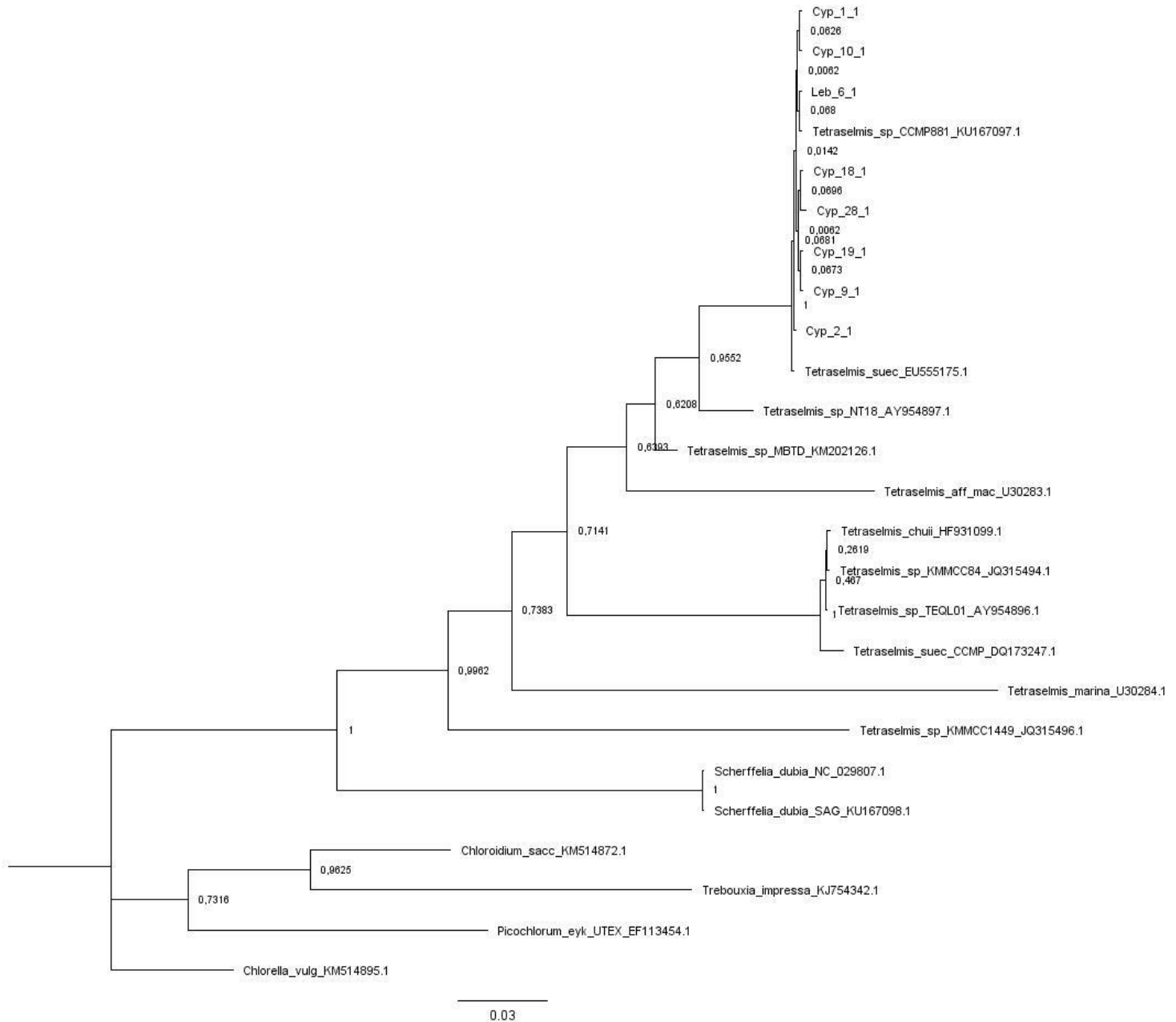
Στη συνέχεια, με βάση τις τελικές αλληλουχίες των στελεχών, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική έρευνα στη βάση δεδομένων NCBI BLAST, όπου σε σύγκριση με όλες τις κατατεθειμένες αλληλουχίες, εμφανίστηκαν αποτελέσματα με βάση το ποσοστό υψηλότερης ομοιότητας (>98%). Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν, μεταξύ άλλων, για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων. Δημιουργήθηκαν συνολικά τέσσερα φυλογενετικά δέντρα, ένα για κάθε γονίδιο και ένα για κάθε κλάση στην οποία ανήκουν τα υπό μελέτη στελέχη. Το σύνολο δεδομένων, εκτός από αλληλουχίες με υψηλό βαθμό ομοιότητας, περιελάμβανε και κατατεθειμένες ακολουθίες από είδη μικροφυκών που ανήκουν στην ίδια κλάση με τα υπό μελέτη στελέχη, βάσει μορφολογίας.

3.2.4.3 Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων με τη χρήση του προγράμματος MrBayes

3.2.4.3.1 Κλάση Chlorodendrophyceae

Γονίδιο rbcL

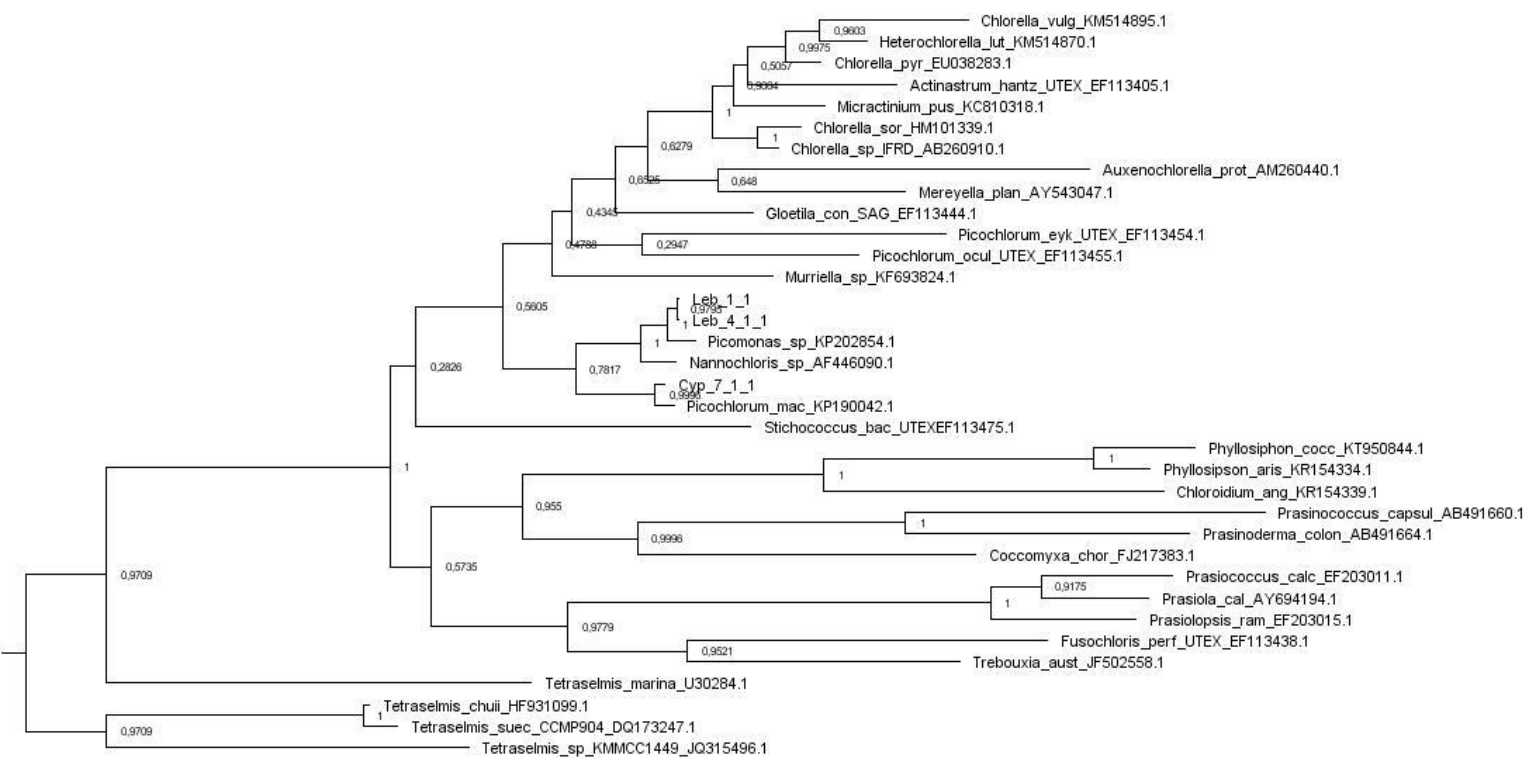
Το δέντρο αναλύθηκε για 2.000.000 γενεές. Η τυπική απόκλιση των συχνοτήτων κατανομής ήταν 0.004428 (<0.01).



Εικόνα 3.28: [Αλληλεπίδραση κατά Bayes της κλάσης των Chlorodendrophyceae με τη χρήση ακολουθιών rbcL]. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν ακολουθίες κατατεθειμένες στη GenBank που παρουσίασαν μεγάλο βαθμό ομοιότητας με τις υπό μελέτη και κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν ονομάστηκαν βάσει του είδους και του κωδικού κατάθεσής τους.

3.2.4.3.2 Κλάση Trebouxiophyceae Γονίδιο rbcL

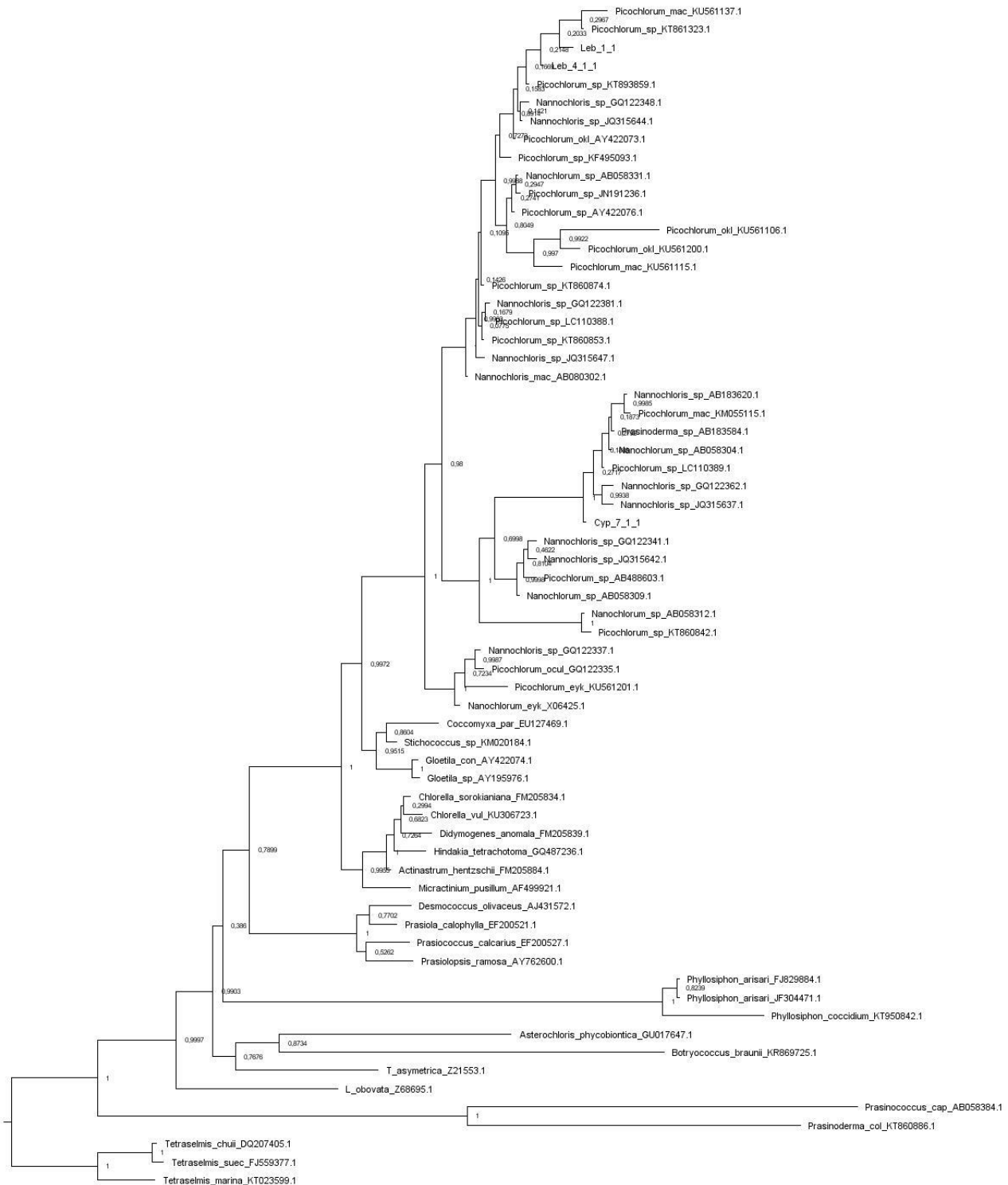
Το δέντρο αναλύθηκε για 8.000.000 γενεές. Η τυπική απόκλιση των συχνοτήτων κατανομής ήταν 0.006327 (<0.01).



Εικόνα 3.30: [Αλληλεπίδραση κατά Bayes της κλάσης των Trebouxiophyceae με τη χρήση ακολουθιών rbcL]. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν ακολουθίες κατατεθειμένες στη GenBank που παρουσίασαν μεγάλο βαθμό ομοιότητας με τις υπό μελέτη και κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν ονομάστηκαν βάσει του είδους και του κωδικού κατάθεσής τους.

Γονίδιο 18S

Το δέντρο αναλύθηκε για 2.000.000 γενεές. Η τυπική απόκλιση των συχνοτήτων κατανομής ήταν 0.005101 (<0.01).



Εικόνα 3.31: [Αλληλεπίδραση κατά Bayes της κλάσης των Trebouxiophyceae με τη χρήση ακολουθιών 18S]. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν ακολουθίες κατατεθειμένες στην GenBank που παρουσίασαν μεγάλο βαθμό ομοιότητας με τις υπό μελέτη ακολουθίες και κοινά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν ονομάστηκαν βάσει του είδους και του κωδικού κατάθεσής τους.

3.5 Βιοχημικές αναλύσεις

3.5.1 Ανάλυση λιπαρών οξέων

Στους Πίνακες 3.2 & 3.3 παρουσιάζονται αναλυτικά οι πίνακες των τιμών των σημαντικότερων λιπαρών οξέων (>1%) που διαπιστώθηκαν στα δείγματα, ως ποσοστό % ξηρού βάρους όπως επίσης και τα ανευρεθέντα άγνωστα λιπαρά οξέα.

	Cyp1_1	Cyp2_1	Cyp9_1	Cyp10_1	Cyp18_1	Cyp19_1	Cyp28_1	Leb6_1
FAME (%)								
14:0	14,55 ± 0,89	4,97 ± 1,35	1,25	4,79 ± 2,05	4,92 ± 0,84	16,18	11,35 ± 7,59	5,08
15:1	9,43 ± 2,44	2,45 ± 1,38	2,65	5,81 ± 1,51	3,29 ± 0,13	2,59	2,88 ± 1,48	8,87
16:0	6,56 ± 1,76	29,43 ± 0,50	34,92	31,21 ± 4,30	26,74 ± 10,77	13,54	22,64 ± 7,64	28,86
16:1n-7	6,48 ± 1,98	1,12 ± 1,10	1,90	3,46 ± 0,49	1,60 ± 0,29			7,27
16:1n-9	2,10 ± 0,66	1,25 ± 1,22		3,59 ± 1,84	1,15 ± 0,33			2,07
?	3,72 ± 0,33			1,14 ± 0,35		4,95	4,23 ± 4,88	0,65
16:2n-4 (?)			1,44		4,19 ± 3,44			
?					1,92 ± 0,98			
17:0		1,25 ± 0,99			2,66 ±	1,01	1,33 ± 0,12	
16:3	12,15 ± 2,60	3,59 ± 0,49	1,44	3,83 ± 1,26	11,39 ± 4,78	14,56	1,04 ± 0,08	4,44
?								4,75
16:4n-3		1,54 ± 0,49	2,91	2,93 ± 2,36			2,97 ± 1,99	
16:4n-1 (?)		1,70 ± 1,56			2,13 ± 1,18	2,50		
18:0	3,68 ± 0,31	0,75 ± 0,13	0,47	0,45 ± 10	0,82 ± 0,32	0,38	1,71 ± 1,23	0,72
18:1n-9	1,22 ± 0,82	14,07 ± 0,07	29,37	19,28 ± 4,98	20,52 ± 8,58	7,78	18,42 ± 8,06	11,74
18:1n-7	2,04 ± 1,48	5,95 ± 2,00	3,27	3,98 ± 0,62	2,92 ± 0,41	1,30	2,67 ± 0,24	2,85
18:2n-9	1,34 ± 0,29	2,23 ± 0,98			3,21 ±	1,32	1,11 ±	2,06
18:2n-6		3,41 ± 0,45	4,11	3,39 ± 0,58			4,79 ± 2,85	
18:3n-6			1,26			1,47		
18:3n-3		7,45 ± 1,57	5,88	5,72 ± 2,88			5,23 ± 2,70	7,45
18:4n-3			2,17	1,10 ± 0,70		2,60	2,97 ± 2,16	2,03
?	5,25 ± 0,35	2,24 ± 0,93			2,83 ± 2,24	1,61		
20:0								
20:1n-11				1,84 ± 1,40				
20:2n-9	5,03 ± 1,07						3,32	
20:3n-6						2,41		
20:4n-6 (ARA)		3,78 ± 0,69				1,40		
20:3n-3					1,25 ± 1,02			
20:4n-3				2,01 ± 1,93	1,74 ± 0,94			1,46
20:5n-3 (EPA)	7,39 ± 2,87	2,13 ± 0,23	1,06	1,51 ± 0,35		6,11	2,12 ± 0,79	1,86
22:2n-9	7,16 ± 1,03			3,63 ± 2,41	2,47 ± 0,32	5,44		1,40
22:4n-6		1,85 ± 0,11						
22:5n-6	4,20 ± 1,17				2,11	2,38	4,24 ±	
22:5n-3					3,82	1,58		

22:6n-3 (DHA)	3,35 ± 0,24					1,84 ± 0,47	6,74	7,15 ± 1,45	1,66
24:1n-9	3,40 ± 0,65	6,80 ± 0,41	3,18			2,39 ± 1,66			1,34
TFA (mg/g)	133,55 ± 137,19	57,69 ± 12,77	70	63,59 ± 18,17	58,97 ± 13,13	50,81	74,18 ± 34,28	62,07	
SAFA (%)	24,79	35,65	36,17	36	34,32	30,73	37,03	33,94	
MUFA (%)	24,67	31,64	40,37	37,96	31,87	11,67	23,97	34,14	
PUFA (%)	40,62	24,09	20,27	24,12	34,15	48,51	34,94	22,36	

Πίνακας 3.2: Τα προφίλ λιπαρών οξέων των στελεχών *Cyp1_1*, *Cyp2_1*, *Cyp9_1*, *Cyp10_1*, *Cyp18_1*, *Cyp19_1*, *Cyp28_1*, *Leb6_1*. Αναγράφονται οι τιμές άνω του 1% ξηρού βάρους. Αναγράφονται ακόμη, η τιμή του συνόλου των λιπαρών ανά mg ξηρού βάρους, το %ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών (SAFA), των μονοακόρεστων (MUFA) και των πολυακόρεστων (PUFA). Στις τιμές δεν έχουν υπολογιστεί τα άγνωστα λιπαρά που αναφέρονται με (?).

	Leb1_1	Leb4_1_1	Cyp7_1_1
FAME (%)			
14:0	4,28 ± 0,90	5,91 ± 3,11	4,90
15:1	2,64 ±	2,72 ± 1,46	5,64
16:0	32,01 ± 2,26	32,79 ± 2,35	22,58
16:1n-7	1,35 ± 0,78	1,93 ± 0,93	3,85
16:1n-9	1,44 ± 0,25	1,04 ± 0,02	
?	3,88 ± 0,11	3,85 ± 0,37	3,22
?	2,27 ± 0,36	1,96 ± 0,12	1,52
16:3	6,96 ± 0,17	4,89 ± 2,66	3,53
16:4n-1 (?)			1,45
18:0	1,14 ± 0,07	1,22 ± 0,01	0,58
18:1n-9	5,97 ± 0,07	5,48 ± 1,20	2,38
18:1n-7	2,65 ± 0,53	2,33 ± 0,18	2,17
18:2n-6	12,81 ± 1,01	12,81 ± 1,56	6,70
18:3n-6			1,67
18:3n-3	18,84 ± 2,01	16,13 ± 2,44	12,49
?			1,43
20:1n-11		1,86 ± 0,17	
20:1n-9			2,60
?			4,58
20:4n-3			1,26
22:2n-9		1,09 ± 0,03	3,50
22:5n-3			1,53
22:6n-3 (DHA)		2,10 ± 0,39	6,00
24:1n-9			4,27
TFA (mg/g)	68,99 ± 20,41	70,57 ± 3,24	77,05
SAFA (%)	37,43	39,92	27,48
MUFA (%)	14,05	15,36	20,91
PUFA (%)	38,61	37,02	38,13

Πίνακας 3.3: Τα προφίλ λιπαρών οξέων των στελεχών *Leb1_1*, *Leb4_1_1*, *Cyp71_1*. Αναγράφονται οι τιμές άνω του 1% ξηρού βάρους. Αναγράφονται ακόμη, η τιμή του συνόλου των λιπαρών ανά mg ξηρού βάρους, το %ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών (SAFA), των μονοακόρεστων (MUFA) και των πολυακόρεστων (PUFA). Στις τιμές δεν έχουν υπολογιστεί τα άγνωστα λιπαρά που αναφέρονται με (?).

3.5.2 Ανάλυση χρωστικών ουσιών

Στον Πίνακα 3.4, αναγράφονται οι κατά μέσο όρο τιμές τριών επαναλήψεων μετρήσεων χλωροφύλλης a, b, c για τα κοκκοειδή στελέχη, καθώς και το ποσοστό a:b.

Στελέχη	Chla (630nm)	Chlb (647nm)	Chlc (664nm)	Ratio a:b
Cyp7_1_1	4,421	1,781	0,456	2,482
Leb1_1	7,019	2,501	1,154	2,807
Leb4_1_1	7,478	2,356	1,084	3,174

Πίνακας 3.4: Καταγραφή των τιμών φωτομέτρησης σε τρεις επαναλήψεις, για τα τρία είδη χλωροφύλλης που μετρήθηκαν στα κοκκοειδή στελέχη, όπως επίσης και το ποσοστό chl a:b.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Μορφολογική ταξινόμηση των απομονωθέντων στελεχών

Στελέχη με μαστίγια

Αρχικά, έγινε προσπάθεια για την αναγνώριση των στελεχών σε επίπεδο γένους, βάσει των μορφολογικών τους χαρακτήρων. Αυτό κατέστη εφικτό για τα στελέχη που φέρουν μαστίγια (Cyp1_1, Cyp2_1, Cyp9_1, Cyp10_1, Cyp18_1, Cyp19_1, Cyp28_1, Leb6_1). Το χρώμα των κυττάρων είναι κίτρινο προς πράσινο. Το σχήμα των κυττάρων είναι ωοειδές, ελαφρώς συμπιεσμένο και ασύμμετρο. Τα μαστίγια στα κινητά κύτταρα είναι τέσσερα και εξέρχονται από φανερό βοθρίο. Τα κύτταρα είναι πλατιά στη μία πλευρά και πιο στενά στην αντίθετη. Το πυρηνοειδές εντοπίζεται στο κατώτερο ήμισυ του κυττάρου, όχι κοντά στο κέντρο και είναι ευδιάκριτο, σφαιρικό. Η οφθαλμική κηλίδα εντοπίζεται κοντά στο πυρηνοειδές, συνήθως σε πλευρική θέση. Ο χλωροπλάστης είναι σχήματος U, μεγάλος και αποτελείται από τέσσερις λοβούς οι οποίοι είναι διακριτοί από την κατώτερη και την ανώτερη όψη του κυττάρου και φθορίζουν. Τα κύτταρα περιβάλλονται από θήκη. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά των κυττάρων παρέπεμψαν στο γένος *Tetraselmis* της οικογένειας Chlorodendrophyceae του κλάδου των ‘γνήσιων χλωροφύτων’ (‘core chlorophytes’) του φύλου Chlorophyta (Arora *et al.* 2013).

Κοκκοειδή στελέχη

Αντιστοίχως, έγινε προσπάθεια για την αναγνώριση των στελεχών (Cyp7_1_1, Leb1_1, Leb4_1_1) σε επίπεδο γένους, βάσει των μορφολογικών τους χαρακτήρων. Αυτό δεν κατέστη εφικτό, διότι οι χαρακτήρες που ήταν ορατοί με την φωτονική μικροσκοπία δεν επαρκούν για ταξινομική αναγνώριση. Το χρώμα των κυττάρων είναι κίτρινο προς πράσινο. Το σχήμα των κυττάρων είναι σφαιρικό, ελαφρώς ωοειδές. Τα κύτταρα δεν φέρουν μαστίγια. Ο χλωροπλάστης φαίνεται να είναι ενιαίος και να έχει ημισεληνοειδές σχήμα, καθώς και να καταλαμβάνει περισσότερο από το ήμισυ ολόκληρου του κυττάρου. Η ταξινόμηση των στελεχών αυτών έκλινε προς είδη της ομάδας “*Nannochloris*-like algae” των Trebouxiophyceae (Henley *et al.* 2004), ωστόσο με τα συγκεκριμένα δεδομένα δεν είναι δυνατή η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Ως εκ τούτου απαιτείται περαιτέρω μελέτη με το ΗΜΔ ώστε να διευκρινιστούν επαρκώς.

4.2 Μοριακή ταξινόμηση των απομονωμένων στελεχών

Στελέχη με μαστίγια

Η αλληλούχιση των στελεχών επιβεβαίωσε την τοποθέτηση των στελεχών με μαστίγια (Cyp1_1, Cyp2_1, Cyp9_1, Cyp10_1, Cyp18_1, Cyp19_1, Cyp28_1, Leb6_1) σε είδος του γένους *Tetraselmis*,

αφού ο βαθμός ομοιότητας των στελεχών με κατατεθειμένες αλληλουχίες του γένους *Tetraselmis* στη Genbank (βλ. Παράρτημα Π2), ήταν άνω του 98%. Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων, χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες με βαθμό ομοιότητας άνω του 98% για το γονίδιο 18S, και άνω του 89% για το γονίδιο rbcL, καθώς και ακολουθίες από όλη την κλάση των Chlorodendrophyceae. Ως outgroup επελέγησαν τέσσερα είδη μικροφυκών που ανήκουν σε εντελώς διαφορετική κλάση, αυτή των Trebouxiophyceae.

Το δέντρο της κλάσης Chlorodendrophyceae για το γονίδιο 18S υποδεικνύει ότι τα στελέχη ανήκουν στο γένος *Tetraselmis* [Εικόνα 3.29]. Παρατηρείται διαχωρισμός των ειδών *Tetraselmis* σε δύο κλάδους, με τα υπό μελέτη στελέχη να ομαδοποιούνται όλα στον ανώτερο κλάδο. Η στήριξη του δέντρου συνολικά δεν είναι καλή και οι σχέσεις μεταξύ των ειδών φαίνεται να είναι προβληματικές.

Το δέντρο της κλάσης Chlorodendrophyceae για το γονίδιο rbcL, διαχωρίζει τα είδη *Tetraselmis* σε περισσότερους κλάδους, με τα υπό μελέτη στελέχη να ομαδοποιούνται όλα στον ανώτερο κλάδο [Εικόνα 3.28]. Οι κατατεθειμένες αλληλουχίες για την κλάση είναι λιγότερες σε αριθμό, επειδή το γονίδιο rbcL δεν έχει μελετηθεί επαρκώς όσο το 18S. Σε αντιστοιχία με το δέντρο του γονιδίου 18S, δεν είναι δυνατή η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σε σχέση με την ένταξη των στελεχών σε συγκεκριμένο είδος, παρά μόνο ευρύτερα στο γένος.

Κοκκοειδή στελέχη

Τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης για τα κοκκοειδή στελέχη (Cyp7_1_1, Leb1_1, Leb4_1_1) είναι πολύ συγκεκριμένα σε σύγκριση με εκείνα των στελεχών με μαστίγια. Τα αποτελέσματα των κατατεθειμένων αλληλουχιών στη Genbank (βλ. Παράρτημα Π2) με ποσοστό ομοιότητας >98% δεν ανήκουν σε συγκεκριμένο γένος και υποδεικνύουν κυρίως τα γένη *Picochlorum* και *Nannochloris*. Η γενική εικόνα των αποτελεσμάτων υποδεικνύει ότι τα στελέχη ανήκουν στην κλάση Trebouxiophyceae. Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες με βαθμό ομοιότητας άνω του 98% για το γονίδιο 18S, και άνω του 89% για το γονίδιο rbcL, καθώς και ακολουθίες από όλη την κλάση των Trebouxiophyceae. Ως outgroup επελέγησαν τέσσερα είδη μικροφυκών που ανήκουν σε διαφορετική κλάση, αυτή των Chlorodendrophyceae.

Το δέντρο της κλάσης Trebouxiophyceae για το γονίδιο 18S υποδεικνύει ότι τα στελέχη δεν τοποθετούνται στην ίδια ομάδα, και το στέλεχος Cyp7_1_1 διαχωρίζεται σε διαφορετική ομάδα από τα Leb1_1 και Leb4_1_1. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.31, το δέντρο αν και είναι αρκετά καλά επιλυμένο, ωστόσο δε γίνεται να εξαχθούν ασφαλή αποτελέσματα για το γένος των κοκκοειδών στελεχών. Η κλάση των Prasinococcales τοποθετείται σε διαφορετική ομάδα σε σχέση με τα τρία

στελέχη, όπως ήταν αναμενόμενο, όμως η αλληλουχία *Prasinoderma* sp. (AB183584.1), που ανήκει σε αυτή την κλάση τοποθετείται στην ομάδα του στελέχους Cyp_7_1_1. Το NCBI δεν διαθέτει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη συγκεκριμένη κατάθεση, γεγονός που αμφισβητεί την ταξινομική ονοματολογία του.

Το δέντρο της κλάσης Trebouxiophyceae για το γονίδιο rbcL επίσης τοποθετεί τα στελέχη Leb1_1 και Leb4_1_1 σε διαφορετικές ομάδες σε σχέση με το Cyp7_1_1. Συνολικά, η επίλυση του δέντρου δεν είναι καλή, καθώς όλα τα ποσοστά είναι αρκετά χαμηλά, ακόμη και η ομάδα των υπό μελέτη στελεχών που είναι <0,09. Όλη η κλάση θα μπορούσε να είναι 1. Συνολικά, το δέντρο δεν μπορεί να υποδείξει κάποιο συγκεκριμένο αποτέλεσμα, παρά μόνο ότι τα στελέχη σχετίζονται με τα γένη *Picochlorum* (Cyp7_1_1) και *Nannochloris* (Leb1_1, Leb4_1_1).

Το είδος *Picomonas* sp. (KP202854.1), το οποίο υπάρχει στο δέντρο [Εικόνα 3.30] αφορά σε ένα Picoeukaryote (Chromista), οργανισμών πρόσφατα γνωστών ως Picobiliphytes, το οποίο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία δεν περιέχει καν πλαστίδια και είναι ετερότροφο (Seenivasan *et al.* 2013, Moreira & López-García 2014). Το μόνο είδος που έχει απομονωθεί είναι το *Picomonas judraskeda* gen. nov., sp. nov. (Seenivasan *et al.* 2013). Ωστόσο, οι διατροφικές συνήθειες αυτής της ομάδας ειδών δεν είναι γνωστές, και σε παλαιότερη βιβλιογραφία είχε υποδειχθεί ότι μπορεί να τρέφονται με μικροφύκη και να εμφανίζουν το φαινόμενο της κλοπής πλαστιδίων (kreptoplastid) ενσωματώνοντας τα δικά τους πλαστίδια (Yoon *et al.* 2011), γεγονός που αμφισβητείται σε νεότερη βιβλιογραφία (Seenivasan *et al.* 2013). Τα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα, επειδή δεν υπάρχει πλαστίδιο στον εν λόγω οργανισμό, οπότε δεν είναι λογικό να εντοπίζεται σε αλληλουχία απομονωμένη με το πλαστιδιακό γονίδιο rbcL. Αξιοσημείωτο είναι να αναφερθεί ότι γονίδια τα οποία προέρχονται από πράσινα φύκη έχουν εντοπιστεί στα γονιδιώματα ενός διαφορετικού εύρους ευκαρυωτών που υπό κανονικές συνθήκες δεν φέρουν πλαστίδια (Leliaert *et al.* 2012). Επιπροσθέτως, η βιβλιογραφία που αντιστοιχεί στην κατάθεση της Genbank δεν αναγράφει περαιτέρω λεπτομέρειες για το στέλεχος αυτό και δεν το ονομάζει κατά τον ίδιο τρόπο (Sharma *et al.* 2015). Κατ' επέκτασιν, η συγκεκριμένη κατάθεση κρίνεται αμφιλεγόμενη και ακατάλληλη για τη εξαγωγή συμπεράσματος.

4.3 Ταξινομική με βάση το βιοχημικό προφίλ των στελεχών

Τα λιπαρά οξέα αποτελούν συχνά ένδειξη για την ταξινομική θέση των εκάστοτε στελεχών φυτοπλαγκτού, λόγω των διαφορετικών ενζύμων που συμμετέχουν στη σύνθεσή τους. Συνήθως όμως, η απόλυτη σύγκριση δεν είναι ρεαλιστική, επειδή οι τιμές επηρεάζονται από τις συνθήκες και τη φάση

της καλλιέργειας από όπου ελήφθη το δείγμα. Παρά ταύτα, το προφίλ λιπαρών οξέων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματικό κριτήριο.

Στο σύνολό τους, τα υπό μελέτη κοκκοειδή στελέχη παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις σε σύγκριση με τα κύτταρα *Tetraselmis* [Πίνακας 3.2 & Πίνακας 3.3]. Αναλυτικότερα, σε κανένα από τα κοκκοειδή στελέχη δεν υπήρξε ποσότητα >1% EPA, γεγονός που εξηγείται και βιβλιογραφικά για αυτά τα είδη μικροφυκών (Tzovenis *et al.* 2009). Στα κοκκοειδή στελέχη είναι εμφανές ότι τα MUFA και στα τρία στελέχη είναι αρκετά μειωμένα συγκριτικά με τα στελέχη του γένους *Tetraselmis* (Πίνακας). Επιπροσθέτως, η εικόνα της διαφοροποίησης του στελέχους Cyp7_1_1 σε όλα τα ταξινομικά κριτήρια, συμπίπτει και με τα αποτελέσματα των λιπαρών οξέων. Στον Πίνακα φαίνεται ότι το στέλεχος Cyp7_1_1 περιλαμβάνει μικρότερο ποσοστό ακόρεστων λιπαρών οξέων (27,48%) συγκριτικά με τα στελέχη Leb1_1 και Leb4_1_1, και αυξημένο ποσοστό μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (20,91%), όπως επίσης και ποσότητα DHA >5%.

Όσον αφορά στα στελέχη του γένους *Tetraselmis*, το προφίλ των λιπαρών οξέων δεν φαίνεται να δίνει σημαντική ταξινομική πληροφορία σε επίπεδο είδους. Ωστόσο τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες παρατηρήσεις, ότι δηλ. η μέθοδος διαχωρίζει ικανοποιητικά το γένος αυτό από άλλα γένη των Πρασινοφύτων (Tzovenis *et al.* 2009).

Η δοκιμή χρωστικών πραγματοποιήθηκε συμπληρωματικά, και συγκεκριμένα για τα κοκκοειδή στελέχη, για τη διαλεύκανση πιθανών διαφορών και ομοιοτήτων μεταξύ τους. Το στέλεχος Cyp7_1_1 φαίνεται να διαφοροποιείται από τα στελέχη Leb1_1 και Leb4_1_1, επειδή παρουσιάζει αρκετά μειωμένα ποσοστά χλωροφύλλης a, b, c, όπως και ποσοστό χλωροφύλλης a:b [Πίνακας 3.4]..

4.4 Δυνητικές χρήσεις των υπό μελέτη στελεχών

Τα υπό μελέτη γένη της διπλωματικής αυτής εργασίας, έχουν μελετηθεί αρκετά στη βιβλιογραφία για τη δυνητική τους χρήση στις υδατοκαλλιέργειες, βιομηχανία κλπ. Συγκεκριμένα το γένος *Tetraselmis* έχει γίνει αντικείμενο μεγάλης εκμετάλλευσης βιοτεχνολογικά και χρησιμοποιείται ως τροφή στις υδατοκαλλιέργειες αλλά και στο σύνολο της βιομηχανίας που χρησιμοποιεί ως πρώτη ύλη τα μικροφύκη (Spolaore *et al.* 2006, Hemaiswarya *et al.* 2011). Τα μικροφύκη της κλάσης των Trebouxiophyceae έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον για τη δυνητική τους χρήση σε μια ποικιλία βιοτεχνολογικών εφαρμογών, όπως η παραγωγή βιοντίζελ και άλλων μορίων (Lemieux *et al.* 2014).

Το EPA είναι ένα απαραίτητο λιπαρό οξύ για πολλά ψάρια και γαρίδες και η χρήση τους στη διατροφή μπορεί να αυξήσει το ποσοστό ανάπτυξης και επιβίωσης των θαλάσσιων οργανισμών και την άμυνά

τους σε ασθένειες (Floreto *et al.* 1996) ενώ η έλλειψή του μπορεί να επηρεάσει πολύ αρνητικά την καλλιέργεια (Ruyter *et al.* 2000, Glencross 2009). Τα στελέχη *Tetraselmis* Cyp1_1, Cyp19_1 περιείχαν τις μεγαλύτερες ποσότητες EPA (7.39, 6.11% αντιστοίχως) συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη (Cyp2_1, Cyp9_1, Cyp10_1, Cyp28_1, Leb6_1) που περιείχαν EPA σε ποσοστό <5%. Στο στέλεχος Cyp18_1 δεν εντοπίστηκε καθόλου ποσότητα EPA, όπως επίσης και στα κοκκοειδή Cyp7_1_1, Leb1_1, Leb4_1.

Επίσης σημαντικά για τις υδατοκαλλιέργειες λιπαρά οξέα (Sargent *et al.* 1997), όπως επίσης χρήσιμο και στη φαρμακοβιομηχανία, είναι τα DHA & ARA. Από το σύνολο των εξεταζόμενων στελεχών, τα στελέχη *Tetraselmis* Cyp19_1 (6,74%), Cyp28_1 (7,15%) και το Cyp7_1_1 (6,00%) από τα κοκκοειδή, συνθέτουν ποσότητα >5% DHA. Συμπληρωματικά, το ARA σύμφωνα με το προφίλ λιπαρών οξέων δεν περιλαμβάνεται σε σημαντική ποσότητα (>5%) σε κανένα από τα εξεταζόμενα στελέχη, παρά μόνο στα Cyp2_1 (3,78 %) και στο Cyp19_1 (1,40%) σε χαμηλά ποσοστά.

Τα κριτήρια για χρήση των μικροφυκών στην παραγωγή βιοντίζελ καθορίζονται κυρίως από το προφίλ μεθυλεστέρων. Τα UFAs με 4 ή παραπάνω διπλούς δεσμούς είναι επιδεκτικά στην οξειδωση κατά την αποθήκευση και άρα μειώνουν την αποδοχή του ελαίου από μικροφύκη για παραγωγή βιοντίζελ (Abomohra *et al.* 2017). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της διπλωματικής εργασίας, σχεδόν όλα τα στελέχη *Tetraselmis* περιέχουν μεγάλο ποσοστό ακόρεστων λιπαρών οξέων, με περισσότερους από 4 διπλούς δεσμούς (Cyp19_1, Cyp18_1, Cyp28_1, Cyp2_1, Leb6_1, Cyp10_1), σε αντίθεση με τα κοκκοειδή, τα οποία δεν περιέχουν σχεδόν καθόλου ποσοστό σε ακόρεστα λιπαρά οξέα άνω των τεσσάρων διπλών δεσμών (Leb1_1, Leb4_1), εκτός από το Cyp7_1_1.

4.5 Προβλήματα στη μελέτη των μικροφυκών

Οι φυλογενετικές σχέσεις στο φύλο Chlorophyta έχουν υπάρξει για πολύ καιρό ως θέμα που υπόκειται προς συζήτηση με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα, κυρίως σε σχέση με τα υψηλότερα ταξινομικά επίπεδα (τάξη, κλάση).

Ένας σημαντικός περιορισμός, κατά τις φυλογενετικές αναλύσεις μικροφυκών, είναι ότι τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα στη GenBank δεν είναι ολοκληρωμένα και πολλές φορές είναι ανακριβή. Για παράδειγμα, μόνο 2,500 ακολουθίες είναι συσχετισμένες με γεωγραφικές συντεταγμένες και λιγότερες από 1,000 περιβαλλοντικές ακολουθίες έχουν πληροφορίες σχετικά με το βάθος δειγματοληψίας (Tragin *et al.* 2016). Ακόμη, υπάρχει χάσμα στην περιγραφή των στελεχών, ειδικότερα σε παλαιότερες καταθέσεις, λόγω του τρόπου προσέγγισης της ταξινόμησης και των ελλιπών μεθόδων ανάλυσής τους. Περαιτέρω, λόγω της συνεχούς αλλαγής της ονοματολογίας των ειδών και των άλυτων φυλογενετικών

τους σχέσεων, πολλά στελέχη είναι κατατεθειμένα με παλαιότερη ονοματολογία και προκαλούν σύγχυση.

Γονίδια, συμπεριλαμβανομένου του *rbcL*, του *tuf A* (translation unstable factor) και του 18S rRNA, χρησιμοποιούνται ώστε να αναδειχθούν οι σχέσεις μεταξύ των γνήσιων χλωροφύτων ('core' chlorophytes) (Fučíková *et al.* 2014c). Με σκοπό να διερευνηθεί η μικροποικιλότητα σε επίπεδο γένους ή σε κατώτερες ταξινομικές μονάδες, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί το LSU (large ribosomal subunit) ή το γονίδιο ITS (Coleman 2003).

Το επίπεδο της ομοιότητας μεταξύ κάθε γενεάς ποικίλλει, ανάλογα με τη γενεαλογική σειρά Chlorophyta και την περιοχή του γονιδίου που χρησιμοποιείται. Για ολόκληρο το γονίδιο 18S rRNA, ποικίλλει από 83.6% για τα Ulvophyceae, έως 99.9% για τα Pseudoscurfieldiales. Μεταξύ των περισσότερων γενεών, η περιοχή V9 φαίνεται να είναι περισσότερο αποκλίνουσα σε σχέση με την V4, αλλά τα επίπεδα ομοιότητας είναι πιο μεταβλητά για την V9. Κατ' επέκτασιν, η περιοχή V9 φαίνεται να είναι καλύτερος δείκτης για τα Chlorophyta, αν και το μεγαλύτερο μέγεθος της περιοχής V4 θα μπορούσε να είναι χρήσιμο στην ανακατασκευή της φυλογένεσης νέων ομάδων χωρίς αντιπροσώπους στις βάσεις δεδομένων.

Γενικώς, η διαχείριση των πληροφοριών των οργανιδιακών γονιδιωμάτων των πράσινων φυκών είναι δύσκολη, επειδή η ποικιλομορφία των μιτοχονδριακών και χλωροπλαστικών γονιδιωμάτων μέσα στην ίδια ομάδα, είναι συχνά μεγαλύτερη από αυτή μεταξύ των ομάδων. Βοηθητικές επίσης είναι και οι έρευνες που γίνονται στην αρχιτεκτονική των γονιδιωμάτων των ευκαρυωτικών μικροφυκών, αφού αποκαλύπτουν το νήμα προέλευσης και τις αλληλεξαρτήσεις των πράσινων φυτών και ευρύτερα των ευκαρυωτών (Turmel *et al.* 2006, Archibald 2009, Leliaert *et al.* 2012).

Η γενετική ποικιλότητα των *Tetraselmis* έχει μελετηθεί κυρίως βάσει δεδομένων ακολουθιών 18S rDNA, ειδικά από εύκρατες περιοχές (Lee & Hur 2009) αλλά οι μοριακές αναλύσεις με τη χρήση του 18S rRNA γονιδίου έχουν αποτύχει να λύσουν τη φυλογένεση του γένους σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Aroga *et al.* 2013). Παρά το γεγονός ότι η ταξινομική του γένους *Tetraselmis* έχει μελετηθεί εκτενώς, απουσιάζει μία περιεκτική, συστηματική ανασυγκρότηση του γένους, συνδυάζοντας μορφολογικά και μοριακά δεδομένα ενός μεγάλου αριθμού ειδών και απομονωμένων στελεχών (Aroga *et al.* 2013). Μια τέτοια έρευνα είναι απαραίτητο να οδηγήσει σε εκτίμηση της εγκυρότητας των ειδών που έχουν χαρακτηριστεί μορφολογικά και να εξετάσει πιθανή μορφολογική ποικιλομορφία ανάμεσα στα είδη.

Οι φυλογενετικές μελέτες που βασίζονται σε ακολουθίες του γονιδίου 18S έχουν δείξει ότι διαφορετικά είδη (π.χ. *T. chuii*, *T. hazenii*, *T. suecica* και *T. tetrathele*) ομαδοποιούνται σε ένα κλάδο

με παρόμοιες αλληλουχίες, γεγονός που υποδηλώνει ενδοειδική μορφολογική διαφοροποίηση (Lee & Hur 2009). Ωστόσο, πιθανώς αυτοί οι κλάδοι στην πραγματικότητα περιλαμβάνουν πολλά είδη καθώς οι αλληλουχίες αυτές (π.χ. 18S) είναι πολύ συντηρημένες ώστε να εκτιμήσουν τους ευκαρυωτικούς πλαγκτικούς οργανισμούς (Piganeau *et al.* 2011).

Πιο μεταβλητοί μοριακοί δείκτες, όπως η ITS rDNA περιοχή είτε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Verbruggen *et al.* 2007, Leliaert *et al.* 2009, McManus & Lewis 2011, Friedl & Rybalka 2012, Krienitz & Bock 2012) θα χρειαστούν για να εκτιμηθούν τα όρια των ειδών στο γένος *Tetraselmis*. Για παράδειγμα, ένας καλά στηριζόμενος μονοφυλετικός κλάδος έχει προκύψει βάσει αναλύσεων ολόκληρων πυρηνικών και πλαστιδιακών rRNA οπερονίων (Marin 2012).

Σύμφωνα με τους Fučíková *et al.* (2014c) και με συνδυασμό δεδομένων αλληλούχησης υψηλής ακρίβειας (high throughput sequencing) από το χλωροπλαστικό γονιδίωμα με αυξημένο αριθμό δειγμάτων, φαίνεται ότι πολλές από τις βαθύτερες σχέσεις των Trebouxiophyceae (& Ulvophyceae) είναι ακόμα πολύ προβληματικές ώστε να επιλυθούν. Επιπροσθέτως, φαίνεται ότι αυτές οι κλάσεις μάλλον δεν είναι μονοφυλετικές όπως θεωρούνται επί του παρόντος (Fučíková *et al.* 2014c). Η χρήση περαιτέρω μοριακών δεικτών από τον χλωροπλάστη και τα μιτοχόνδρια θα είναι χρήσιμα δεδομένα για να σκιαγραφηθούν οι σχέσεις των “*Nannochloris-like*” φυκών (Tran *et al.* 2014).

Οι πληροφορίες για τις σχέσεις μεταξύ των Trebouxiophyceae είναι πολύ περιορισμένες (Lemieux *et al.* 2014), ιδίως για τη γενεαλογική σειρά που περιλαμβάνει και τα γένη *Picochlorum*, *Nannochloris* κλπ. (Henley *et al.* 2004, Neustupa *et al.* 2011, Leliaert *et al.* 2012). Σε πολλές έρευνες, η περιορισμένη επίλυση των φυλογενετικών δέντρων με βάση το γονίδιο 18S rDNA δυσχεραίνει την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη μονοφυλετικότητα της κλάσης των Trebouxiophyceae και με την ακριβή σειρά διακλάδωσης των γενεαλογικών σειρών που τοποθετούνται μέσα στο UTC (Lemieux *et al.* 2014).

Εκτός από τις προβληματικές φυλογενετικές σχέσεις του φύλου Chlorophyta, και τα βιοχημικά προφίλ των θαλάσσιων φυκών παραμένουν για μεγάλο διάστημα αδιευκρίνιστα, κυρίως λόγω αλλαγών των βιοχημικών ιδιοτήτων τους, ως τρόπου προσαρμογής στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Επιπλέον, οι ανεπάρκειες σε τεχνολογικά αποτελεσματικές μεθόδους για τη μελέτη τους, η αβεβαιότητα της ταξινομικής θέσης των περισσότερων αντιπροσώπων των φυκών και η έλλειψη σταθερών συνθηκών καλλιέργειας, καθιστά πιο δύσκολη την απόκτηση αξιόπιστων βιοχημικών δεδομένων για την πλειονότητα των μικροφυκών (Chantzistroutziou *et al.* 2016). Συμπερασματικά, υπάρχει ακόμα έλλειψη έγκυρων βιοχημικών προφίλ για τα περισσότερα γνωστά στελέχη φυκών και παράλληλα, η

ύπαρξη προφίλ από συγκεκριμένους εκπροσώπους του φύλου που έχουν μελετηθεί περισσότερο, υπονομεύει συχνά τη συνολική εικόνα.

Οι χρωστικές, π.χ. οι χλωροφύλλες, στα κοκκοειδή στελέχη είναι ενδεικτικές, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με μορφολογικά χαρακτηριστικά, πολλές φορές και σε επίπεδο είδους (π.χ. το είδος *Picochlorum oklahomensis* περιλαμβάνει χλωροφύλλες a, b, λουτεΐνη, βιολαξανθίνη, νεοξανθίνη, και 13-καροτένιο (Henley *et al.* 2004), Επομένως ο συνδυασμός φυλογενετικών τεχνικών με βιοχημικές, ειδικά σε αυτές τις ομάδες, πιθανότατα θα βοηθήσει στον εν γένει χαρακτηρισμό τους.

Είναι σαφές ότι μια ακριβής ανακατασκευή μιας αρχαίας ομάδας όπως τα πράσινα φυτά, θα απαιτήσει μεγάλο αριθμό δειγμάτων και ειδών αλλά και μοριακών δεικτών, με την εφαρμογή εξειδικευμένων και σύγχρονων φυλογενετικών και βιοχημικών τεχνικών. Η ταχεία απόκτηση γενετικών δεδομένων από τόσο ευρύ πεδίο έρευνας έχει μεγάλες προοπτικές για να επιλύσει τις φυλογενετικές σχέσεις σε μεγάλης κλίμακα των πράσινων φυκών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα στελέχη με μαστίγια (Cyp1_1, Cyp2_1, Cyp9_1, Cyp10_1, Cyp18_1, Cyp19_1, Cyp28_1, Leb6_1) ανήκουν όλα στο γένος *Tetraselmis* της οικογένειας Chlorodendrophyceae στα 'γνήσια' χλωροφύκη ('core' chlorophytes). Υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες της εργασίας, δεν είναι δυνατόν να αναγνωρισθεί περαιτέρω το είδος από ταξινομική άποψη. Τα κοκκοειδή στελέχη (Cyp7_1_1, Leb1_1, Leb4_1_1) ανήκουν στην οικογένεια Trebouxiophyceae. Υπό τις συνθήκες της εργασίας, δεν είναι δυνατή η εξαγωγή συμπεράσματος για την πλήρη ταξινόμηση των ειδών, εκτός από το ότι ανήκουν είτε στο γένος *Picochlorum* είτε στο γένος *Nannochloris*. Πάντως, το Cyp7_1_1 σύμφωνα με όλες τις αναλύσεις, φαίνεται να διαφοροποιείται από τα υπόλοιπα κοκκοειδή στελέχη, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα στελέχη Leb1_1 & Leb4_1_1 ανήκουν στο ίδιο γένος και πιθανότατα στο *Nannochloris*, σε αντίθεση με το Cyp7_1_1 που πιθανώς ανήκει στο γένος *Picochlorum*. Η χρήση περαιτέρω πιο εξειδικευμένων μοριακών δεικτών, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε συνδυασμό με τελευταίας τεχνολογίας μορφολογική παρατήρηση (ηλεκτρονική μικροσκοπία, μικροσκοπία confocal), είναι απαραίτητη για τη διεξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων αναφορικά με την ταξινομική των υπό μελέτη στελεχών.

Από το σύνολο των έντεκα (11) στελεχών, τα στελέχη *Tetraselmis sp.* Cyp1_1, Cyp19_1 περιείχαν αξιοσημείωτο ποσοστό σημαντικών για τη βιομηχανία λιπαρών οξέων, όπως EPA (>5%). Ακόμη, τα στελέχη *Tetraselmis* Cyp19_1, Cyp28_1 και το Cyp7_1_1 (6,00%) από τα κοκκοειδή, είναι ικανά να

συνθέτουν ποσότητα >5% DHA. Τα κοκκοειδή Leb1_1 & Leb4_1_1 δεν περιέχουν σχεδόν καθόλου ποσοστό σε ακόρεστα λιπαρά οξέα άνω των τεσσάρων διπλών δεσμών, γεγονός που τα καθιστά πιο ιδανικά για τη βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ.

Ωστόσο, η επανάληψη της διαδικασίας εστεροποίησης των λιπαρών οξέων μετά την εφαρμογή επιβαρυντικών παραγόντων, είναι μία μέθοδος που προσφέρει αξιοσημείωτα αποτελέσματα και αύξηση του λιπιδικού περιεχομένου των υπό μελέτη μικροφυκών. Οι παράγοντες αυτοί ενδέχεται να ποικίλλουν (π.χ. έλλειψη αζώτου και φωσφόρου, προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα ή γλυκόζης κ.ά.) και εξαρτώνται επίσης από το είδος του οργανισμού που είναι υπό επιβάρυνση και χρησιμοποιούνται πολύ στη βιβλιογραφία. Για παράδειγμα, τα στελέχη *Tetraselmis* δύνανται να παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες EPA υπό μιξότροφες συνθήκες, σε αντίθεση με τις αυξότροφες συνθήκες που επικράτησαν στην παρούσα εργασία (Lu *et al.* 2016). Αντιστοίχως, σε στελέχη όπως το *Picochlorum*, παρατηρείται αύξηση των τιμών των βασικών λιπαρών τους οξέων σε συνθήκες επιβάρυνσης (Dahmen *et al.* 2013) ή σε αλλαγή των θρεπτικών μέσων καλλιέργειας (Tran *et al.* 2014).

Ο συνδυασμός διαφορετικών ειδών μικροφυκών προσφέρει περισσότερο ισορροπημένη διατροφή και βελτιώνει την ανάπτυξη των ζώων καλύτερα σε σύγκριση με διατροφή αποτελούμενη από μόνο ένα είδος μικροφυκών (Spolaore *et al.* 2006). Κατ' επέκτασιν, στελέχη των οποίων τα κριτήρια δεν επαρκούν για επιλογή (Cyp2_1, Cyp9_1, Cyp10_1, Cyp18_1, Leb6_1), ενδέχεται να συνδυαστούν με κάποιο άλλο στέλεχος για καλύτερα αποτελέσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη Βιβλιογραφία

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., et al. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52: 399–451.
- Ansari, Faiz Ahmad, et al. "Microalgae for Biofuels: Applications, Process Constraints and Future Needs." *Algal Biofuels*. Springer International Publishing, 2017. 57-76.
- Archibald, J.M. 2009. The puzzle of plastid evolution. *Curr. Biol.* 19: R81–R88.
- Arora, Mani, et al. "Tetraselmis indica (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta), a new species isolated from salt pans in Goa, India." *European Journal of Phycology* 48.1 (2013): 61-78.
- Aslan S, Kapdan IK. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering* 2006;28(1): 64–70.
- Baurain, D., Brinkmann, H., Petersen, J., Rodriguez-Ezpeleta, N., Stechmann, A., Demoulin, V., Roger, A. J., Burger, G., Lang, B. F., and Philippe, H. 2010. Phylogenomic evidence for separate acquisition of plastids in cryptophytes, haptophytes, and stramenopiles. *Mol. Biol. Evol.* 27: 1698–1709.
- Becker, D., et al. "Isolation, purification, and characterization of flagellar scales from the green flagellate *Tetraselmis striata* (Prasinophyceae)." *Protoplasma* 156.1-2 (1990): 103-112.
- Benemann J R. 1992. Microalgae aquaculture feeds. *Journal of Applied Phycology* , 4 (3): 233-245.
- Berman, T., Walline, P.D., Schneller, A., Rothenberg, J., and Townsend, D.W. (1985) Secchi disk depth record: a claim for the eastern Mediterranean. *Limnol Oceanogr* 30: 447– 448.
- Bodyl, A., Stiller, J. W., and Mackiewicz, P. 2009. Chromalveolate plastids: direct descent or multiple endosymbioses? *Trends Ecol. Evol.* 24: 119–121.
- Brown, A.; Knights, B.A.; Conway, E. Hydrocarbon content and its relationship to physiological state in the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 1969, 8, 5
- Buchheim, M. A., Turmel, M., Zimmer, E. A., and Chapman, R. L. 1990. Phylogeny of *Chlamydomonas* (Chlorophyta) based on cladistic analysis of nuclear 18S rRNA sequence data. *J. Phycol.* 26: 689–699.
- Buchheim, Mark A., Eugenia A. Michalopoulos, and Julie A. Buchheim. "Phylogeny of the Chlorophyceae with special reference to the Sphaeropleales: a study of 18S and 26S rDNA data." *Journal of Phycology* 37.5 (2001): 819-835.
- Butcher, R. W. "Contributions to our knowledge of the smaller marine algae." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 31.1 (1952): 175-191.
- Butcher, R.W. (1959). *An Introductory Account of the Smaller Algae of the British Coastal Waters. Part 1: Introduction and Chlorophyceae.* Fishery investigations. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Series IV. Her Majesty's Stationery Office, London.
- Cavalier-Smith, T. 1981. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosyst. Eng.* 14: 461–481.
- Cavalier-Smith, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 73: 203–266.

- Chapman, R.L., Buchheim, M.A., Delwiche, C.F., Friedl, T., Huss, V.A.R., Karol, K.G., Lewis, L.A. et al. (1998): Molecular systematics of the Green Algae. – In: Soltis, D.E., Soltis, P.S. & Doyle, J.J. (eds.), *Molecular Systematics of Plants II*. Springer US; Boston, MA, pp. 508–540.
- Chapman, R. L., Buchheim, M. A., and Hoshaw, R.W. 1991. Ribosomal RNA gene sequences: Analysis and significance in the phylogeny and taxonomy of green algae. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 343–368.
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 2007, 25, 294–306
- Christensen, T. (1962): *Systematisk Botanik*, Alger. – In: Bocher, T.W., Lange, M. & Sorensen, T. (eds.), *Botanik*. Munksgaard, Copenhagen, pp. 1–178.
- Dahmen, Ines, et al. "Optimisation of the critical medium components for better growth of *Picochlorum* sp. and the role of stressful environments for higher lipid production." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94.8 (2014): 1628-1638.
- Darienko, Tatyana, et al. "Chloroidium, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta)." *European Journal of Phycology* 45.1 (2010): 79-95.
- Daugbjerg, Niels, Øjvind Moestrup, and Peter Arctander. "Phylogeny of the genus *Pyramimonas* (Prasinophyceae, Chlorophyta) inferred from the *rbcL* gene." *Journal of Phycology* 30.6 (1994): 991-999.
- Daugbjerg, Niels, Øjvind Moestrup, and Peter Arctander. "Phylogeny of genera of Prasinophyceae and Pedinophyceae (Chlorophyta) deduced from molecular analysis of the *rbcL* gene." *Phycological Research* 43.4 (1995): 203-213.
- Ding, Y., et al. "Effect of environmental factors on growth of *Chlorella* sp. and optimization of culture conditions for high oil production." *Shengtai Xuebao/Acta Ecologica Sinica* 31.18 (2011): 5307-5315.
- Duong, Van Thang, et al. "Microalgae isolation and selection for prospective biodiesel production." *Energies* 5.6 (2012): 1835-1849.
- Drevon, Christian A., Ingebjørg Baksaas, and Hans Krokan, eds. *Omega-3 fatty acids: metabolism and biological effects*. Birkhäuser Verlag, 1993.
- Edgcomb, V., Orsi, W., Bunge, J., Jeon, S., Christen, R., Leslin, C., Holder, M. et al. (2011): Protistan microbial observatory in the Cariaco Basin, Caribbean. I. Pyrosequencing vs Sanger insights into species richness. – *ISME J.* 5: 1344–1356.
- Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. A., Schofield, O., and Taylor, F. J. R. 2004. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* 305: 354–360.
- Farwagi, A., Fučíková, K., McManus, H. A., 2015. Phylogenetic patterns of gene rearrangements in four mitochondrial genomes from the green algal family Hydrodictyaceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae). *BMC Genomics*, 16, 826.
- Fawley, Marvin W., Yue Yun, and Mingbo Qin. "Phylogenetic analyses of 18S rDNA sequences reveal a new coccoid lineage of the Prasinophyceae (Chlorophyta)." *Journal of Phycology* 36.2 (2000): 387-393.
- Floreto, Eric AT, Shin-ichi Teshima, and Shunsuke Koshio. "The effects of seaweed diets on the lipid and fatty acids of the Japanese disc abalone *Haliotis discus hannai*." *Fisheries science* 62.4 (1996): 582-588.
- Fučíková, K., Lewis, P.O., González-Halphen, D., Lewis, L.A., 2014a. Gene arrangement convergence, diverse intron content, and genetic code modifications in mitochondrial genomes of Sphaeropleales (Chlorophyta). *Genome Biol. Evol.*, 6, 2170-2180.

- Fučíková, K., Lewis, P.O., Lewis, L.A., 2014b. Putting incertae sedis taxa in their place: a proposal for ten new families and three new genera in the Sphaeropleales (Chlorophyta). *J. Phycol.*, 50, 14-25.
- Fučíková, K., Leliaert, F., Cooper, E.D., Škaloud, P., D'Hondt, S., De Clerck, O., Gurgel, C.F.D., Lewis, L.A., Lewis, P.O., Lopez-Bautista, J.M., Delwiche, C.F., Verbruggen, H., 2014c. New phylogenetic hypotheses for the core Chlorophyta based on chloroplast sequence data. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2, 63.
- Fučíková, Karolína, Paul O. Lewis, and Louise A. Lewis. "Chloroplast phylogenomic data from the green algal order Sphaeropleales (Chlorophyceae, Chlorophyta) reveal complex patterns of sequence evolution." *Molecular phylogenetics and evolution* 98 (2016): 176-183.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17, 754-755.
- Gascard, J.C., and Richez, C. (1985) Water masses and circulation in the Western Alboran Sea and in the Straits of Gibraltar. *Prog Oceanog* 15: 175–216
- Goold H, Beisson F, Peltier G, Li-Beisson Y. Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant Cell Rep.* 2015;34(4):545–55.
- Glencross B D. 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture* , 1 (2): 71-124.
- Guillou, Laure, et al. "Diversity of picoplanktonic prasinophytes assessed by direct nuclear SSU rDNA sequencing of environmental samples and novel isolates retrieved from oceanic and coastal marine ecosystems." *Protist* 155.2 (2004): 193-214.
- Gunderson, J. H., Elwood, H., Ingold, A., Kindle, K., and Sogin, M. L. 1987. Phylogenetic relationships between chlorophytes, chrysophytes, and oomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 5823–5827.
- Hayden, Hillary S., and J. Robert Waaland. "PHYLOGENETIC SYSTEMATICS OF THE ULVACEAE (ULVALES, ULVOPHYCEAE) USING CHLOROPLAST AND NUCLEAR DNA SEQUENCES1." *Journal of Phycology* 38.6 (2002): 1200-1212.
- Hedges, S. B., Blair, J. E., Venturi, M. L., and Shoe, J. L. 2004. A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evol. Biol.* 4: art no. 2.
- Hemaiswarya S, Raja R, Kumar R R, Ganesan V, Anbazhagan C. 2011. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , 27 (8): 1 737-1 746.
- Hori, Terumitsu, Richard E. Norris, and Mitsuo Chihara. "Studies on the ultrastructure and taxonomy of the genus *Tetraselmis* (Prasinophyceae)." *Journal of Plant Research* 95.1 (1982): 49-61.
- Hori, Terumitsu, Richard E. Norris, and Mitsuo Chihara. "Studies on the ultrastructure and taxonomy of the genus *Tetraselmis* (Prasinophyceae)." *Journal of Plant Research* 96.4 (1983): 385-392.
- Hori, H., Lim, B.-L., and Osawa, S. 1985. Evolution of green plants as deduced from 5S rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 820–823.
- Hori, H. and Osawa, S. 1987. Origin and evolution of organisms as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 4: 445–472. Hoshina, R. and Imamura, N. 2008. Multiple origins of the symbioses in *Paramecium bursaria*. *Protist* 159: 53–6
- Hori, Terumitsu, Richard E. Norris, and Mitsuo Chihara. "Studies on the ultrastructure and taxonomy of the genus *Tetraselmis* (Prasinophyceae)." *Journal of Plant Research* 99.1 (1986): 123-135.

- Horrocks, Lloyd A., and Young K. Yeo. "Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA)." *Pharmacological Research* 40.3 (1999): 211-225.
- Huerlimann, R.; de Nys, R.; Heimann, K. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnol. Bioeng.* 2010, *107*, 245–257.
- Jeffrey, C. 1971. Thallophtyes and kingdoms - a critique. *Kew Bull. Addit. Ser.* 25: 291–299.
- Jeffrey, C. 1982. Kingdoms, codes and classification. *Kew Bull.* 37: 403–416.
- Keeling, P. J. 2010. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 365: 729–748.
- Kenrick, P. and Crane, P. R. 1997. The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389: 33–39.
- Kopp, Robert E., et al. "The Paleoproterozoic snowball Earth: a climate disaster triggered by the evolution of oxygenic photosynthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.32 (2005): 11131-11136.
- Lanfear, R., et al. "Partition-Finder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1695–1701." (2012).
- Lee, Hye Jung, and Sung Bum Hur. "Genetic relationships among multiple strains of the genus *Tetraselmis* based on partial 18S rDNA sequences." *Algae* 24.4 (2009): 205-212.
- Legendre, L., and S. Demers. "Towards dynamic biological oceanography and limnology." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41.1 (1984): 2-19.
- Leliaert, F., Verbruggen, H., and Zechman, F. W. 2011. Into the deep: new discoveries at the base of the green plant phylogeny. *BioEssays* 33: 683–692.
- Leliaert, Frederik, et al. "Phylogeny and molecular evolution of the green algae." *Critical Reviews in Plant Sciences* 31.1 (2012): 1-46.
- Lemieux, C., Otis, C., and Turmel, M. 2007. A clade uniting the green algae *Mesostigma viride* and *Chlorokybus atmophyticus* represents the deepest branch of the Streptophyta in chloroplast genome-based phylogenies. *BMC Biology* 5: art no. 2.
- Lemieux, C., Otis, C., Turmel, M., 2014a. Chloroplast phylogenomic analysis resolves deep-level relationships within the green algal class Trebouxiophyceae. *BMC Evol. Biol.*, 14, 211.
- Lemieux, C., Otis, C., Turmel, M., 2014b. Six newly sequenced chloroplast genomes from prasinophyte green algae provide insights into the relationships among prasinophyte lineages and the diversity of streamlined genome architecture in picoplanktonic species. *BMC Genomics*, 15, 857.
- Li Y, Wang B, Wu N, Lan CQ. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid production of *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008;81(4):629–36.

- Li Y, Horsman M, Wu N, Lan CQ, Dubois-Calero N. Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress* 2008;24(4):815–20.
- Liu J G, Yin M Y, Zhang J P, Li B Q, Meng Z C. 2007. Application of *Nannochloropsis salina* as feedstuff in aquaculture. *Marine Sciences* , 31 (5): 4-9. (in Chinese with English abstract)
- Liu, Bensheng, and Christoph Benning. "Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself." *Current opinion in biotechnology* 24.2 (2013): 300-309.
- Lu, Lin, et al. "Biomass and nutrient productivities of *Tetraselmis chuii* under mixotrophic culture conditions with various C: N ratios." *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* (2016): 1-10.
- Malanotte-Rizzoli, P., et al. "Experiment in Eastern Mediterranean probes origin of deep water masses." *Eos, Transactions American Geophysical Union* 77.32 (1996): 305-311.
- Manca, B., Burca, M., Giorgetti, C., Coatanoan, C., Garcia, M.J., and Iona, A. (2004) Physical and biochemical averaged vertical profiles in the Mediterranean regions: an important tool to trace the climatology of water masses and to validate incoming data from operational oceanography. *J Mar Syst* 48: 83–116.
- Margulis, Lynn. "Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof." *Symposia of the Society for Experimental Biology*. No. 29. 1974.
- Marin, Birger. "Nested in the Chlorellales or independent class? Phylogeny and classification of the Pedinophyceae (Viridiplantae) revealed by molecular phylogenetic analyses of complete nuclear and plastid-encoded rRNA operons." *Protist* 163.5 (2012): 778-805.
- Marin, B., C. Matzke, and M. Melkonian. "Flagellar hairs of *Tetraselmis* (Prasinophyceae): ultrastructural types and intrageneric variation." *Phycologia* 32.3 (1993): 213-222.
- Marin, Birger, and Michael Melkonian. "Flagellar hairs in prasinophytes (Chlorophyta): ultrastructure and distribution on the flagellar surface." *Journal of Phycology* 30.4 (1994): 659-678.
- Marin, B., Hoef-Emden, K. & Melkonian, M. (1996). Light and electron microscope observations on *Tetraselmis desikacharyi* sp. nov. (Chlorodendrales, Chlorophyta). *Nova Hedwigia*, 112: 461–475.
- Marin, B. & Melkonian, M. (2010): Molecular phylogeny and classification of the Mamiellophyceae class. nov. (Chlorophyta) based on sequence comparisons of the nuclear- and plastid- encoded rRNA operons. – *Protist* 161: 304–336.
- Marin, B. (2012). Nested in the Chlorellales or independent class? Phylogeny and classification of the Pedinophyceae (Viridiplantae) revealed by molecular phylogenetic analyses of complete nuclear and plastid-encoded rRNA operons. *Protist* 163, 778–805. doi: 10.1016/j.protis.2011.11.004
- Massana, R., Balagué, V., Guillou, L., and Pedrós Alió, C. (2004b) Picoeukaryotic diversity in an oligotrophic coastal site studied by molecular and culturing approaches. *FEMS Microbiol Ecol* 50: 231–243.
- Massjuk, N. P. "Chlorodendrophyceae class. nov. (Chlorophyta, Viridiplantae) in the Ukrainian flora: I. The volume, phylogenetic relations and taxonomical status." *Ukr. Bot. J* 63 (2006): 601-614.

- Mata, T.M.; Martins, A.A.; Caetano, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2010, 14, 217–232.
- Mattox, K. R. "Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology." *Systematics of the green algae* (1984): 29-72.
- Melkonian, M. "An ultrastructural study of the flagellate *Tetraselmis cordiformis* Stein (Chlorophyceae) with emphasis on the flagellar apparatus." *Protoplasma* 98.1-2 (1979): 139-151.
- Melkonian, M., and H. Robenek. "The eyespot of the flagellate *Tetraselmis cordiformis* Stein (Chlorophyceae): Structural specialization of the outer chloroplast membrane and its possible significance in phototaxis of green algae." *Protoplasma* 100.2 (1979): 183-197.
- Melkonian, M. 1984. Flagellar apparatus ultrastructure in relation to green algal classification. In: *Systematics of the green algae*, pp. 73–120. Irvine, D. E. G. and John, D. M. Eds., Academic Press, London.
- Melkonian, Michael, and Hans Rudolf Preisig. "A light and electron microscopic study of *Scherffelia dubia*, a new member of the scaly green flagellates (Prasinophyceae)." *Nordic journal of botany* 6.2 (1986): 235-256.
- McFadden, Geoffrey Ian. "Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids." *Journal of Phycology* 37.6 (2001): 951-959.
- McLachlan, J., and M. Parke. "*Platymonas impellucida* sp. nov. from Puerto Rico." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 47.03 (1967): 723-733.
- Miao, X.; Wu, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.* 2006, 97, 841–846.
- Mishler, B. D., Lewis, L. A., Buchheim, M. A., Renzaglia, K. S., Garbary, D. J., Delwiche, C. F., Zechman, F.W., Kantz, T. S., and Chapman, R. L. 1992. Phylogenetic relationships of the "green algae" and "bryophytes". *Ann. Mo. Bot. Gard.* 81: 451–483.
- Moreira, David, and Purificación López-García. "The rise and fall of Picobiliphytes: how assumed autotrophs turned out to be heterotrophs." *Bioessays* 36.5 (2014): 468-474.
- Moutin, T., and Raimbault, P. (2002) Primary production, carbon export and nutrients availability in western and eastern Mediterranean Sea in early summer 1996 (MINOS cruise). *J Mar Syst* 33–34: 273–288.
- Nakayama, T., Marin, B., Kranz, H. D., Surek, B., Huss, V. A. R., Inouye, I., and Melkonian, M. 1998. The basal position of scaly green flagellates among the green algae (Chlorophyta) is revealed by analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences. *Protist* 149: 367–380.
- Nojima, Daisuke, et al. "Lipid droplet-associated proteins in diverse microalgae revealed by proteomic analysis." *Perspectives in Phycology* (2017).
- Nozaki, Hisayoshi, et al. "Phylogeny of plastids based on cladistic analysis of gene loss inferred from complete plastid genome sequences." *Journal of molecular evolution* 57.4 (2003): 377-382.
- Norris, Richard E., Terumitsu Hori, and Mitsuo Chihara. "Revision of the genus *Tetraselmis* (Class Prasinophyceae)." *Journal of Plant Research* 93.4 (1980): 317-339.

- O'Kelly, C. J. 2007. The origin and early evolution of green plants. In: Evolution of Primary Producers in the Sea, pp. 287–309. Falkowski, P. G. and Knoll, H., Eds., Elsevier Academic, Burlington, MA.
- Parke, Mary, and Irene Manton. "Preliminary observations on the fine structure of *Prasinocladus marinus*." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 45.02 (1965): 525-536.
- Patil, Vishwanath, et al. "Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed." *Aquaculture International* 15.1 (2007): 1-9.
- Patil, Vishwanath, and Hans Ragnar Gislerod. "The importance of omega-3 fatty acids in diet." *CURRENT SCIENCE-BANGALORE*- 90.7 (2006): 908.
- Perasso, R., Baroin, A., Qu, L. H., Bachellerie, J. P., and Adoutte, A. 1989. Origin of the algae. *Nature* 339: 142–144.,
- Pratoomyot J, Srivilas P, Noiraksar T. Fatty acids composition of 10 microalgal species. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 2005;27(6): 1179–87.
- Proskauer, J. (1950). On *Prasinocladus*. *American Journal of Botany*, 37:59–66.
- Proschold, T., and Frederik Leliaert. "Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches." *SYSTEMATICS ASSOCIATION SPECIAL VOLUME* 75 (2007): 123.
- Provasoli, L., T. Yamasu, and I. F. R. S. Manton. "Experiments on the resynthesis of symbiosis in *Convoluta roscoffensis* with different flagellate cultures." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 48.02 (1968): 465-478.
- Radmer, Richard J., and Bruce C. Parker. "Commercial applications of algae: opportunities and constraints." *Journal of Applied Phycology* 6.2 (1994): 93-98.
- Raja R, Hemaiswarya S, Balasubramanyam D, Rengasamy R (2007) Protective effect of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) on experimentally induced fibrosarcoma on wistar rats. *Micro- biol Res* 162:177–184
- Raven, John A. "Biochemical disposal of excess H⁺ in growing plants?." *New Phytologist* 104.2 (1986): 175-206.
- Reinhardt G, Rettenmaier N, Ko ¨ppen S. How sustainable are biofuels for transportation? In: *Bioenergy: challenges and opportunities*. International conference and exhibition on bioenergy; 2008.
- Renaud SM, Thinh LV, Parry DL. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture* 1999;170:147–59.
- Rindi, Fabio, et al. "MOLECULAR PHYLOGENY OF THE GREEN ALGAL ORDER PRASIOALES (TREBOUXIOPHYCEAE, CHLOROPHYTA) 1." *Journal of Phycology* 43.4 (2007): 811-822.

- Rodolfi, L.; Chini Zittelli, G.; Bassi, N.; Padovani, G.; Biondi, N.; Bonini, G.; Tredici, M.R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 2009, *102*, 100–112.
- Ruyter B, Røsjø C, Einen O, Thomassen M S. 2000. Essential fatty acids in Atlantic salmon: time course of changes in fatty acid composition of liver, blood and carcass induced by a diet deficient in n-3 and n-6 fatty acids. *Aquaculture Nutrition*
- Serôdio, João, et al. "Photobiology of the symbiotic acoel flatworm *Symsagittifera roscoffensis*: algal symbiont photoacclimation and host photobehaviour." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 91.01 (2011): 163-171.
- Seenivasan, Ramkumar, et al. "Picomonas judraskeda gen. et sp. nov.: the first identified member of the Picozoa phylum nov., a widespread group of picoeukaryotes, formerly known as 'Picobiliphytes'." *PloS one* 8.3 (2013): e59565.
- Shahidi, Fereidoon, and Udaya N. Wanasundara. "Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies." *Trends in Food Science & Technology* 9.6 (1998): 230-240.
- Scott, C., et al. "Tracing the stepwise oxygenation of the Proterozoic ocean." *Nature* 452.7186 (2008): 456-459.
- Sharma, Sudhir Kumar, et al. "An integrative Raman microscopy-based workflow for rapid in situ analysis of microalgal lipid bodies." *Biotechnology for biofuels* 8.1 (2015): 164.
- Sheehan, J.; Dunahay, T.; Benemann, J.; Roessler, P. *A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae*; National Renewable Energy Laboratory: Golden, Colorado, USA, 1998.
- Shoup, Suzanne, and Louise A. Lewis. "Polyphyletic origin of parallel basal bodies in swimming cells of chlorophycean green algae (Chlorophyta)." *Journal of Phycology* 39.4 (2003): 789-796.
- Sluiman, H. J., Roberts, K. R., Stewart, K. D., and Mattox, K. R. 1983. Comparative cytology and taxonomy of the Ulvophyceae. IV. Mitosis and cytokinesis in *Ulothrix*. *Acta Bot. Neerl.* 32: 257–269.
- Sudhir Kumar, Glen Stecher, and Koichiro Tamura (2015) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Sym, Stuart D. "The class prasinophyceae." *Progress in phycological research* 9 (1993): 281-376.
- Takishita, K., Yubuki, N., Kakizoe, N., Inagaki, Y. & Maruyama, T. (2007): Diversity of microbial eukaryotes in sediment at a deep-sea methane cold seep: Surveys of ribosomal DNA libraries from raw sediment samples and two enrichment cultures. *Extremophiles* 11: 563–576.
- Thronsen, Jahn, and Adriana Zingone. "Tetraselmis wettsteinii (Schiller) Thronsen comb. nov. and its occurrence in golfo di Napoli." *Plant Biosystem* 122.3-4 (1988): 227-235.
- Tragin, Margot, et al. "Diversity and ecology of green microalgae in marine systems: an overview based on 18S rRNA gene sequences." *Perspectives in Phycology* (2016): 141-154.
- Turmel, Monique, et al. "Distinctive architecture of the chloroplast genome in the chlorodendrophycean green algae *Scherffelia dubia* and *Tetraselmis* sp. CCMP 881." *PloS one* 11.2 (2016): e0148934.

Tzovenis, I., et al. "Screening for marine nanoplanktic microalgae from Greek coastal lagoons (Ionian Sea) for use in mariculture." *Journal of applied phycology* 21.4 (2009): 457.

Vidussi, F., H. Claustre, B. B. Manca, A. Luchetta, and J.-C. Marty (2001), Phytoplankton pigment distribution in relation to upper thermocline circulation in the eastern Mediterranean Sea during winter, *J. Geophys. Res.*, 106(C9), 19939–19956, doi:[10.1029/1999JC000308](https://doi.org/10.1029/1999JC000308).

Viprey, Manon, et al. "Wide genetic diversity of picoplanktonic green algae (Chloroplastida) in the Mediterranean Sea uncovered by a phylum-biased PCR approach." *Environmental Microbiology* 10.7 (2008): 1804-1822.

Yan, L.; Schenk, P.M. Selection of Cultured Microalgae for Producing Omega-3 Bio-Lipid Oil; Report for Queensland Sea Scallop Trading Pty Ltd.; The University of Queensland: Queensland, Australia, 2011; p. 36.

YONGMANITCHAI, WHICHIEN, and Owen P. Ward. "Omega-3 fatty acids: alternative sources of production." *Process biochemistry* 24.4 (1989): 117-125.

Yoon, Hwan Su, et al. "A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes." *Molecular biology and evolution* 21.5 (2004): 809-818.

Yoon HS, Price DC, Stepanauskas R, Rajah VD, Sieracki ME, et al. (2011) Single-cell genomics reveals organismal interactions in uncultivated marine protists. *Science* 332: 714–717.

Zechman, Frederick W. "PHYLOGENY OF THE DASYCLADALES (CHLOROPHYTA, ULVOPHYCEAE) BASED ON ANALYSES OF RUBISCO LARGE SUBUNIT (rbcL) GENE SEQUENCES1." *Journal of Phycology* 39.4 (2003): 819-827.

Zechman, F. W., Theriot, E. C., Zimmer, E. A., and Chapman, R. L. 1990. Phylogeny of the Ulvophyceae (Chlorophyta): cladistic analysis of nuclear- encoded rRNA sequence data. *J. Phycol.* 26: 700–710. Zechman,

Ξένα Συγγράμματα

John, David M., Brian A. Whitton, and Alan J. Brook. *The freshwater algal flora of the British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Vol. 1. Cambridge University Press, 2002.

Richmond, A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*; Blackwell Science Ltd.: Hudson County, NJ, USA, 2004.

Melkonian, M. "Phylum chlorophyta, class Prasinophyceae." *Handbook of Protoctista*. (1990): 600-607.

Lee R.E. 1989. "Phycology". Cambridge University Press Pearson Education, San Francisco, CA.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Graham, L. E., Graham, J. M., and Wilcox, L. W. 2009. *Φύκη* (2nd edition).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Π.1.: Αναλυτικός κατάλογος με το σύνολο των αρχικών μικτών καλλιεργειών

Αρχικές καλλιέργειες	Προέλευση	Χαρακτηριστικά
Cyp1	Κύπρος	Αλατότητα 40‰
Cyp2	Κύπρος	Αλατότητα 40‰
Cyp7	Κύπρος	Αλατότητα 40‰
Cyp9	Κύπρος	Αλατότητα 40‰
Cyp10	Κύπρος	Αλατότητα 40‰
Cyp18	Κύπρος	Αλατότητα 40‰
Cyp19	Κύπρος	Αλατότητα 40‰
Cyp28	Κύπρος	Αλατότητα 40‰
Leb1	Λίβανος	Αλατότητα 40‰
Leb2	Λίβανος	Αλατότητα 0‰
Leb3	Λίβανος	Αλατότητα 0‰
Leb6	Λίβανος	Αλατότητα 40‰
Ita1	Ιταλία	Αλατότητα 40‰ & Πυριτικά
Ita2	Ιταλία	Αλατότητα 40‰ & Πυριτικά
Ita3	Ιταλία	Αλατότητα 40‰ & Πυριτικά

Π.2.: Λίστες κατατεθειμένων αλληλουχιών στελεχών της Genbank

Δεδομένα αλληλουχιών 18S φυλογενετικού δέντρου της κλάσης Chlorodendrophyceae

Chlorella_vulgaris_X13688.1
Tetraselmis_rubens_RCC133_KT860871.1
Tetraselmis_rubens_RCC132_KT860870.1
Tetraselmis_striata_RCC131_KT860869.1
Tetraselmis_apiculata_CCAP66_15_KJ756817.1
Tetraselmis_sp_RCC121_KT860859.1
Tetraselmis_striata_RCC130_KT860868.1
Tetraselmis_chuii_RCC129_KT860867.1
Tetraselmis_chuii_SW4_KC594688.1
Chloroidium_saccharobutylicum_KP081400.1
Tetraselmis_subcordiformis_DHmm351_KU561107.1
Tetraselmis_sp_KMMCCP48_FJ559405.1
Tetraselmis_chuii_SAG_JN903999.1
Trebouxia_impressa_Z21551.1
Tetraselmis_carteriformis_KMMCCP24_FJ559388.1
Tetraselmis_cordiformis_HE610130.1
Tetraselmis_subcordiformis_KMMCCP6_FJ559380.1
Tetraselmis_sp_RCC1755_KT860916.1
Tetraselmis_marina_HE610131.1
Tetraselmis_striata_WT3_KX109779.1
Tetraselmis_suecica_KMMCCP9_FJ559381.1
Tetraselmis_sp_RCC124_KT860862.1
Tetraselmis_convolutae_RCC1563_KT860913.1
Tetraselmis_wettsteinii_KT007554.1
Tetraselmis_subcordiformis_FJ517748.1
Tetraselmis_sp_KMMCCP52_FJ559407.1
Tetraselmis_sp_RCC120_KT860858.1
Tetraselmis_sp_KMMCCP43_FJ559403.1
Tetraselmis_helgolandica_KF733530.1
Tetraselmis_chuii_KMMCCP39_FJ559401.1
Tetraselmis_sp_KMMCCP56_GQ917218.1
Tetraselmis_suecica_KMMCCP4_FJ559377.1
Tetraselmis_chuii_RCC128_KT860866.1
Tetraselmis_carteriformis_KMMCCP13_FJ559385.1
Tetraselmis_convolutae_U05039.1
Tetraselmis_chuii_CSIC_HF931098.1
Picochlorum_eykaryotum_KU561201.1
Tetraselmis_sp_RCC500_AY425299.1
Tetraselmis_sp_KSN_AJ431370.2
Tetraselmis_gracilis_KJ756816.1
Tetraselmis_subcord_Xmm1453_KU561160.1
Tetraselmis_astigmatica_JN376804.1
Tetraselmis_inconspicua_KJ756818.1
Tetraselmis_tetrathele_FJ517749.1
Tetraselmis_marina_CTM_KT023599.1
Tetraselmis_sp_KMMCC231_JQ315730.1
Tetraselmis_convolutae_RCC1564_KT860914.1
Scherffelia_dubia_X68484.1
Tetraselmis_sp_RCC126_KT860864.1
Tetraselmis_sp_KMMCC258_JQ315733.1
Tetraselmis_striata_SAG_JN904000.1
Tetraselmis_chuii_DQ207405.1
Tetraselmis_sp_MA_2011_HQ651184.1

Δεδομένα αλληλουχιών 18S φυλογενετικού δέντρου της κλάσης Trebouxiophyceae

Picochlorum_sp_KT893859.1
Tetraselmis_chuii_DQ207405.1
Actinastrum_hentschii_FM205884.1
Nannochloris_sp_AB183620.1
Picochlorum_sp_LC110389.1
Picochlorum_sp_JN191236.1
Picochlorum_maculatum_KM055115.1
Nannochloris_sp_JQ315642.1
Prasiola_calophylla_EF200521.1
Nanochlorum_eykaryotum_X06425.1
Picochlorum_sp_KF495093.1
Chlorella_vulgaris_KU306723.1
Picochlorum_sp_KT860853.1
Botryococcus_braunii_KR869725.1
Phyllosiphon_arisari_FJ829884.1
Picochlorum_sp_KT860842.1
Nannochloris_sp_GQ122348.1
Picochlorum_sp_KT861323.1
Tetraselmis_suecica_FJ559377.1
Picochlorum_eykaryotum_KU561201.1
Prasinoderma_coloniale_KT860886.1
Prasiococcus_calcarius_EF200527.1
Gloetila_sp_AY195976.1
Nannochloris_sp_JQ315647.1
Nannochloris_sp_JQ315637.1
Prasinococcus_capsulatus_AB058384.1
Prasinoderma_sp_AB183584.1
Picochlorum_maculatum_KU561115.1
Phyllosiphon_arisari_JF304471.1
Picochlorum_sp_KT860874.1
Nannochloris_sp_JQ315644.1
Nanochlorum_sp_AB058312.1
Phyllosiphon_coccidium_KT950842.1
Coccomyxa_parasitica_EU127469.1
Picochlorum_maculatum_KU561137.1
L_obovata_Z68695.1
Picochlorum_oklahomensis_AY422073.1
Nannochloris_sp_GQ122337.1
Micractinium_pusillum_AF499921.1
Nannochloris_sp_GQ122341.1
Gloetila_con_AY422074.1
Picochlorum_sp_AB488603.1
Nanochlorum_sp_AB058304.1
Nannochloris_maculatum_AB080302.1
Asterochloris_phycobiontica_GU017647.1
Picochlorum_sp_AY422076.1
T_asymetrica_Z21553.1
Nanochlorum_sp_AB058331.1
Nannochloris_sp_GQ122381.1
Tetraselmis_marina_KT023599.1
Chlorella_sorokianiana_FM205834.1
Stichococcus_sp_KM020184.1
Picochlorum_sp_LC110388.1
Nannochloris_sp_GQ122362.1
Nanochlorum_sp_AB058309.1
Didymogenes_anomala_FM205839.1
Hindakia_tetrachotoma_GQ487236.1
Picochlorum_oklahomensis_KU561106.1
Picochlorum_ocul_GQ122335.1
Picochlorum_okl_KU561200.1
Prasiolopsis_ramosa_AY762600.1
Desmococcus_olivaceus_AJ431572.1

Δεδομένα αλληλουχιών *rbcL* φυλογενετικού δέντρου της κλάσης Chlorodendrophyceae

Chlorella_vulgaris_KM514895.1
Chloroidium_saccharobutylicum_KM514872.1
Tetraselmis_sp_MBTD_KM202126.1
Tetraselmis_sp_NT18_AY954897.1
Picochlorum_eykaryotum_UTEX_EF113454.1
Tetraselmis_suecica_EU555175.1
Tetraselmis_sp_TEQL01_AY954896.1
Scherffelia_dubia_SAG_KU167098.1
Tetraselmis_sp_KMMCC84_JQ315494.1
Tetraselmis_suecica_CCMP_DQ173247.1
Tetraselmis_sp_KMMCC1449_JQ315496.1
Scherffelia_dubia_NC_029807.1
Tetraselmis_sp_CCMP881_KU167097.1
Trebouxia_impresa_KJ754342.1
Tetraselmis_chuii_HF931099.1
Tetraselmis_marina_U30284.1
Tetraselmis_aff_maculata_U30283.1

Δεδομένα αλληλουχιών *rbcL* φυλογενετικού δέντρου της κλάσης Trebouxiophyceae

Phyllosiphon_coccidium_KT950844.1
Actinastrum_hantzchii_UTEX_EF113405.1
Chlorella_sorokiniana_HM101339.1
Auxenochlorella_protothecoides_AM260440.1
Picochlorum_eykaryotum_UTEX_EF113454.1
Picochlorum_maculatum_KP190042.1
Picochlorum_oculata_UTEX_EF113455.1
Tetraselmis_marina_U30284.1
Tetraselmis_chuii_HF931099.1
Micractinium_pusillum_KC810318.1
Coccomyxa_chor_FJ217383.1
Fusochloris_perforata_UTEX_EF113438.1
Heterochlorella_luteoviridis_KM514870.1
Chlorella_pyr_EU038283.1
Chlorella_vulgaris_KM514895.1
Phyllosipson_arisari_KR154334.1
Prasiococcus_calcarius_EF203011.1
Tetraselmis_suecica_CCMP904_DQ173247.1
Stichococcus_bac_UTEXEF113475.1
Prasinococcus_capsul_AB491660.1
Tetraselmis_sp_KMMCC1449_JQ315496.1
Nannochloris_sp_AF446090.1
Mereyella_plan_AY543047.1
Prasiolopsis_ramosa_EF203015.1
Murriella_sp_KF693824.1
Prasinoderma_coloniale_AB491664.1
Prasiola_calcarius_AY694194.1
Picomonas_sp_KP202854.1
Chloroidium_angustoellipsoidium_KR154339.1
Gloetila_con_SAG_EF113444.1
Chlorella_sp_IFRD_AB260910.1
Trebouxia_aust_JF502558.1