



Συστηματική και Οικολογία Μικροφυκών από Παράκτια Μεταβατικά Οικοσυστήματα της Δυτικής Ελλάδος (Ιονίου)

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΞΑΝΘΗ Κ. ΧΑΝΤΖΗΣΤΡΟΥΝΤΣΙΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Αθήνα, 2020



Εθνικόν Και Καποδιστρικόν Πανεπιστήμιον Αθηνών
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας

**Συστηματική και Οικολογία Μικροφυκών από Παράκτια
Μεταβατικά Οικοσυστήματα της Δυτικής Ελλάδος (Ιονίου)**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΞΑΝΘΗ Κ. ΧΑΝΤΖΗΣΤΡΟΥΝΤΣΙΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΘΗΝΑ
ΜΑΡΤΙΟΣ 2020

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.

(ν. 5343/1932, άρθρο 202)

Το κείμενο της Διδακτορικής Διατριβής δεν αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.



National and Kapodistrian University of Athens Σχολή
School of Sciences

Department of Biology

**Systematics and Ecology of Microalgae from Coastal Transitional
Ecosystems of Western Greece (Ionian Sea)**

PhD Thesis

XANTHI K. CHANTZISTROUNTSIOU

BIOLOGIST

ATHENS

MARCH 2020

ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Επιβλέπουσα

Αθηνά ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ-ΑΜΙΛΛΗ

(Ομότιμος Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ)

Μέλη

Δανιήλ ΔΑΝΙΗΛΙΔΗΣ

(Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ)

Αριστείδης ΠΑΡΜΑΚΕΛΗΣ

(Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ)

Αντικατάσταση μέλους Δ. Δανιηλίδη (2017). Νέα σύνθεση:

Μέλη

Χρήστος ΚΑΤΣΑΡΟΣ

(Ομότιμος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ)

Αριστείδης ΠΑΡΜΑΚΕΛΗΣ

(Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ)

ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Επιβλέπουσα

Αθηνά ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ-ΑΜΙΛΛΗ

(Ομότιμος Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ)

Μέλη

Χρήστος ΚΑΤΣΑΡΟΣ

(Ομότιμος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ)

Αριστείδης ΠΑΡΜΑΚΕΛΗΣ

(Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ)

Μαρία ΜΟΥΣΤΑΚΑ

(Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας ΑΠΘ)

Δημήτριος ΧΑΤΖΗΝΙΚΟΛΑΟΥ

(Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ)

Εμμανουήλ ΦΛΕΜΕΤΑΚΗΣ

(Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιοτεχνολογίας, ΓΠΑ)

Διονύσιος Ε. ΡΑΪΤΣΟΣ

(Επικουρος Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ - SUMMARY

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ενδιαφέρον-Αντικείμενο

Η παρούσα διατριβή εστιάζει στη μελέτη στελεχών αντιπροσωπευτικών ομάδων του φυτοπλαγκτού, απομονωμένων από μεταβατικά υδατικά συστήματα της Δ. Ελλάδος, μέσω μιας πολυπαραγοντικής προσέγγισης. Η προσέγγιση αυτή περιλαμβάνει κλασικές ταξινομικές μεθόδους (όπως φωτονική και ηλεκτρονική μικροσκοπία), μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχιών γονιδίων και μοριακής φυλογένεσης, καθώς και βιοχημικές μεθόδους. Επιπλέον διερευνήθηκαν οι ιδιότητες και η δυναμική των καλλιεργειών των στελεχών καθώς και η επίδραση της μεταβολής των περιβαλλοντικών παραμέτρων (αλατότητα) σε αυτές. Τέλος, διερευνήθηκε η δυνατότητα βιομηχανικής εφαρμογής των στελεχών αυτών με βάση τα χαρακτηριστικά τους γνωρίσματα.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν στελέχη που ανήκουν στις ευρύτερες ομάδες των Chlorodendrophyceae (γένος *Tetraselmis* Stein) - μιας πρόσφατα εδραιωμένης ταξινομικής κλάσης - καθώς και των Chlorophyceae (γένος *Dunaliella* Teodoresco). Το γένος *Tetraselmis* αποτελεί ένα από τα πλέον κοσμοπολιτικά γένη των μεταβατικών συστημάτων ανά τον κόσμο και παρουσιάζει τόσο ταξινομικό όσο και οικολογικό αλλά και οικονομικό ενδιαφέρον. Αντιπρόσωποι του γένους χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών εξ αιτίας του ενδιαφέροντος βιοχημικού προφίλ λιπαρών οξέων που παράγουν, συμπεριλαμβανομένων και των απαραίτητων ω-3 λιπαρών οξέων, τα οποία οι ζωικοί οργανισμοί (άρα και ο άνθρωπος) δεν συνθέτουν, αλλά τα προσλαμβάνουν μέσω της τροφής. Το γένος *Dunaliella* και ιδιαίτερος το είδος *D. salina* Teodoresco αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους αντιπροσώπους του φυτοπλαγκτού σε μεταβατικά και κυρίως υπεράλμυρα (ακραίας αλατότητας) περιβάλλοντα, όπου συχνά επικρατεί στις τροφικές αλυσίδες αποτελώντας τη βασική τροφή του ζωοπλαγκτού. Ως αποτέλεσμα, στελέχη του είδους χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες. Επιπλέον της οικολογικής του σημασίας, το είδος έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών λόγω της ικανότητας των αλόφιλων στελεχών του να παράγουν σημαντικές ποσότητες β-καρωτενίου υπό συνθήκες καταπόνησης.

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα είναι κατατεθειμένα στην Τράπεζα Στελεχών AthU-AI (Athens University Algae), την πιστοποιημένη τράπεζα στελεχών του Πανεπιστημίου Αθηνών, που στεγάζεται στον Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του Τμήματος Βιολογίας. Η Συλλογή AthU-AI φιλοξενεί >100 στελέχη μικροφυκών που έχουν απομονωθεί από μεταβατικά οικοσυστήματα, κυρίως της

Δυτικής, αλλά και της υπόλοιπης Ελλάδος, με έμφαση σε αντιπροσώπους του φυτοπλαγκτού με οικολογική και ταξινομική, αλλά και ενδεχόμενη ή πιστοποιημένη εμπορική σημασία. Τα μελετηθέντα στελέχη εν προκειμένω, έχουν απομονωθεί από λιμνοθάλασσες της Ηπείρου (Βόντας, Αλυκές, Καλάγκα, Βατάσα, Ροδιά, Τσουκαλιό) κατά την περίοδο 2005-2006, τη Μακεδονία (αλυκές Μεγάλου Εμβόλου, Αγγελοχώρι Θεσσαλονίκης) κατά το έτος 2006, καθώς από την περιοχή της Αιτωλοακαρνανίας (λιμνοθαλάσσιο σύστημα Μεσολογγίου-Αιτωλικού) κατά την περίοδο 2014-2016.

Για τη μελέτη των στελεχών, υιοθετήθηκε μια πολυπαραγοντική προσέγγιση, η οποία περιλαμβάνει τόσο κλασικές μεθόδους ταξινόμησης (μικροσκοπία και μορφολογικές παρατηρήσεις) όσο και σύγχρονες μεθόδους μοριακής φυλογένεσης αλλά και βιοχημικής ανάλυσης λιπαρών οξέων και χρωστικών παραγομένων από τα στελέχη. Ο συνδυασμός πολλών διαφορετικών τεχνικών στη μελέτη των στελεχών του φυτοπλαγκτού, κατέστησε δυνατή όχι μόνο την ολοκληρωμένη μελέτη και χαρακτηρισμό αυτών, αλλά και την αποκάλυψη της ποικιλομορφίας των αντιπροσώπων τους σε επίπεδο κατώτερο του είδους, ενώ επιπροσθέτως ανέδειξε ιδιότητες που ενδεχομένως επιτρέψουν τη αξιοποίησή τους σε εφαρμοσμένο επίπεδο.

Μεθοδολογία

Όλα τα στελέχη απομονώθηκαν από δείγματα πεδίου που συλλέχθηκαν με τη χρήση δειγματολήπτη νερού, μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και εμπλουτίστηκαν με θρεπτικό διάλυμα Walne's medium (Conway protocol) κατάλληλο για ανάπτυξη μικροφυκών. Από την επώαση των δειγμάτων αυτών, σε συνθήκες που καθορίστηκαν από *in situ* μετρήσεις, προέκυψαν φυσικές «ανθίσεις» (Natural Algal Blooms) μετά από παρατήρηση των οποίων έγινε επιλογή και απομόνωση των κατάλληλων στελεχών, ως επί το πλείστον με τη χρήση της μεθόδου τριχοειδούς αναρρόφησης (μέθοδος μικροπιπέτας) αλλά και των μεθόδων επίστρωσης σε άγαρ (agar plating, streaking) και διαδοχικών αραιώσεων. Όλα τα στελέχη συντηρούνται στην τράπεζα AthU-AI σε μονοκαλλιέργειες (single-strain), οι οποίες ανανεώνονται σε μηνιαία βάση. Στα πλαίσια της Διατριβής αυτής, χρησιμοποιήθηκαν και στοιχεία τα οποία είναι κατατεθειμένα στη Συλλογή AthU-AI και δεν έχουν δημοσιευθεί στο παρελθόν για τις λιμνοθάλασσες της Ηπείρου αλλά και στοιχεία προηγουμένως δημοσιευμένα (Dolapsakis 2005, Δολαψάκης 2008) για τις αλυκές του Μεγάλου Εμβόλου. Με βάση τα προϋπάρχοντα στοιχεία για τις περιοχές της Ηπείρου, αλλά και εκείνα που συλλέχθηκαν κατά τις δειγματοληψίες της περιόδου 2014-2016, έγινε καταγραφή αβιοτικών παραμέτρων και σύνθεσης του στιγμιοτύπου των βιοκοινοτήτων στους

σταθμούς δειγματοληψίας, ώστε τα στοιχεία αυτά να συνοδεύσουν τα κατατεθειμένα στελέχη και να συμβάλουν στον πλήρη χαρακτηρισμό τους.

Για την ταξινομική μελέτη των στελεχών χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι κλασικής ταξινομικής, όπως φωτονική μικροσκοπία, παρατήρηση με σύστημα Nomarski, μικροσκοπία επιφθορισμού, ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης, καθώς και μικροσκοπική και μακροσκοπική παρατήρηση των καλλιεργειών, η δε αναγνώριση έγινε με τη χρήση εξειδικευμένων μορφολογικών κλειδών για το φυτοπλαγκτόν (Lee 1989, Thomas 1997) αλλά και για τις συγκεκριμένες υπό μελέτη ομάδες (Hori *et al.* 1982, 1983, 1986, και Borowitzka & Siva 2007). Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν μορφολογικές μετρήσεις (βιομετρία) καθώς και μετρήσεις δυναμικής των καλλιεργειών. Οι μοριακές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο του προσδιορισμού αλληλουχιών γονιδίων (gene sequencing) και συγκεκριμένα, ως μοριακοί δείκτες επελέγησαν τα γονίδια *rbcl* (μεγάλη υπομονάδα του ενζύμου RUBISCO) και 18S rRNA. Τμήματα των επιλεγμένων γονιδίων ενισχύθηκαν με τη χρήση της τεχνικής PCR και οι αλληλουχίες τους προσδιορίστηκαν με τη χρήση τεχνολογίας Big-Dye Terminator Chemistry. Οι φυλογενετικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη διόρθωση και στοίχιση των αλληλουχιών αυτών (Codon Code Aligber v. 2.0.6) και την αξιολόγηση της ομολογίας τους μεταξύ τους αλλά και με γνωστές, αντίστοιχες αλληλουχίες συγγενικών ταξινομικών ομάδων (MEGA v.6, εργαλείο BLAST, GenBank). Η κατασκευή φυλογενετικού δέντρου έγινε με τη χρήση του Μπαϊσιανού προτύπου (Bayesian Inference, λογισμικό MrBayes 3.2.2).

Πραγματοποιήθηκε βιοχημική μελέτη για δύο τύπων βιομόρια: 1) Ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων (FAME profile) των στελεχών *Tetraselmis* με τη μέθοδο της άμεσης εστεροποίησης κατά Lepage & Roy (1986) και τη χρήση αέριας χρωματογραφίας (τεχνική FID), και 2) Ανάλυση χρωστικών (καρωτενοειδή) και συγκεκριμένα διερεύνηση παραγωγής β-καρωτενίου για τα στελέχη *Dunaliella salina* με τη χρήση φασματοφωτομετρικής μεθόδου που στηρίχτηκε σε γνωστά πρωτόκολλα (Ben-Amotz & Avron 1983, Çelekli & Dönmez 2006, Nagata *et al.* 2007). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει εκχύλιση σε ακετόνη 80% και φωτομέτρηση στα 443, 492, 505 nm. Η μέθοδος διορθώθηκε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης (HPLC-DAD, Shimadzu) με την ταυτόχρονη ανάπτυξη μιας εξειδικευμένης εξίσωσης για τον υπολογισμό της ποσότητας β-καρωτενίου σε καλλιέργειες *D. salina*. (Chantzistroutsou *et al.*, δημοσίευση σε εξέλιξη).

$$\beta\text{-carotene (g/L)} = 0,0017(OD_{443}) + 0,0054(OD_{492}) + 0,0031(OD_{505})$$

Η επίδραση της αλατότητας στις καλλιέργειες των στελεχών *D. salina* διερευνήθηκε με τον σχεδιασμό πειραμάτων καταπόνησης που περιελάμβαναν καλλιέργεια σε ένα εύρος αλατότητας (40‰--240‰), και εκτίμηση της επιβίωσης και της παραγωγικότητας των στελεχών σε β-καρωτένιο. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά επελέγησαν τα στελέχη τα οποία δύνανται να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανική παραγωγή β-καρωτενίου, και σχεδιάστηκαν πειράματα βελτιστοποίησης για τη μαζική καλλιέργεια αυτών.

Ο στατιστικός έλεγχος των αποτελεσμάτων και ο σχεδιασμός των γραφικών απεικονίσεων έγινε με τη χρήση των λογισμικών Microsoft Excel, Primer-6 και TIBCO Statistica.

Χαρακτηρισμός των Στελεχών *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens*

Μελετήθηκαν πέντε (5) στελέχη του γένους *Tetraselmis*, και συγκεκριμένα τα στελέχη AthU-AI R 9-2, R 9-3 (Ροδιά), V 2-2 (Βατάσα), Mes 5 και Mes 17 (Μεσολόγγι), τα οποία παρουσίασαν ομοιότητες βάσει τόσο των μορφολογικών όσο και των πρώτων μοριακών αναλύσεων. Τα στελέχη ταξινομήθηκαν ως αντιπρόσωποι της μορφής *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* βάσει των μορφολογικών τους στοιχείων, όπως αυτά παρατηρήθηκαν στο οπτικό και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, όπου αποκαλύφθηκε η μορφή του πυρηνοειδούς, αλλά και με μικροσκοπία επιφθορισμού που αποκάλυψε το σχήμα του χλωροπλάστη των κυττάρων. Βάσει των εξειδικευμένων κλειδών των Hori *et al.* (Hori *et al.* 1982, 1983, 1986) τα στελέχη εντάχθηκαν στο είδος *Tetraselmis verrucosa* (λόγω της εγκόλπωσης του πυρήνα που εισέρχεται στο πυρηνοειδές) και πιο συγκεκριμένα στη μορφή *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* (λόγω χρωματισμού του μέσου καλλιέργειας από πράσινο σε καστανό/ερυθρό). Οι μορφολογικές παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν με την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου το οποίο περιελάμβανε αλληλουχίες από όλο το φάσμα του φύλου Chlorophyta και όπου τα στελέχη ομαδοποιήθηκαν ισχυρά μεταξύ τους αλλά και με το στέλεχος μάρτυρα (*Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* CCAP 66/6). Το στέλεχος αυτό συμπεριελήφθη στην ανάλυση για να καλυφθεί το κενό της έλλειψης κατατεθειμένων αλληλουχιών για τη συγκεκριμένη μορφή. Επιπλέον οι αλληλουχίες που παρήχθησαν ομαδοποιήθηκαν ισχυρά με τις υπόλοιπες αλληλουχίες *Tetraselmis* και *Scherffelia* Pascher 1911 επιβεβαιώνοντας τη μονοφυλετικότητα της κλάσης Chlorodendrophyceae στην οποία τοποθετήθηκε το γένος από τους Massjuk & Liliitska (2006), αναθεωρώντας την πρότερη ταξινόμηση που τοποθετούσε το γένος στην παραφυλετική (όπως πλέον αναγνωρίζεται) κλάση των Prasinophyceae. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν,

αποτελούν τις πρώτες κατατεθειμένες αλληλουχίες rbcL καθώς και τις πρώτες κατατεθειμένες αλληλουχίες από ελληνικά στελέχη για τη μορφή αυτή.

Τα λιπιδικά προφίλ των στελεχών ήταν χαρακτηριστικά της παραφυλετικής κλάσης των *Prasinophyceae*, με υψηλά ποσοστά πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) και σημαντικές ποσότητες ω-3 λιπαρών οξέων. Ωστόσο η έλλειψη αντίστοιχων μελετών σε άλλους αντιπροσώπους του γένους δεν επιτρέπει τη σαφή επιβεβαίωση ή απόρριψη της ενδεχόμενης ταξινομικής αξίας του λιπιδικού προφίλ για το γένος αυτό. Εν τούτοις, η ομαδοποίηση των στελεχών ίδιας προέλευσης μεταξύ τους βάσει της ανάλυσης Bray-Curtis, υποδεικνύει μια ενδεχόμενη συσχέτιση της ποιοτικής σύστασης των στελεχών σε λιπαρά οξέα με το περιβάλλον από το οποίο προήλθαν. Επιπλέον, το στέλεχος AthU-AI V 2-2 εμφάνισε αξιοσημείωτη ποσότητα του απαραίτητου λιπαρού οξέος EPA (εικοσι-πεντα-ενοϊκό οξύ) - το οποίο οι ζωικοί οργανισμοί προσλαμβάνουν μέσω της τροφής και αποτελεί πρόδρομο των εικοσανοειδών μορίων που συμβάλλουν στη διακυτταρική επικοινωνία - αλλά και υψηλά ποσοστά PUFA (~60%). Συνεπώς, το στέλεχος αυτό ενδεχομένως παρουσιάζει ενδιαφέρον για εφαρμογές στις βιομηχανίες υδατοκαλλιεργειών, τροφίμων και φαρμάκων.

Μέσα από την πολυπαραγοντική αυτή μελέτη, αποκαλύφθηκε η ενδοειδική ποικιλομορφία στο γένος *Tetraselmis*, αφού τα στελέχη που προήλθαν είτε από την ίδια είτε από διαφορετικές λιμνοθάλασσες, παρουσίασαν ποικιλομορφία τόσο στα μορφολογικά όσο και στα βιοχημικά τους χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, το στέλεχος AthU-AI V 2-2 παρουσίασε ιδιαιτερότητες τόσο στο μέγεθος του κυττάρου (μικρότερο από τα υπόλοιπα) όσο και στον χρωματισμό της καλλιέργειας αλλά και στο λιπιδικό προφίλ, γεγονός που θέτει τις βάσεις για περαιτέρω μελέτη του στελέχους αυτού αλλά και για τη διερεύνηση της σημασίας της ενδοειδικής ποικιλότητας στη σύγχρονη ταξινόμηση των αντιπροσώπων του φυτοπλαγκτού.

Μελέτη Στελεχών του Είδους *Dunaliella salina*

Μελετήθηκαν από άποψη μορφολογίας 25 στελέχη του γένους *Dunaliella* (AthU-AI Dun 2-8, Dun 21-32, Dun 34-39), ενώ 13 από αυτά υποβλήθηκαν σε πειράματα καταπόνησης αλατότητας. Η μορφολογική ταξινόμηση (οπτική μικροσκοπία, γνωρίσματα καλλιέργειας) σε συνάρτηση με τη βιοχημική ανάλυση των καλλιεργειών (περιεκτικότητα σε β-καρωτένιο) κατέδειξε την ομοιότητα των υπό μελέτη στελεχών με το είδος *D. salina*. Η μορφολογική κλειδα που χρησιμοποιήθηκε (Borowitzka & Siva 2007) εστιάζει κυρίως σε αλόφιλα είδη του γένους *Dunaliella*, στα οποία ανήκουν τα

υπό μελέτη στελέχη. Τα κύρια διαγνωστικά στοιχεία που χρησιμοποιήθηκαν στην αναγνώριση ήταν ο χρωματισμός των κυττάρων και των καλλιέργειών σε ακραίες συνθήκες, η διάχυση της οφθαλμικής κηλίδας κυρίως στα γηραιότερα (ερυθρά) κύτταρα και η ταυτόχρονη παραγωγή β-καρωτενίου σε ποσοότητες >5% του ξηρού βάρους του κυττάρου. Τα στελέχη Athu-AI Dun 1-8 είχαν ταυτοποιηθεί προηγουμένως από τον Νικόλαο Δολαψάκη στη διδακτορική του Διατριβή (2008), και με βάση το σύστημα που ανέπτυξε στην εργασία αυτή, όλα τα στελέχη τοποθετήθηκαν σε “μορφοτύπους” ανάλογα με τα μορφολογικά τους γνωρίσματα (μέγεθος και χρωματισμός κυττάρου σε συνθήκες καταπόνησης). Το σύστημα αυτό υιοθετήθηκε και επεκτάθηκε στην παρούσα Διατριβή με την προσθήκη ενός ακόμη μορφότυπου. Συγκεκριμένα, τα στελέχη διανεμήθηκαν σε 4 μορφοτύπους: α) Athu-AI Dun 2, Dun 21 (μορφότυπος 2), β) Athu-AI Dun 3-4, Dun 7-8, Dun 22-29, Dun 34, Dun 36-38 (μορφότυπος 3), γ) Athu-AI Dun 5-6, Dun 35 (μορφότυπος 4) και δ) Dun 30-32 (μορφότυπος 5). Ο μορφότυπος 1 αναφέρεται στο στέλεχος Athu-AI Dun 1, το οποίο εμφανίζει ομοιότητα με το είδος *Dunaliella viridis* Teodoresco 1905, το οποίο δεν παράγει β-καρωτένιο και δεν παρουσιάζει ερυθρό χρωματισμό των κυττάρων. Ωστόσο, ορισμένα από τα μελετηθέντα στελέχη παρουσίασαν ορισμένες ιδιομορφίες στις ιδιότητες σχετικά με την παραγωγή β-καρωτενίου, οδηγώντας σε μια επανεκτίμηση του συστήματος ταξινόμησης που στηρίζεται στο περιεχόμενο των κυττάρων σε β-καρωτένιο και στην ανάδειξη της αναγκαιότητας μιας πιο ισχυρής ταξινομικής προσέγγισης για τη διάκριση μεταξύ των διαφόρων ειδών του γένους *Dunaliella*.

Τα διερευνητικά (screening) πειράματα καταπόνησης ως προς την αλατότητα του μέσου καλλιέργειας, είναι ενδεικτικά της βιοχημικής απόκρισης των στελεχών σε ακραίες συνθήκες αλατότητας. Η πλειονότητα των στελεχών εμφάνισε χαμηλή επιβίωση έως και κατάρρευση σε αλατότητες >180‰, ενδεχομένως λόγω ανεπαρκούς εγκλιματισμού και απότομης αλλαγής συνθηκών, αν και η κατάρρευση θα μπορούσε να οφείλεται και στον αερισμό (shear stress) των μέσης-κλίμακας καλλιέργειών. Παρατηρήθηκε χαμηλή κυτταρική παραγωγή (cell yield, cells.mL⁻¹) και μηδενική επιβίωση για κάποια από τα στελέχη, ενώ λίγα στελέχη εμφάνισαν υψηλές τιμές βιομάζας. Η παραγωγικότητα σε ξηρό βάρος της καλλιέργειας (mg.L⁻¹) ήταν ακόμη χαμηλότερη ενώ τόσο η περιεκτικότητα (pg.cell⁻¹) όσο και η παραγωγικότητα (mg.L⁻¹.day⁻¹) των στελεχών σε β-καρωτένιο εμφάνισε αρκετά υψηλότερες τιμές, οι οποίες όμως ήταν στατιστικά σημαντικές μόνο για ορισμένα από τα στελέχη. Συγκριτικά αποτελέσματα ήταν εφικτά μόνο για τρεις από τις αλατότητες (80‰, 100‰, 120‰), ωστόσο αυτά ήταν αρκετά ώστε να διαπιστωθεί ότι η απόκριση των

καλλιεργειών σε αυξημένη αλατότητα και κυρίως σε σχέση με την παραγωγή β-καρωτενίου, δεν παρουσιάζει κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο ή ομαδοποίηση, αλλά σχετίζεται μάλλον με το στέλεχος. Διαφορετικά στελέχη φαίνεται να έχουν διαφορετική απόκριση στην καταπόνηση παρά το γεγονός ότι η επίδραση της καταπόνησης είναι σαφώς υπαρκτή. Η επίδραση αυτή ήταν σαφής στη μορφολογία και στη βιοχημεία των κυττάρων. Η διαφορετική απόκριση των στελεχών στην καταπόνηση είναι συνήθης για το είδος *D. salina* παγκοσμίως, υποδεικνύοντας την ύπαρξη στελεχών με “ενδογενές δυναμικό” αυξημένης παραγωγής β-καρωτενίου, την οποία η καταπόνηση δεν επάγει αλλά πυροδοτεί. Συνεπώς, η επιλογή των παραμέτρων των περαιτέρω πειραμάτων που σχετίζονται με την παραγωγή β-καρωτενίου από τα στελέχη *D. salina* θα πρέπει να γίνεται βάσει στελέχους, και όχι αλατότητας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τα διερευνητικά πειράματα αλατότητας που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, τα στελέχη Athu-AI Dun 30, Dun 31 και Dun 32, επελέγησαν για τη διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών βελτιστοποίησης της καλλιέργειας με σκοπό την επίτευξη καλλιεργειών σε βιομηχανικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, τα πειράματα αυτά σχετίζονται με τη διερεύνηση διαφόρων συνταγών θρεπτικών διαλυμάτων, την απότομη αύξηση της αλατότητας της καλλιέργειας στην εκθετική φάση (salinity shock), καθώς και τη στέρηση αζώτου στο θρεπτικό μέσον. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών συνέτειναν στη δημιουργία πρωτοκόλλων μαζικής καλλιέργειας και τη διεξαγωγή πειραμάτων σε βιοαντιδραστήρες, τα οποία είναι ήδη σε εξέλιξη.

Μελλοντικές προοπτικές

Η μελέτη απομονωμένων στελεχών μικροφυκών από μεταβατικά συστήματα, μέσω μιας πολυπαραγοντικής προσέγγισης, επιτρέπει όχι μόνο την ενδελεχή μελέτη των εν λόγω στελεχών και των ιδιοτήτων τους, αλλά και τη δυνατότητα διαχείρισης -σε επίπεδο καλλιεργειών- οργανισμών που δύσκολα μελετώνται στο πεδίο. Παράλληλα, αποκαλύπτει σχέσεις και διαφοροποιήσεις σε επίπεδο κατώτερο του γένους και δίνει έναυσμα για περαιτέρω μελέτη και πλήρη χαρακτηρισμό ανεπαρκώς μελετημένων ομάδων του φυτοπλαγκτού. Η παρούσα Διατριβή θα αποτελέσει έναν “οδηγό μελέτης” για τα υπόλοιπα στελέχη που είναι κατατεθειμένα στην Τράπεζα AthU-AI αλλά και για εκείνα που θα απομονωθούν στο μέλλον, με απώτερο σκοπό τη συμβολή στη συσσώρευση δεδομένων και τη διασαφήνιση των ταξινομικών και φυλογενετικών χαρακτηριστικών των υπό μελέτη οργανισμών, τη διερεύνηση των βιοχημικών τους ιδιοτήτων, αλλά και την αξιοποίησή τους σε εφαρμοσμένο επίπεδο.

SUMMARY

Objective- Interest

This doctoral thesis focuses on the study of microalgal strains of characteristic phytoplankton groups, isolated from transitional aquatic ecosystems of W. Greece, through a multivariate approach. This approach includes classic taxonomic methods (e.g. light and electron microscopy), gene sequencing and molecular phylogenetic methods as well as biochemical methods. Additionally, the culture properties and dynamics of the strains were investigated, along with the effect of changes in environmental parameters (like salinity) on them. Finally, the potential use of the strains in industrial purposes based on their characteristic traits, was also examined.

More specifically, we studied strains belonging to the wider groups of Chlorodendrophyceae (genus *Tetraselmis* Stein) - a recently established class - and Chlorophyceae (genus *Dunaliella* Teodoresco). *Tetraselmis* is one of the most cosmopolitan genera found in transitional ecosystems all over the world and it is of both ecologic and economic interest. Representatives of the genus are used in the aquaculture industry due to the interesting biochemical profile of fatty acids produced, including ω -3 essential fatty acids that animals (therefore humans as well) cannot produce de novo, but they ingest them through nutrition. *Dunaliella* and particularly its species *D. salina* Teodoresco is one of the most important representatives of phytoplankton in transitional and especially hypersaline environments, where it often dominates the food chains, being the main food for zooplankters. As a result, strains of the species are used in mariculture. Besides its ecological importance, this species has been extensively used in the food and cosmetics industries due to the ability of its halophilic strains to produce considerable amounts of b-carotene under environmental stress conditions.

The strains used in this research are maintained in the Strain Bank AthU-AI (Athens University Algae), the certified strain bank of the National and Kapodistrian University of Athens which is housed at the Section of Ecology and Systematics of the Department of Biology. The AthU-AI collection comprises of >100 microalgal strains, isolated from coastal lagoons of mainly the West but also the rest of Greece, with an emphasis on phytoplankton representatives of ecologic, taxonomic but also possible or verified commercial importance. The studied strains in particular, have been isolated from coastal lagoons of the Epirus region (Vondas, Alykes, Kalaga, Vatatsa, Rhodia, Tsoukalio) during the period 2005 - 2006, the Macedonia region (Megalon

Emvolon salterns, Angelochori, Thessaloniki) in 2006 and the Aetoloakarnania region (lagoonal system of Messolonghi-Aetoliko) during the period 2014-2016.

For the study of these strains, we adopted a multivariate approach which includes classic methods of taxonomy (microscopic and morphological observations) as well as modern methods of molecular phylogeny, but also biochemical analyses of lipids and pigments produced by the strains. The combination of many different methodologies in the study of phytoplankton strains led to full investigation and characterization of them but also to the revelation of the variability of their representatives, on an intra-species, while it also brought out features that will possibly allow their industrial exploitation.

Methodology

All the strains were isolated from field samples, collected with a water sampler, transported to the lab and enriched with a Walne's medium (Conway protocole) nutrient solution, suitable for microalgal growth. After the incubation of these samples in conditions that were determined by evaluating of in situ measurements, natural algal blooms (NAB) were developed. The latter were observed and the desirable strains were selected and isolated using mostly the micro-pipette method, but also the agar plating and streaking methods as well as the multiple dilutions method. All strains are maintained in the AthU-AI culture bank in mono-cultures (single-strain), renewed on a monthly basis. For the completion of this Thesis, we also used data that are deposited in the AthU-AI collection and have not been previously published regarding the Epirus lagoons, as well as previously published data (Dolapsakis 2005, Δολαψάκης 2008) regarding the Megalo Emvolo salterns. Based on the pre-existing data of the culture bank on the Epirus lagoons, but also on the data collected during the 2014-2016 samplings, the abiotic parameters and the bio-communities snapshots were documented at the sampling stations so that the data will accompany the deposited strains and will contribute to their full characterization.

For the taxonomic study of the strains we used methods of classic taxonomy such as light microscopy, transmission electron microscopy (TEM), differential contrast (Nomarski) system and epifluorescence microscopy, and also macroscopic observations of the cultures. Identification of the strains was done using specialized morphological keys for phytoplankters in general (Lee 1989, Thomas 1997) but also for the specific studied taxa (Hori *et al.* 1982, 1983, 1986, and Borowitzka & Siva 2007). Additionally, morphological and biometric measurements were performed, as

well as measurements on the culture dynamic of the strains. Molecular analyses were done using the gene sequencing method and more specifically, the genes *rbcl* (large subunit of the enzyme RUBISCO) and 18S rRNA were selected as molecular markers. Segments of those genes were amplified using the PCR technique and sequenced using Big-Dye Terminator Chemistry technology. Phylogenetic analysis was done after correction and alignment of the produced sequences (Codon Code Aligner v. 2.0.6) and their homology with known, matching sequences of related taxa was evaluated (MEGA v.6, εργαλείο BLAST, GenBank). The phylogenetic tree was constructed using the Bayesian Inference criterion (MrBayes 3.2.2 software).

Biochemical studies were performed on two types of biomolecules: 1) analysis of the fatty acid (FAME) profile of the *Tetraselmis* strains using the direct esterification method by Lepage & Roy (1986) and gas chromatography (FID technique), and 2) pigment analysis (carotenoids) and specifically investigation of b-carotene production from *Dunaliella salina* strains using a spectrophotometric method based on existing protocols (Ben-Amotz & Avron 1983, Çelekli & Dönmez 2006, Nagata *et al.* 2007). This method includes pigment extraction in 80% acetone and absorption measurements in 443, 492, 505 nm. The method was corrected with the use of High Performance Liquid Chromatography (HPLC-DAD, Shimadzu) resulting in the development of a new specific equation for the estimation of b-carotene content in *D. salina* cultures (Chantzistroutsiou *et al.* publication pending).

$$\beta\text{-carotene (g/L)} = 0,0017(OD_{443}) + 0,0054(OD_{492}) + 0,0031(OD_{505})$$

The effect of salinity on the cultures of *D. salina* strains was examined by designing specific stress experiment involving cultivation of the strains in a range of salinities and estimation of their survival and b-carotene productivity. Based on these results we selected the strains that could potentially be of use in the commercial production of b-carotene and we designed optimization experiments for their mass cultivation.

The statistical evaluation of the results and the graphics illustration was done with the use of Microsoft Excel, Primer-6 and TIBCO Statistica softwares.

Characterization of *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* strains

Five (5) strains of the genus *Tetraselmis* were studied herein and particularly, the strains AthU-AI R 9-2, R 9-3 (Rhodia lagoon), V 2-2 (Vatatsa lagoon), Mes 5 και Mes 17 (Messolonghi lagoon), which presented similarities based on both the morphological as well as the initial molecular analyses (*rbcl* gene). The strains were

classified as representatives of the form *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* based on their morphology as observed under the light and transmission electron microscope. The pyrenoid morphology was revealed under TEM microscopy and the shape of the chloroplast was revealed under epifluorescence microscopy. Based on the specialized morphological keys by Hori *et al.* (Hori *et al.* 1982, 1983, 1986) the strains were identified within the species *Tetraselmis verrucosa* (characterized by an invagination of the nucleus penetrating the pyrenoid) and more specifically under the form *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* (change of culture coloration from green to brown/red). The morphological observations were verified with the construction of a phylogenetic tree which included sequences belonging to taxa from the whole range of Chlorophyta and within which, the studied strains were grouped firmly with each other but also the type strain (*Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* CCAP 66/6). The latter was also included in the analysis in order to fill the gap created by the lack of available sequences for this taxon. Additionally, the sequences produced, were grouped firmly with the rest of the *Tetraselmis* and *Scherffelia* Pascher 1911 sequences, confirming the monophyly of the Chlorodendrophyceae class. The genus *Tetraselmis* was placed in this class by Massjuk & Lilitka (2006), who revised its former taxonomic position within the paraphyletic (as it is now recognized) class of Prasinophyceae. The resulting sequences herein, are the first ever available sequences for the *rbcl* gene of this taxonomic unit, as well as the first sequences from Greek strains of the taxon.

The lipid profiles of the strains were characteristic of the paraphyletic class Prasinophyceae, with high amounts of poly-unsaturated fatty acids (PUFA) and considerable amounts of ω -3 fatty acids. However, the lack of corresponding studies on other representatives of the genus does not allow a clear verification or rejection of the taxonomic value of lipid profiles for this genus. Nevertheless, grouping of the strains of the same origin based on Bray-Curtis analysis does suggest a possible correlation of the strains qualitative fatty acid composition with the environment they came from. Furthermore, the Athu-AI V 2-2 strain produced a noteworthy amount of the essential fatty acid EPA (eicosapentaenoic acid) - which animals receive through nutrition and is the precursor of eicosanoid molecules involved in inter-cellular communication - but also high amounts of PUFA (~60%). Therefore this strain is of possible interest for application in aquaculture, food and pharmaceutical industries.

Through this multivariate study, the intra-specific variation within the genus was revealed, since strains originating from the same or different lagoons, showed a variability in their morphological and biochemical properties. More specifically, strain AthU-AI V 2-2 presented peculiarities in both size (it is smaller than the rest of the

strains) and culture coloration, but also in the lipid profile. This observation sets the basis for further investigation of this strain as well as for the study of the importance of intra-specific variation in modern taxonomy of phytoplankton representatives.

Study of the *Dunaliella salina* strains

Twenty five (25) strains of the genus *Dunaliella* were studied herein (Athu-AI Dun 2-8, Dun 21-32, Dun 34-39) and 13 of them were subjected to salinity stress experiments. The morphologic taxonomy (light microscopy, culture properties) along with the biochemical analysis (b-carotene content) of the strain cultures showed an affinity to the species *D. salina*. The morphologic key used (Borowitzka & Siva 2007) focuses mainly on halophilic species of the genus *Dunaliella* to which the studied strains belong. The main diagnostic features used for the identification were: coloration of the cells and cultures in extreme salinity conditions, diffusion of the eyespot in older (red) cells and simultaneous production of b-carotene in amounts >5% of the cell dry weight. The strains Athu-AI Dun 1-8 had previously been identified by Nikolaos Dolapsakis in his doctoral thesis (2009), and based on the system developed in that thesis, all strains were sorted within “morphotypes” with regard to certain morphological criteria (cell size and coloration under stress conditions). That system was adopted and expanded upon within the present thesis with the addition of one more “morphotype”. In particular, the strains studied herein were sorted in 4 morphotypes: a) Athu-AI Dun 2, Dun 21 (morphotype 2), b) Athu-AI Dun 3-4, Dun 7-8, Dun 22-29, Dun 34, Dun 36-38 (morphotype 3), c) Athu-AI Dun 5-6, Dun 35 (morphotype 4), and d) Dun 30-32 (morphotype 5). Morphotype 1 was reserved for strain Athu-AI Dun 1, showing affinity with the species *Dunaliella viridis* Teodoresco 1905, which does not produce b-carotene or presents red coloration of the cells. However, some of the studied strains presented some peculiarities in their b-carotene-related features, leading to a re-evaluation of the taxonomic system based on b-carotene content and suggesting the necessity of a more robust taxonomic approach for the distinction between the species of the genus *Dunaliella*.

The screening salinity-stress experiments are indicative of the biochemical response of the strains to extreme salinity conditions. The majority of strains showed low survival rates and at times collapsed in salinities >180‰, possibly because of inadequate acclimation and sudden change of conditions; however the collapse might have also been due to the aeration (shear stress) of the middle scale cultures. Low cell yield (cells.mL⁻¹) and zero survival rates were observed for some of the strains

while only few of the strains presented a high biomass production. The dry weight productivity ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was even lower while the cell content ($\text{pg}\cdot\text{cell}^{-1}$) and productivity ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) in b-carotene showed quite high values that were statistically important for only few of the strains. We were only able to obtain comparable results for three of the studied salinities (80‰, 100‰, 120‰); however they were enough to observe the response of the cultures to increased salinity and especially regarding b-carotene production. The latter did not present any specific pattern or grouping relative to the salinity but it is more closely influenced by the specific strain. Different strains showed a different response to stress even though the effect of the stress was clearly present. That influence was reflected more clearly both in the morphology and biochemistry of some specific strains. This differential response of the strains in stress is common for *D. salina* worldwide, suggesting the existence of strains with an “intrinsic” potential for increased b-carotene production, to which the stress does not induce production but rather triggers it. Therefore, the choice of parameters for future experiments related to the production of b-carotene in *D. salina* strains should be made with regard to the specific strain properties, rather than salinity itself. Based on the salinity screening experiments performed herein, the strains Athu-AI Dun 30, Dun 31 and Dun 32 were selected for the development of further culture optimization trials, aiming in succeeding cultivation in an industrial level. More specifically, these trials were designed with regard to the investigation of several nutrient solution recipes, the abrupt salinity change in the exponential phase (salinity shock) and the depletion of nitrogen (N-stress) in the culture medium. These trials contributed to the development of specific protocols of mass culture and the application of the latter in photo-bioreactors which are already under way.

Future Perspectives

The study of microalgal strains isolated from transitional ecosystems through a multivariate approach not only permits the thorough investigation of said strains and their peculiarities, but also allows the manipulation - in culture level - of organisms that are difficult to study in their natural environment. At the same time, it reveals relationships and differentiation at an intra-specific level and gives the opening for further studies on the characterization of inadequately studied phytoplanktic organisms. The present thesis will constitute a “research guide” for the rest of the strains that are maintained in the AthU-AI strain bank, but also for those that might be isolated in the future, contributing to the accumulation of data and knowledge and to

the clarification of taxonomic and phylogenetic relationships of the studied organisms, as well as to the investigation of their biochemical properties and their exploitation in applied fields.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρόλογος

Τα μικροφύκη αποτελούν μια ανεξάντλητη πηγή επιστημονικού ενδιαφέροντος. Η οικολογική τους σημασία είναι ζωτική για τα υδάτινα οικοσυστήματα, η ταξινόμηση και φυλογένεσή τους αποτελεί ένα από τα πιο ενδιαφέροντα ζητήματα της εξέλιξης και της συστηματικής, ενώ η ποικιλομορφία των βιοχημικών τους γνωρισμάτων τα καθιστά όχι μόνο ιδιαίτερος ενδιαφέροντα για την έρευνα αλλά και κατάλληλα αντικείμενα βιοτεχνολογικής μελέτης και πιθανής βιομηχανικής εκμετάλλευσης. Η ιδιότητα που καθιστά τα μικροφύκη τόσο ελκυστικά ως οργανισμούς (δηλ. η εξαιρετική ποικιλότητα που παρουσιάζουν ως ομάδα στην οικολογία, την ταξινομική και τη βιοχημεία τους), είναι και εκείνη που δυσχεραίνει τη μελέτη τους. Κλασικές ταξινομικές και οικολογικές μελέτες των μικροφυκών έχουν προηγηθεί, ωστόσο, φαίνεται να μην επαρκούν για τον πλήρη χαρακτηρισμό και την κατανόηση των μικροφυκών. Οι πολυπαραγοντικές μελέτες, δηλ. οι μελέτες που συνδυάζουν περισσότερες της μίας προσεγγίσεις (κλασικές, μοριακές, βιοχημικές μεθόδους) είναι πλέον απαραίτητες.

Η έρευνα επί των μικροφυκών γνωρίζει ιδιαίτερη άνθιση κατά τις τελευταίες δεκαετίες και αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη διατήρηση ζωντανού υλικού με τη μορφή καλλιεργειών μικροφυκών, σε διεθνείς συλλογές στελεχών μικροφυκών, όπως οι συλλογές SAG του Πανεπιστημίου του Göttingen στη Σουηδία, CCAP του Συλλόγου Θαλασσιών Επιστημών της Σκωτίας, και UTEX του Πανεπιστημίου του Τέξας στις ΗΠΑ, μεταξύ άλλων. Η διαθεσιμότητα ζωντανού υλικού για ερευνητικούς, αλλά και εκπαιδευτικούς σκοπούς αποτελεί ένα σημαντικότερο εργαλείο για κάθε επιστήμονα ο οποίος ασχολείται με τις επιστήμες της ζωής και ακόμη περισσότερο με τις επιστήμες που σχετίζονται με τη μελέτη μικροσκοπικών οργανισμών. Η έρευνα επί των μικροφυκών στην Ελλάδα εστιάζεται συνήθως σε αντιπροσώπους συγκεκριμένων ομάδων όπως τα Διάτομα και τα Κυανοβακτήρια, ενώ οι γνώσεις σχετικά με ομάδες όπως Χλωροφύκη και τα Κρυπτοφύκη είναι περιορισμένες στον Ελλαδικό χώρο. Η Συλλογή AthU-AI (Athens University Algae) στεγάζεται στον Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη της Ομότιμης Καθηγήτριας του Τμήματος Βιολογίας, Αθηνάς Οικονόμου-Αμίλλη. Πρόκειται για μια πιστοποιημένη συλλογή στελεχών μικροφυκών και περιλαμβάνει ένα σύνολο > 100 στελεχών που έχουν απομονωθεί από παράκτιες περιοχές της Ελλάδος (π.χ. Μεσολόγγι, Ήπειρος, Σάμος, Μακεδονία) και ανήκουν σε διάφορες ταξινομικές ομάδες επιστημονικού και οικονομικού ενδιαφέροντος (π.χ. Chlorophyceae, Chlorodendrophyceae, Bacillariophyceae,

Trebouxiophyceae, Haptophyceae, Cyanobacteria). Σκοπός της Τράπεζας - εκτός από τη διατήρηση των στελεχών αυτών - είναι η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός τους σε επίπεδο οικολογίας, ταξινόμικής, φυλογένεσης αλλά και μοριακών και βιοχημικών ιδιοτήτων. Η τράπεζα εμπλουτίζεται συνεχώς με νέα στελέχη, τα οποία χρησιμοποιούνται για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, ενώ ταυτόχρονα διερευνάται και η δυνατότητα αξιοποίησης αυτών στη σχετική με τα μικροφύκη βιομηχανία.

Η διαθεσιμότητα του υλικού της Τράπεζας AthU-AI, το τεράστιο ενδιαφέρον των μικροφυκών γενικότερα και του φυτοπλαγκτού ειδικότερα, αλλά και οι σημαντικές προοπτικές που ανοίγει η μελέτη οργανισμών προερχομένων από τα μεταβατικά οικοσυστήματα της Ελλάδας, αποτέλεσαν τους βασικούς άξονες της Διατριβής αυτής. Ταυτόχρονα οι συνεχώς εξελισσόμενες ερευνητικές μεθοδολογίες σε συνδυασμό με τις κλασικές μεθόδους μελέτης των μικροφυκών, οι δυνατότητες για απομόνωση, διατήρηση και μελέτη περισσότερων αντιπροσώπων του φυτοπλαγκτού αλλά και οι νέοι ορίζοντες που ανοίγει η διερεύνηση των βιοτεχνολογικών και βιομηχανικών χρήσεων των μικροφυκών, αποτελούν σημαντικά εργαλεία και κίνητρο για τη μελέτη των διαθέσιμων στελεχών μέσω μιας πολυπαραγοντικής ερευνητικής προσέγγισης. Μια τέτοια προσέγγιση αποτελεί καινοτομία για τον Ελλαδικό χώρο και θέτει τα θεμέλια για αντίστοιχες μελλοντικές έρευνες ελληνικών στελεχών μικροφυκών, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στη μελέτη οργανισμών που επιβιώνουν και ευδοκιμούν σε περιβάλλοντα ιδιαίτερου ενδιαφέροντος στην Ελλάδα.

Ευχαριστίες

Στην εκπόνηση της Διατριβής αυτής έτυχα της πολύτιμης υποστήριξης αρκετών συνεργατών και φίλων. Κατ' αρχάς και κυρίως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διατριβής μου, την Ομότιμη Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ, Αθηνά Οικονόμου-Αμίλλη, η οποία ήταν πάντα δίπλα μου τόσο ως επιστήμων όσο και ως άνθρωπος καθ' όλη τη διάρκεια της μέχρι σήμερα ακαδημαϊκής μου πορείας, από την προπτυχιακή διπλωματική μέχρι και την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής. Η εκπόνηση αυτή θα ήταν αδύνατη χωρίς τη δική της συνεισφορά και καθοδήγηση τόσο στο επιστημονικό όσο και στο συγγραφικό στάδιο της εργασίας, αφού ήταν πάντα διαθέσιμη για την επίλυση της οποιασδήποτε απορίας ή προβλήματος, την ερευνητική καθοδήγηση και τη διόρθωση πιθανών σφαλμάτων σε όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την ηθική υποστήριξη, και για την προσπάθεια υλικής υποστήριξης του έργου μου μέσω της συμμετοχής μου σε ερευνητικά προγράμματα των οποίων είχε την ευθύνη. Τέλος, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη της και την ανάθεση της τεχνικής επιμέλειας της Τράπεζας Στελεχών AthU-AI, το υλικό της οποίας αποτέλεσε το βασικότερο εργαλείο στην εκπόνηση της διατριβής μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου, Χρήστο Κατσαρό, Ομότιμο Καθηγητή, και Αριστείδη Παρμακέλη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ, για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή της διατριβής μου, αλλά και την ενεργό συμμετοχή και βοήθειά τους στο ερευνητικό μου έργο. Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κατσαρό για τη βοήθεια σε θέματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης, και τον κ. Παρμακέλη για τη βοήθεια και καθοδήγηση σε θέματα μοριακών τεχνικών και μεθόδων φυλογενετικής ανάλυσης.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Δρ. Ιωάννη Τζοβενή, διδάκτορα του Gent University του Βελγίου και Επιστημονικό Συνεργάτη του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής, για την υποστήριξη και την καθοδήγηση που μου προσέφερε σε θέματα βιοχημείας και φυσιολογίας των μικροφυκών. Ακόμη ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθειά τους, όλη την ομάδα της εφαρμοσμένης φυκολογίας (Γεωργία Σερετίδου, Ειρήνη Γρατσία, Λένα Ευρυγένη, Βούλα Καρλοβασίτη, Κώστα Πανταζή, Δρ. Αμέρσα Τσιριγώτη, Ιωάννα Τσιόνκη και ιδιαίτερος τον Αλέξανδρο Ντζουβάρα) για την εξαιρετική συνεργασία, την ηθική και υλική υποστήριξη, την άψογη ατμόσφαιρα στο εργαστήριο αλλά και τη φιλία τους.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη βοήθειά τους α) την ομάδα της μοριακής οικολογίας του Α. Παρμακέλη και ιδιαίτερα την Κατερίνα Μπαλανίκα, τη Σοφία Τερζοπούλου, τη Λυδία Καραμπάτσου και την Πένυ Λάμπρη σε θέματα μοριακών και φυλογενετικών τεχνικών, β) την Ελένη Φουντουλάκη, Ερευνήτρια του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. καθώς και τις Δρ. Φωτεινή Κόκκου, Αντιγόνη Βασιλείου και Χρυσούλα Νικολουδάκη, σε θέματα βιοχημικών αναλύσεων, γ) τον Δρ. Παντελή Λιβανό σε θέματα ηλεκτρονικής και φωτονικής μικροσκοπίας, δ) την Δρ. Σοφία Παπαδάκη σε θέματα ανάλυσης χρωστικών, και ε) το προσωπικό του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής και ιδιαίτερα την Δρ. Ιωάννα Λούβρου.

Εδώ θα ήθελα να αναφέρω και τη συνεισφορά του εκλιπόντος Αν. Καθηγητή Δανιήλ Δανιηλίδη, ο οποίος στήριξε τη δουλειά μου και συνέβαλε ενεργά τόσο στο οικολογικό όσο και στο ταξινομικό σκέλος της διατριβής έως ότου έφυγε από τη ζωή το 2017.

Θα ήθελα τέλος, να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου και κυρίως τους γονείς μου Πηνελόπη Γκρέκα και Κωνσταντίνο Χατζηστρούντσιο, τη θεία μου Άννα Γκρέκα, τη γιαγιά μου Ξανθή Γκρέκα, τον αδελφό μου Σωτήρη Χατζηστρούντσιο και τον σύντροφό μου Γιάννη Άμπου-Σίνι που ήταν πάντα στο πλευρό μου, μου έδωσαν την αυτοπεποίθηση να ακολουθήσω το αντικείμενο που επέλεξα, με περιέβαλαν με αγάπη, στοργή και απaráμιλλη υποστήριξη σε όλους του τομείς και χωρίς την στήριξη και την υπομονή των οποίων δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Σας ευχαριστώ όλους θερμά.

Αφιέρωση

*Η εργασία αυτή αφιερώνεται στη μνήμη της αγαπημένης μου γιαγιάς Ξανθής
Γκρέκα και του Καθηγητή μου Δανιήλ Δανιηλίδη*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	35
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	36
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ ΚΑΙ ΑΚΡΟΝΥΜΙΩΝ.....	37
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	39
1.1. Αντικείμενο και Στόχος της Διατριβής	40
1.2. Περιβάλλον Απομόνωσης	41
1.2.1. Μεταβατικά Οικοσυστήματα	41
1.2.2. Παράκτιες Εκβολικές Λιμνοθάλασσες.....	42
1.3. Φυτοπλαγκτόν Μεταβατικών Συστημάτων.....	44
1.4. Γενικά Στοιχεία για τα Μικροφύκη.....	46
1.5. Ταξινόμηση Μικροφυκών.....	47
1.6. Καλλιέργεια Μικροφυκών.....	50
1.7. Ποικιλομορφία και Εξέλιξη Καλλιεργούμενων Πληθυσμών.....	55
1.7.1. Η Έννοια του Στελέχους στα Μικροφύκη.....	55
1.7.2. Ενδο-Ειδική Ποικιλομορφία και Εξέλιξη σε Καλλιεργούμενους Πληθυσμούς Μικροφυκών.....	56
1.7.3. Εγκλιματισμός.....	60
1.8. Λιπιδικά Προφίλ Μικροφυκών.....	62
1.9. Βιομηχανικές εφαρμογές Μικροφυκών.....	63
1.10. Το Γένος <i>Tetraselmis</i> Stein.....	68
1.10.1. Ταξινομική Θεώρηση του Γένους <i>Tetraselmis</i>	68
1.10.2. Οικολογική Θεώρηση του Γένους <i>Tetraselmis</i>	72
1.10.3. Βιομηχανικό Ενδιαφέρον του Γένους <i>Tetraselmis</i>	75
1.11. Το είδος <i>Dunaliella salina</i> Teodresco.....	78

1.11.1. Ταξινομική Θεώρηση του Είδους <i>Dunaliella salina</i>	78
1.11.2. Οικολογική Θεώρηση του Είδους <i>Dunaliella salina</i>	82
1.11.3. Βιοχημικό Ενδιαφέρον του Είδους <i>Dunaliella salina</i>	85
1.11.4. Βιομηχανικό Ενδιαφέρον του Είδους <i>Dunaliella salina</i>	87
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	91
2.1. Περιοχές Μελέτης	92
2.2. Δειγματοληπτικές Μέθοδοι	95
2.3. Απομονώσεις Στελεχών	96
2.3.1. Ανάπτυξη Φυσικών Ανθίσεων Φυκών (NAB).....	96
2.3.2. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.....	97
2.3.3. Μέθοδος επίστρωσης σε άγαρ.....	98
2.4.4. Μέθοδος απομόνωσης με αυξημένη αλατότητα.....	99
2.4.5. Μέθοδος τριχοειδούς απομόνωσης με μικροπιπέτα.....	100
2.4. Καλλιέργεια και Συντήρηση Στελεχών	102
2.4.1. Μελετηθέντα Στελέχη.....	102
2.4.2. Παρασκευή μέσων καλλιέργειας.....	104
2.4.3. Ανακαλλιέργεια στελεχών.....	105
2.4.4. Συντήρηση μονοστελεχικών καλλιεργειών.....	107
2.5. Μέθοδοι Κλασικής Ταξινόμησης	108
2.5.1. Φωτονική Μικροσκοπία.....	108
2.5.2. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης.....	110
2.5.3. Μορφολογικές Κλείδες.....	112
2.6. Μοριακές και Φυλογενετικές Μέθοδοι	113
2.6.1. Μοριακοί δείκτες.....	113
2.6.2. Εξαγωγή Γενετικού Υλικού.....	114
2.6.3. Ενίσχυση της επιλεγμένης περιοχής.....	115

2.6.4. Καθαρισμός του Προϊόντος της PCR.....	116
2.6.5. Προσδιορισμός και Στοίχιση των Αλληλουχιών.....	118
2.6.6. Φυλογενετικές αναλύσεις.....	119
2.7. Βιοχημικές Μέθοδοι.....	120
2.7.1. Προφίλ Λιπαρών Οξέων των Στελεχών <i>Tetraselmis</i>	120
2.7.2. Πειράματα Παραγωγής β-καρωτενίου από στελέχη <i>Dunaliella salina</i>	121
2.7.3. Ανάλυση Χρωστικών.....	124
2.8. Βιομετρία και Βιοκινητική.....	127
2.9. Ανάλυση Περιβαλλοντικών Δειγμάτων.....	128
2.10. Στατιστική Επεξεργασία Δεδομένων.....	129
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	131
3.1. Σταθμοί Δειγματοληψίας.....	132
3.1.1. Αβιοτικές Παράμετροι.....	132
3.1.2. Σύνθεση Φυκο-κοινωνιών.....	134
3.2. Ανάπτυξη Φυσικών Ανθίσεων.....	139
3.3. Απομονωθέντα Στελέχη.....	141
3.3.1. Επιλογή Στελεχών.....	141
3.3.2. Περιγραφή απομονωθέντων στελεχών	144
3.4. Χαρακτηρισμός Στελεχών <i>Tetraselmis verrucosa f. rubens</i>.....	149
3.4.1. Μελετηθέντα Στελέχη.....	149
3.4.2. Κλασική Ταξινόμηση.....	149
3.4.3. Μοριακή Φυλογενετική Ανάλυση.....	157
3.4.4. Ανάλυση Λιπαρών Οξέων.....	173
3.5. Μελέτη Στελεχών του Είδους <i>Dunaliella salina</i>.....	176
3.5.1. Στελέχη υπό Μελέτη.....	176

3.5.2. Μορφολογική Περιγραφή.....	177
3.5.3. Βιοχημικές Αποκρίσεις Στελεχών στην Αλατότητα.....	182
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ/ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	205
4.1. Στελέχη του Γένους <i>Tetraselmis</i>.....	206
4.1.1. Ενδιαίτημα και Εξάπλωση.....	206
4.1.2. Μορφολογία.....	206
4.1.3. Μοριακή Φυλογένεση.....	212
4.1.4. Λιπιδικά Προφίλ.....	215
4.1.5. Ενδοειδική Ποικιλομορφία.....	219
4.2. Στελέχη του ΕΙΔΟΥΣ <i>Dunaliella salina</i>.....	221
4.2.1. Ενδιαίτημα και Εξάπλωση.....	221
4.2.2. Μορφολογία και Βιοχημεία.....	221
4.2.3. Ενδο-ειδική Ποικιλότητα.....	223
4.2.4. Σχόλια επί της ταξινόμησης του είδους <i>Dunaliella salina</i> Teodoresco.....	226
4.3. Συμπερασματικά.....	228
4.4. Μελλοντικές Προοπτικές.....	230
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	235
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	277

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.....	99
Πίνακας 2.....	112
Πίνακας 3.....	127
Πίνακας 4.....	133
Πίνακας 5.....	138
Πίνακας 6.....	147
Πίνακας 7.....	153
Πίνακας 8.....	156
Πίνακας 9.....	161
Πίνακας 10.....	164
Πίνακας 11.....	168
Πίνακας 12.....	170
Πίνακας 13.....	176
Πίνακας 14.....	179
Πίνακας 15.....	184
Πίνακας 16.....	186
Πίνακας 17.....	189
Πίνακας 18.....	192
Πίνακας 19.....	195
Πίνακας 20.....	198

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.....	39
Εικόνα 2.....	49
Εικόνα 3.....	50
Εικόνα 4.....	54
Εικόνα 5.....	57
Εικόνα 6.....	67
Εικόνα 7.....	75
Εικόνα 8.....	84
Εικόνα 9.....	85
Εικόνα 10.....	88
Εικόνα 11.....	90
Εικόνα 12.....	91
Εικόνα 13.....	93
Εικόνα 14.....	94
Εικόνα 15.....	95
Εικόνα 16.....	97
Εικόνα 17.....	102
Εικόνα 18.....	104
Εικόνα 19.....	105
Εικόνα 20.....	107
Εικόνα 21.....	108
Εικόνα 22.....	109
Εικόνα 23.....	113
Εικόνα 24.....	118
Εικόνα 25.....	122
Εικόνα 26.....	123
Εικόνα 27.....	124
Εικόνα 28.....	128
Εικόνα 29.....	131
Εικόνα 30.....	132
Εικόνα 31.....	134
Εικόνα 32.....	135
Εικόνα 33.....	136
Εικόνα 34.....	137
Εικόνα 35.....	143
Εικόνα 36.....	143
Εικόνα 37.....	144
Εικόνα 38.....	148
Εικόνα 39.....	149
Εικόνα 40.....	150
Εικόνα 41.....	151
Εικόνα 42.....	151
Εικόνα 43.....	167
Εικόνα 44.....	169
Εικόνα 45.....	171
Εικόνα 46.....	172
Εικόνα 47.....	173
Εικόνα 48.....	174
Εικόνα 49.....	174
Εικόνα 50.....	174
Εικόνα 51.....	175
Εικόνα 52.....	175
Εικόνα 53.....	187
Εικόνα 54.....	190
Εικόνα 55.....	193
Εικόνα 56.....	197
Εικόνα 57.....	202

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ ΚΑΙ ΑΚΡΩΝΥΜΙΩΝ

AthU-AI	Athens University Algae	Τράπεζα στελεχών μικροφυκών του ΕΚΠΑ
EU-WFD 2000/60	EU Water Framework Directive	Οδηγία-Πλαίσιο για τα Ύδατα της Ευρωπαϊκής Ένωσης
NAB	Natural Algal Blooms	Φυσικές ανθίσεις φυκών
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase	Καρβοξυλάση/οξυγενάση της διφωσφορικής ριβουλόζης
rbcL	RUBISCO large (subunit)	Γονίδιο που κωδικοποιεί για τη μεγάλη υπομονάδα του ενζύμου RUBISCO
18S rRNA	18S ribosomal RNA	Γονίδιο που κωδικοποιεί για το 18S ριβοσωμικό RNA
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
BLAST	Basic Local Alignment Search	Εργαλείο αναζήτησης στοίχισης αλληλουχιών
GenBank		Βάση δεδομένων αλληλουχιών DNA
FAME	Fatty Acid Methyl Ester	Μεθυλεστέρας λιπαρού οξέος
FID	Flame Ionisation Detector	Ανιχνευτής ιονισμού φλόγας
HLPC - DAD	High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector	Υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης με ανιχνευτή σειράς διοδίων
OD	Optical Density	Οπτική απορρόφηση
CCAP	Culture Collection of Algae and Protozoa	Συλλογή στελεχών φυκών και πρωτοζώων, Σκωτία
SAG	Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen	Συλλογή καλλιεργειών φυκών του Πανεπιστημίου του Göttingen, Σουηδία
UTEX	University of Texas	Συλλογή καλλιεργειών φυκών του Πανεπιστημίου του Τέξας
PUFA	Poly-Unsaturated Fatty Acid	Πολυ-ακόρεστο λιπαρό οξύ
ΕΚΠΑ		Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
TEM	Transmission Electron Microscopy	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (ΗΜΔ)
SEM	Scanning Electron Microscopy	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (ΗΜΣ)
PBR	Photo Bio Reactor	Φωτο-βιοαντιδραστήρας
EPA	Eikosapentaenoic Acid	Εικοσι-πεντα-ενοϊκό οξύ
DHA	Docosahexaenoic Acid	Εικοσιδι-εξα-ενοϊκό οξύ
ALA	alpha-Linolenic Acid	άλφα-Λινολενικό οξύ
TAG	Tri-acyl-glycerol	Τρι-ακυλ-γλυκερόλη

UTC clade	Ulvoophyceae, Trebouxiophyceae, Chlorophyceae clade (core Chlorophyta)	Εξελικτικός Κλάδος που περιλαμβάνει τις κλάσεις των “γνήσιων χλωροφύτων” (Ulvoophyceae, Trebouxiophyceae, Chlorophyceae)
ITS	Internal Transcribed Spacer	Εσωτερική μεταγραφόμενη περιοχή
ROS	Reactive Oxygen Species	Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
Tetr	<i>Tetraselmis</i>	
Dun	<i>Dunaliella</i>	
LFC	Laminar Flow Cabinet	Θάλαμος νηματικής ροής
SSU RNA	Small SubUnit RiboNucleic Acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ της μικρής υπομονάδας των ριβοσωμάτων
CTAB	Cetyl-Trimethyl-Ammonium Bromide	Βρωμιούχο κετυλο-τριμεθυλ-αμμώνιο
RNAase		RNAάση, ένζυμο που αποδιατάσσει το RNA
dNTP	Desoxyribo-Nuclotide Tri-Phosphate	Τριφωσφορικό δεσοξυριβονουκλεοτίδιο
Taq DNA Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polymerase	Ένζυμο πολυμερισμού των νουκλεοτιδίων και σύνθεσης τμημάτων DNA, από το βακτήριο <i>Thermus aquaticus</i>
rDNA	Ribosomal DNA	Ριβοσωμικό γονίδιο
dw	Dry weight	Ξηρό βάρος
ESS	Effective Sample Size	Αποτελεσματικό μέγεθος δείγματος
ANOVA	Analysis Of Variance	Ανάλυση διακύμανσης
MANOVA	Multivariate Analysis Of Variance	Πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης
bp	Base pairs	Ζεύγη βάσεων στις αλληλουχίες DNA
π.χ.		Παραδείγματος χάριν (παράθεση παραδειγμάτων)
πρβ.		Παράβαλε (παράθεση αναφορών προς σύγκριση)
βλ.		Βλέπε (παράθεση αναφορών για περαιτέρω στοιχεία)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στόχος της Διατριβής είναι η συστηματική ανάλυση και οικολογική μελέτη στελεχών αντιπροσώπων του φυτοπλαγκτού, από μεταβατικού τύπου υδατικά συστήματα της Ελλάδος. Ως τέτοιου τύπου οικοσυστήματα ορίζονται οι λιμνοθάλασσες (ανοικτές και κλειστές) καθώς και οι εκβολές των ποταμών, όπου παρατηρείται μια λιγότερο ή περισσότερο διακριτή διαβάθμιση συνθηκών (π.χ. αλατότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση θρεπτικών αλάτων), η οποία έχει άμεση επίπτωση στη βιοτική συνιστώσα των συστημάτων αυτών. Η πρώτη βαθμίδα του τροφικού πλέγματος που επηρεάζεται από τις ιδιόζουσες αυτές συνθήκες είναι αυτή του φυτοπλαγκτού. Βασικός στόχος της διατριβής είναι η ταξινομική και οικολογική μελέτη επιλεγμένων οργανισμών που αποτελούν σημαντικές ομάδες του φυτοπλαγκτού των μεταβατικών αυτών συστημάτων, μέσω μιας πολυπαραγοντικής προσέγγισης, η οποία περιλαμβάνει συστηματική, μοριακή, φυλογενετική, βιοχημική και οικολογική διερεύνηση.

Για την επίτευξη του γενικότερου στόχου, ως ειδικότερους στόχους θέσαμε τη μελέτη συγκεκριμένων οργανισμών που απαντώνται στα εν λόγω μεταβατικά οικοσυστήματα, οι οποίοι επιπλέον του οικολογικού και ταξινομικού τους ενδιαφέροντος, δύνανται να χρησιμοποιηθούν και σε βιομηχανικές εφαρμογές που σχετίζονται με τα μικροφύκη. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν αντιπρόσωποι των ευρύτερων ομάδων μικροφυκών που είναι κατατεθειμένοι στην Τράπεζα Στελεχών του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής AthU-AI (υπεύθυνη λειτουργίας της Τράπεζας, Α. Οικονόμου-Αμίλλη), και ειδικότερα στελέχη του γένους *Tetraselmis* Stein 1878 καθώς και στελέχη του είδους *Dunaliella salina* Theodoresco 1905. Τα μελετηθέντα στελέχη συλλέχθηκαν κατά την εκπόνηση της εν λόγω διατριβής από επιλεγμένες λιμνοθάλασσες της Δυτικής Ελλάδος (Μεσολόγγι και Αιτωλικό), απομονώθηκαν, και καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο. Επιπλέον, μελετήθηκαν στελέχη που ανήκουν στις ταξινομικές ομάδες-στόχους, τα οποία είναι ήδη κατατεθειμένα στην Τράπεζα AthU-AI και έχουν απομονωθεί από διάφορες λιμνοθάλασσες της Ελλάδος.

Οι χρησιμοποιούμενες μεθοδολογίες, επιπλέον των μοριακών φυλογενετικών αναλύσεων (μελέτη αλληλουχιών ενδεικτικών γονιδίων) περιλαμβάνουν και μορφολογικές παρατηρήσεις (κλασική ταξινομική), μελέτη της λεπτής δομής των κυττάρων, βιοχημικές αναλύσεις (χρωστικές, προφίλ λιπαρών οξέων), καθώς και μελέτη των χαρακτηριστικών της καλλιέργειας (βιομετρία κυττάρων και βιοκινητική καλλιέργειών) ώστε να διερευνηθεί η ενδο-ειδική ποικιλότητα των επιλεγμένων

ομάδων μικροφυκών, καθώς και η ενδεχόμενη επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων σε αυτήν. Επιπλέον, διερευνήθηκε η δυνατότητα χρήσης των υπό μελέτη στελεχών βάσει των βιοχημικών τους χαρακτηριστικών.

Συνοψίζοντας, η παρούσα διατριβή αποσκοπεί στον πλήρη χαρακτηρισμό στελεχών, τα οποία έχουν απομονωθεί από φυσικά δείγματα πεδίου και έχουν εγκλιματιστεί και καλλιεργούνται στο εργαστήριο, με τη χρήση μιας πολυπαραγοντικής προσέγγισης. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει τον ταξινομικό αλλά και βιοχημικό χαρακτηρισμό των οργανισμών και παράλληλα αποκαλύπτει ποικιλότητα σε επίπεδο ακόμη και κατώτερο του είδους, την πιθανή σχέση της ποικιλότητας αυτής με το περιβάλλον απομόνωσης και τις συνθήκες καλλιέργειας, καθώς και την πιθανή ταξινομική, οικολογική και βιομηχανική αξιοποίηση της διαφοροποίησης αυτής των απομονωμένων στελεχών. Τέλος, οι απομονωθέντες οργανισμοί θα εμπλουτίσουν την Τράπεζα Στελεχών Μικροφυκών AthU-AI του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) με την πιθανότητα περαιτέρω αξιοποίησής τους σε εφαρμοσμένο επίπεδο.

1.2. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

1.2.1. Μεταβατικά Οικοσυστήματα

Σύμφωνα με την Οδηγία Πλαίσιο για τα Ύδατα (EU-WFD 2000/60) τα μεταβατικά συστήματα αποτελούν υδάτινες διαπλάσεις, οι οποίες εντοπίζονται κοντά στις περιοχές όπου οι ποτάμιες απορροές εκβάλλουν στη θάλασσα (ποτάμιες εκβολές). Με βάση τον εν λόγω ορισμό, τα συστήματα αυτά παρουσιάζουν εν μέρει θαλασσινό χαρακτήρα εξ αιτίας της γειννιάσής τους με παράκτιες περιοχές, αλλά επηρεάζονται έντονα και από τις γειτονικές εισροές γλυκών νερών, αποτελώντας ουσιαστικά ένα συνεχές μετάβασης από ύδατα χαμηλής αλατότητας (γλυκό νερό) σε ύδατα υψηλότερης αλατότητας (θαλασσινό νερό) (Pérez-Ruzafa *et al.* 2010). Στα συστήματα αυτά περιλαμβάνονται πολλοί διαφορετικοί τύποι ενδιαιτημάτων όπως λιμνοθάλασσες, δελταϊκά συστήματα, αλυκές, παράκτιες λίμνες και υφάλμυροι υγρότοποι, μεταξύ άλλων (Basset *et al.* 2008). Εξ αιτίας της ιδιαίτερης θέσης επί της ακτογραμμής και των τοπογραφικών, υδρολογικών και γεωμορφολογικών τους γνωρισμάτων, αποτελούν μια μορφή οικοτόνου (ecotone) και ως εκ τούτου χαρακτηρίζονται από σημαντική ενδογενή ετερογένεια και έντονες μεταβολές που εκφράζονται ως πρηνή (διαβαθμίσεις) απομόνωσης (Guelorget & Perthuisot 1983).

Ένας επιπλέον παράγοντας που επιδρά επί των παράκτιων εκβολικών λιμνοθαλασσών, συμβάλλοντας στην ετερογένειά τους, είναι η ανθρωπογενής δραστηριότητα τόσο επί του εδάφους της λεκάνης απορροής, όσο και του υδάτινου αποδέκτη. Η επίδραση αυτή οφείλεται κατά βάση στη γεωργική δραστηριότητα, τις μονάδες υδατοκαλλιέργειας και τον τουρισμό (Vadrucci *et al.* 2008). Ως συνέπεια όλων των ανωτέρω επιδράσεων, τα συστήματα αυτά παρουσιάζουν έντονη διαβάθμιση αβιοτικών (θερμοκρασία, αλατότητα, pH κλπ) και βιοτικών (αφθονία και ποικιλότητα ειδών κλπ) παραμέτρων τόσο στον χώρο (κατά τη μετάβαση από τις ηπειρωτικές προς τις θαλάσσιες περιοχές) όσο και στον χρόνο (ημερήσιες, εποχικές και υπερ-ετήσιες διακυμάνσεις) (Nicolaidou *et al.* 2005, Paerl *et al.* 2005), αποτελώντας με αυτόν τον τρόπο ένα μάλλον σύνθετο «μωσαϊκό» ενδιαιτημάτων, παρά ένα μοναδικό ενδιαίτημα (Tagliapietra & Volpi-Ghirardini 2006).

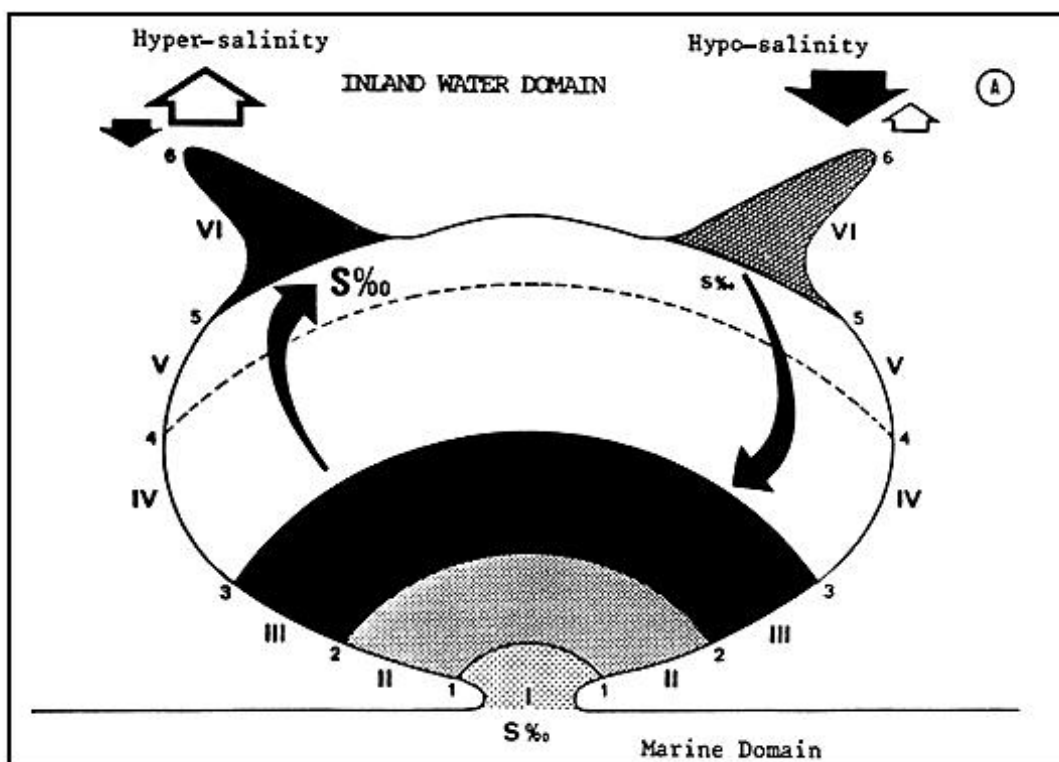
1.2.2. Παράκτιες Εκβολικές Λιμνοθάλασσες

Ανάμεσα στις βασικότερες κατηγορίες παράκτιων μεταβατικών συστημάτων είναι οι λιμνοθάλασσες και τα δελταϊκά συστήματα όπου συνήθως αυτές ανήκουν. Σύμφωνα με τον Kjerfve (1994), ως λιμνοθάλασσες ορίζονται οι “ρηχές υδάτινες διαπλάσεις που διαχωρίζονται από την ανοιχτή θάλασσα μέσω ενός φραγμού και συνδέονται με αυτήν, έστω και με περιοδικώς διακοπτόμενο τρόπο, μέσω ενός ή περισσοτέρων περιορισμένων εισόδων, και συνήθως προσανατολίζονται κατά μήκος της ακτογραμμής”, καταλαμβάνοντας περίπου το 12-13% της παγκόσμιας ακτογραμμής (Barnes 1980, Kjerfve 1994, Bird 2011). Στη Μεσόγειο, οι παράκτιες λιμνοθάλασσες περιορίζονται και συχνά απομονώνονται τελείως («choked» sensu Kjerfve 1994), με μόνη εξαίρεση τις δελταϊκές παράκτιες λιμνοθάλασσες που είναι ανοικτές και έντονα δυναμικές (Bellan 1987).

Οι παράκτιες λιμνοθάλασσες παρουσιάζουν έντονη οριζόντια ζώνωση, η οποία καθορίζεται πρωτίστως από τη διαβάθμιση της αλατότητας (συγκέντρωση αλάτων). Παρά το γεγονός ότι η κάθετη διαστρωμάτωση συνήθως περιορίζεται από το χαμηλό βάθος και την έντονη δράση των ανέμων, η οριζόντια κατανομή της αλατότητας σε συνάρτηση με τις οικολογικές παραμέτρους και τις κατανομές των βιοκοινωνιών δημιουργούν ένα τυπικό πρηνές κατά μήκος του οποίου εμφανίζονται διακριτές ζώνες (Remane & Schlieper 1971, Barnes 1980, Δανιηλίδης 1991, Εικόνα 1):

1) Η “αλμυρή ζώνη” είναι η περιοχή της λιμνοθάλασσας που έχει άμεση επαφή με τη θάλασσα και κατ’ επέκταση είναι η περιοχή που ομοιάζει περισσότερο με τη γειτονική

θάλασσα αλλά και επηρεάζεται από αυτήν, και συνεπώς εκεί επιβιώνουν κατά βάση θαλάσσιοι οργανισμοί.



Εικόνα 1. Οριζόντια ζώνωση κατά μήκος του τυπικού πρानούσ των παράκτιων οικοσυστημάτων της Μεσογείου.

(Τροποποιημένο από <http://www.fao.org/3/S5456E/S5456E02.htm>)

2) Η “υπο-αλώδης” ή “υφάλμυρη ζώνη” είναι η περιοχή που γειτνιάζει με τις απορροές γλυκών υδάτων και συνήθως αποτελεί την πιο σταθερή περιοχή από άποψη συνθηκών. Έχει τη χαμηλότερη επίδραση στην υπόλοιπη λιμνοθάλασσα και είναι κατά έναν βαθμό εφήμερη ή περιοδική, δεδομένου ότι η εμφάνισή της εξαρτάται από την εισροή γλυκών νερών μέσω των κατακρημνίσεων και των ποτάμιων απορροών στο ηπειρωτικό άκρο της λιμνοθάλασσας. Στο άλλο άκρο της περιοχής αυτής εντοπίζεται η υφάλμυρη ζώνη, η οποία αποτελεί τη μετάβαση από τα γλυκά στα αλμυρά ύδατα και παρά τα ασαφή της όρια, η αλατότητα σε αυτήν κυμαίνεται από 5‰ έως 20‰. Στο χαμηλότερο όριο, εμφανίζονται οργανισμοί των γλυκών και υφάλμυρων υδάτων ενώ στο υψηλότερο όριο εμφανίζονται τα αμιγώς θαλάσσια είδη.

3) Η “υπεραλώδης” ή “υπεράλμυρη ζώνη” εμφανίζεται σε ορισμένες λιμνοθάλασσες και η παρουσία της μπορεί να είναι μόνιμη ή παροδική. Το βασικό της χαρακτηριστικό είναι η ιδιαίτερως υψηλή αλατότητα, η οποία προέρχεται πρωτίστως από την εξάτμιση του θαλασσινού νερού σε περιόδους έντονης ξηρασίας, και μπορεί να προκαλεί ακόμη και κρυστάλλωση αλάτων. Στην περιοχή αυτή επιβιώνουν κατά περίπτωση

οργανισμοί οι οποίοι έχουν προσαρμοστεί στην υψηλή αλατότητα και ενδέχεται να έχουν προέλευση είτε από γλυκά είτε από θαλάσσια ύδατα. Ορισμένες ομάδες μικροφυκών που ζουν σε αυτήν την περιοχή ενδέχεται να αναπτύσσουν μεγάλους πληθυσμούς έως και ανθίσεις (blooms) εξ αιτίας της μειωμένης βόσκησης, αφού η εποίκηση της περιοχής από ζωικούς οργανισμούς είναι αρκετά περιορισμένη.

1.3. ΦΥΤΟΠΛΑΓΚΤΟΝ ΜΕΤΑΒΑΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Τα μεταβατικά οικοσυστήματα είναι από τα πλέον παραγωγικά συστήματα παγκοσμίως, αφού αποτελούν περιοχές αναπαραγωγής και διατροφής για έναν μεγάλο αριθμό ειδών ψαριών και πτηνών ενώ ταυτόχρονα παρέχουν μια πληθώρα διαφορετικών ενδαιτημάτων στα οποία επιβιώνουν διάφορα είδη φυτικών και ζωικών οργανισμών (Perez-Ruzafa *et al.* 2011). Η μεταβλητότητα των συστημάτων αυτών έχει άμεση επίδραση επί της βιοτικής συνιστώσας και ιδιαίτερος επί των κοινωνιών του φυτοπλαγκτού. Η επίδραση αυτή είναι εμφανής στους ρυθμούς αναπαραγωγής, αύξησης και επιβίωσης καθώς και στη δυναμική της ποικιλότητας του φυτοπλαγκτού, το οποίο καταδεικνύει άμεση απόκριση στις αβιοτικές παραμέτρους (Lucas *et al.* 1999, Ferreira *et al.* 2005, Paerl *et al.* 2005, Zingone *et al.* 2010, Cloern *et al.* 2016).

Το φυτοπλαγκτόν των παράκτιων λιμνοθαλασσών αποτελείται ως επί το πλείστον από μικροφύκη μεγέθους 0,2 - 20 μm (νανο- και πικο-πλαγκτόν), και οι συνηθέστερες ομάδες μικροφυκών που απαντώνται εκεί είναι τα Διάτομα (κλάση Bacillariophyceae), Κυανοβακτήρια (φύλο Cyanobacteria), Δινομαστιγωτά (κλάση Dinophyceae), Χλωροδενδροφύκη (κλάση Chlorodendrophyceae), Κρυπτοφύκη (κλάση Cryptophyceae), καθώς και αρκετές ομάδες Χλωροφυκών (κλάση Chlorophyceae) (Δανιηλίδης 1991, Hasle & Tomas 1997, Bec *et al.* 2005, Jacquet *et al.* 2006, Vadrucchi *et al.* 2008). Οι οργανισμοί αυτοί ενδέχεται να έχουν προέλευση από θαλάσσια ή γλυκά ύδατα οπότε και είναι προσαρμοσμένοι σε απότομες διακυμάνσεις περιβαλλοντικών παραμέτρων και κυρίως της αλατότητας (Jackson *et al.* 1987, Devassy & Goes 1988, Muylaert *et al.* 2009). Στις λιμνοθάλασσες με υπεράλμυρα ύδατα απαντώνται είδη προσαρμοσμένα σε ακραίες τιμές αλατότητας (Borowitzka 1981, Gilabert 2001, Oren 2005, Quigg *et al.* 2013, El-Kassas *et al.* 2016).

Εξ αιτίας των έντονων χρονικών και χωρικών διαβαθμίσεων αλατότητας, θερμοκρασίας και διαλυμένου οξυγόνου, αλλά και των ανθρωπογενών πιέσεων, τα περιβάλλοντα αυτά χαρακτηρίζονται ως “αντίξοα” οικοσυστήματα (harsh ecosystems)

τόσο για τους φυτικούς όσο και για τους ζωικούς οργανισμούς (Basset *et al.* 2008, Barbone & Basset 2010). Ωστόσο, σε αυτά τα περιβάλλοντα όπου η καταπόνηση είναι βασικό στοιχείο, η βιοτική συνιστώσα φαίνεται να έχει προσαρμοστεί κατάλληλα ώστε να ανταπεξέρχεται βοηθώντας ακόμη και το ίδιο το σύστημα να αντιμετωπίζει την καταπόνηση (Elliot & Quintino 2007). Τα μικροφύκη των μεταβατικών συστημάτων εμφανίζουν ορισμένες ιδιότητες, οι οποίες τους επιτρέπουν όχι μόνο να επιβιώνουν αλλά και να εκμεταλλεύονται την ιδιαίτερη φύση του περιβάλλοντος όπου διαβιούν. Ανάμεσα στις ιδιότητες αυτές είναι το μικρό μέγεθος (δηλ. μικρή αναλογία επιφάνειας/όγκο), οι υψηλοί ρυθμοί αύξησης και αναπαραγωγής, τα ευρέα όρια ανοχής σε διάφορους περιοριστικούς αβιοτικούς παράγοντες (αλατότητα, θερμοκρασία, συγκέντρωση ανόργανων ουσιών κ.α.), με αποτέλεσμα οι οργανισμοί να αποκρίνονται ταχύτερα και αποτελεσματικότερα στις απότομες διακυμάνσεις και διαταραχές που χαρακτηρίζουν τα μεταβατικά υδατικά οικοσυστήματα εμφανίζοντας έναν ευκαιριακό (opportunistic) χαρακτήρα (Margalef 1978, Reynolds 1997, Ferreira *et al.* 2005).

Τα μεταβατικά συστήματα είναι ιδιαίτερος παραγωγικά περιβάλλοντα, στα οποία αναπτύσσονται βιοκοινότητες με σημαντική ποικιλότητα αλλά και πολύπλοκους μηχανισμούς αυτο-ρύθμισης (Pérez-Ruzafa *et al.* 2019). Η ετερογένεια και οι απότομες διαβαθμίσεις αβιοτικών παραμέτρων αντικατοπτρίζονται σε μεγάλο βαθμό στην ετερογένεια της βιοτικής συνιστώσας, επηρεάζοντας την κατανομή της αφθονίας και της ποικιλότητας του φυτοπλαγκτού στον χώρο και τον χρόνο (Vadrucci *et al.* 2008). Αυξημένη ένταση και απότομη μεταβολή των αβιοτικών παραμέτρων σε ένα τέτοιο σύστημα είναι δυνατόν να διαταράξει την ισορροπία της βιοτικής συνιστώσας του προκαλώντας διακυμάνσεις στην αφθονία των πληθυσμών που την αποτελούν, οδηγώντας στην κυριαρχία ενός ή ορισμένων εξ αυτών (Folke *et al.* 2004).

Η αφθονία του λιμνοθαλάσσιου φυτοπλαγκτού φαίνεται να ακολουθεί, συνήθως, ένα εποχικό πρότυπο διακύμανσης που χαρακτηρίζεται από μία κορύφωση (peak) της αύξησης των φυτοπλαγκτικών πληθυσμών στις αρχές της άνοιξης με τις αντίστοιχες βιοκοινωνίες να αποτελούνται κυρίως από είδη Διατόμων, και μια μικρότερη κορύφωση κατά τη φθινοπωρινή περίοδο με πληθυσμούς αποτελούμενους από μικρότερες ομάδες οργανισμών (νανο- και πικο-πλαγκτόν) (Furnas & Mitchell 1986, Gilabert 2001, Bec *et al.* 2005, Pérez-Ruzafa *et al.* 2011). Εξ άλλου, η γεωγραφική θέση ενός συστήματος φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ποικιλότητα του φυτοπλαγκτού τόσο χρονικά όσο και χωρικά, δεδομένου ότι καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την απόκριση στις κλιματικές διακυμάνσεις, επηρεάζοντας έτσι όχι μόνο τις αβιοτικές παραμέτρους ενός οικοσυστήματος, αλλά και την ταξινομική κατανομή των

οργανισμών σε αυτό (Benson *et al.* 2000, Quinlan & Philips 2003, Vadrucchi *et al.* 2008). Αυτό αποτελεί ίσως μια ένδειξη ότι οι βιοκοινωνίες που απαντώνται σε ένα συγκεκριμένο σύστημα προσαρμόζονται εξελικτικά στις ιδιαίτερες τοπικές συνθήκες του συστήματος αυτού (Whittaker *et al.* 2001, Roselli & Basset 2015, Morabito 2018).

1.4. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ

Ο όρος “μικροφύκη” αναφέρεται σε μια πληθώρα μονοκύτταρων ή αποικιακών, πρωτίστως φωτοσυνθετικών, οργανισμών μικρού μεγέθους (0,2-200 μm). Πρόκειται για μια παραφυλετική, μη-συστηματική μονάδα στην οποία περιλαμβάνονται αρκετές κλάσεις φυκών όπως τα Διάτομα, Δινομαστιγωτά, Χλωροφύκη και τα Χρυσοφύκη μεταξύ άλλων, καθώς και οι φωτοσυνθετικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί (Κυανοβακτήρια και Προχλωρόφυτα). Τα μικροφύκη παρουσιάζουν όλα τα γενικά γνωρίσματα των φυκών (φυτικοί υδρόβιοι οργανισμοί που δεν φέρουν γνήσιες ρίζες, βλαστούς, φύλλα και άνθη, βλ. International Code of Botanical Nomenclature, Vienna Code, McNeill *et al.* 2006) και είναι μια ευρύτερη ομάδα που συμπεριλαμβάνει όλους τους μονοκύτταρους φωτοσυνθετικούς μικρο-οργανισμούς. Αναπτύσσονται ως επί το πλείστον σε υδατικά ενδιαιτήματα (αλμυρά, υφάλμυρα και γλυκά ύδατα) αλλά και σε υγρούς χερσαίους βιοτόπους (π.χ. Hoffmann 1989, van den Hoek *et al.* 1995, Metting 1996, Budel 2011) και είναι κατά κανόνα κοσμοπολιτικοί οργανισμοί αν και έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις ενδημισμού (π.χ. Tyler 1996). Τα μικροφύκη, ως ομάδα, αριθμούν χιλιάδες αναγνωρισμένων ειδών, ενώ θεωρείται ότι υπάρχουν έως και εκατοντάδες χιλιάδες ειδών που δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί (Andersen 1992, Norton *et al.* 1996, Potter *et al.* 1997).

Η έρευνα επί των μικροφυκών εστιάζεται κυρίως στην οικολογία και τη βιοτεχνολογία. Από οικολογικής απόψεως, τα μικροφύκη αποτελούν την παραγωγική βάση πολλών υδατικών οικοσυστημάτων ενώ οι εποχικές και γεωγραφικές κατανομές του φυτοπλαγκτού αποτελούν τη βάση για τη διερεύνηση των φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών που διέπουν τα συστήματα αυτά, είτε πρόκειται για μικρές λίμνες, είτε για ολόκληρους ωκεανούς (π.χ. Bardach *et al.* 1972, Vadrucchi *et al.* 2008, Sellami *et al.* 2016, Salgado-Hernanz *et al.* 2019, Kocum *et al.* 2020). Τα μικροφύκη αποτελούν αντικείμενο ενδιαφέροντος για πολλούς επίκαιρους τομείς όπως η κλιματική αλλαγή (π.χ. Beardall & Raven 2004, Beardall & Stojkovic 2006, Streftaris & Zenetos 2009, Hallegraeff 2010, Li *et al.* 2016, Paul *et al.* 2016, Stefanidou *et al.* 2018) και η εκτίμηση της οικολογικής κατάστασης των υδάτινων πόρων (π.χ. Katsiapi *et al.*

2011, Vasileiadou *et al.* 2016, Petala *et al.* 2018, Herrero *et al.* 2019) μεταξύ άλλων. Το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον των μικροφυκών εστιάζεται κυρίως στην παραγωγή μεταβολιτών από μικροφύκη (ω -3 λιπαρά οξέα, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και δευτερογενείς μεταβολίτες), οι οποίοι δύνανται να χρησιμοποιηθούν σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας όπως η φαρμακοβιομηχανία και η βιομηχανία τροφίμων (π.χ. Metting 1996, Brown *et al.* 1997, Sing *et al.* 2005, Rosenberg *et al.* 2008, Guedes *et al.* 2015, Lefranc *et al.* 2019). Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια έντονο είναι το ενδιαφέρον για την παραγωγή ανανεώσιμων πηγών ενέργειας και βιοκαυσίμων, τη βιο-εξυγίανση αποβλήτων αλλά τη σύζευξη των προαναφερθέντων εφαρμογών (ταυτόχρονη παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας, βιομάζας και ενέργειας) με τη χρήση των μικροφυκών (π.χ. Martinez-Porchas *et al.* 2014, Mohan *et al.* 2014, Klinthong *et al.* 2015, Randrianarison & Ashraf 2017, Figueroa *et al.* 2018, Khan *et al.* 2018, Kumar & Buddolla 2019, Zullaikah *et al.* 2019).

1.5. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Η απαρχή της ταξινόμησης των μικροφυκών μπορεί να αναζητηθεί στα μέσα του 19^{ου} αιώνα όταν ο Γερμανός Kützing (1843) παρατήρησε τις μικροσκοπικές διαφορές μεταξύ κυτάρων διατόμων και χαροφυκών, και ο Σουηδός βοτανολόγος Nägeli (1849) περιέγραψε για πρώτη φορά μικροσκοπικά πράσινα κύτταρα τα οποία αναπτύσσονταν σε υγρά περιβάλλοντα (βλ. Tragin *et al.* 2016). Κατά την περίοδο εκείνη οι οργανισμοί κατατάσσονταν με βάση τη μορφολογία τους είτε στους ζωικούς είτε στους φυτικούς οργανισμούς. Το 1860, ο Βρετανός βιολόγος Hogg δημιούργησε το βασίλειο "Protoctista" (Regnum Primigenum) για να περιγράψει οργανισμούς που θεωρούσε ότι προηγήθηκαν των φυτών και των ζώων. Ωστόσο, ήταν ο Haeckel (1894) εκείνος που καθιέρωσε το βασίλειο των Πρωτίστων, το οποίο συμπεριελάμβανε και τα μικροφύκη. Κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα πραγματοποιήθηκαν σημαντικές ανακαλύψεις και περιγραφές μικροφυκών με πλέον εξέχουσα την έρευνα του Butcher, ο οποίος εργάστηκε συστηματικά για την αναγνώριση και περιγραφή της ποικιλότητας των μικροφυκών των ποταμών της Βρετανίας, δημοσιεύοντας περί τις 50 εργασίες από το 1924 έως το 1967 (βλ. Parke 1972). Μία από τις σημαντικότερες συνεισφορές του ήταν η περιγραφή του πρώτου πικο-ευκαρυωτικού κυττάρου *Micromonas pusilla* (Butcher) Manton & Parke 1960 (τότε *Chromulina pusilla*, Butcher 1952). Για πολλά χρόνια, τα μικροφύκη είχαν ενταχθεί σε διαφορετικά βασίλεια, με τα Χλωρόφυτα να κατατάσσονται στα φυτά αφού θεωρήθηκαν πρόγονοι των ανώτερων φυτών

(Copeland 1956). Ωστόσο, βασιζόμενοι σε μορφολογικά στοιχεία και στοιχεία της λεπτής δομής οι Mattox & Stewart διέκριναν τα χλωρόφυτα σε τέσσερις ομάδες (Prasinophyceae, Charophyceae, Ulvophyceae και Chlorophyceae, sensu Stewart & Mattox 1978).

Με την έλευση των μοριακών μεθόδων και της χημειοταξινομικής και τη χρήση νέων δεδομένων, η ταξινόμηση των μικροφυκών αναθεωρείται συνεχώς. Με βάση τις σύγχρονες θεωρήσεις, το φύλο Chlorophyta αποτελείται από δύο ευρύτερες ομάδες, τα πρασινόφυτα (ή πρασινοφύκη, prasinophytes) και τα βασικά χλωρόφυτα (“core” chlorophytes), χωρίς αυτές να αποτελούν ταξινομικές μονάδες αλλά περιλαμβάνουν ταξινομικές μονάδες που συνδέονται βάσει όχι μόνο μορφολογίας αλλά και καταγωγής (Guillou *et al.* 2004, Viprey *et al.* 2008, Marin & Melkonian 2010, Leliaert *et al.* 2012, Marin 2012, Fučíková *et al.* 2014a). Η κατάταξη των Mattox & Stewart, ωστόσο, επιβεβαιώθηκε σε μεγάλο βαθμό από νεότερα δεδομένα (Champan *et al.* 1998) με σημαντική εξαίρεση τα Prasinophyceae, τα οποία όπως απεδείχθη είχαν παραφυλετική προέλευση (βλ. Κεφάλαιο 1.10.1).

Παραδοσιακά, η ταξινόμηση των φυκών πραγματοποιείται με μεθόδους που βασίζονται σε μορφολογικούς χαρακτήρες, καθώς και σε στοιχεία του κύκλου ζωής και της φυσιολογίας του κυττάρου (Darienko *et al.* 2015). Ωστόσο, η απλότητα της μορφολογίας των μικροφυκών περιορίζει σε έναν βαθμό το πλήθος των διαγνωστικών στοιχείων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταξινομική διάκριση, κυρίως σε χαμηλότερο ταξινομικό επίπεδο (Manoylon 2014). Η μορφολογική παρατήρηση πραγματοποιείται σε ζωντανό ή στερεωμένο υλικό με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου σε μεγεθύνσεις 100x έως 1000x και εξειδικευμένων ταξινομικών κλειδών και πρωτοκόλλων, ενώ απαιτεί εκπαίδευση και επιστημονική εξειδίκευση (Fitzpatrick *et al.* 1998, Stevenson & Bahls 1999, Moulton *et al.* 2002, APHA 2012). Για την πιο ενδελεχή μελέτη των χαρακτηριστικών της λεπτής δομής των μικροσκοπικών κυττάρων των μικροφυκών, συχνά απαιτείται η χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM) χρησιμοποιείται για τη μελέτη των εσωτερικών γνωρισμάτων των κυττάρων, ενώ η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) αποκαλύπτει συνήθως τα εξωτερικά γνωρίσματα των κυττάρων μετά από κατάλληλη προετοιμασία (Morales *et al.* 2001).

Η χρήση μοριακών τεχνικών έφερε μια νέα εποχή στην ταξινόμηση και τη συστηματική των μικροφυκών. Η στόχευση και ανάλυση των αλληλουχιών συγκεκριμένων γονιδίων αλλά και η αλληλούχιση περιβαλλοντικών δειγμάτων,

αποκάλυψαν νέα δεδομένα και οδήγησαν στην περιγραφή πολλών νέων ταξινομικών μονάδων (π.χ. Rusch *et al.* 2007, Škaloud & Rindi 2013, Fučíková *et al.* 2014b). Η δραματική αυτή αύξηση των μοριακών δεδομένων οδήγησε στην ανάπτυξη της μοριακής ταξινομικής (molecular taxonomy ή DNA taxonomy), η οποία χρησιμοποιεί την εξελικτική ιστορία των οργανισμών - όπως αυτή αποκαλύπτεται από τη σύγκριση του γονιδιώματός τους - για τον καθορισμό των ορίων των ταξινομικών μονάδων (Vogler & Monaghan 2007). Φυσικό επακόλουθο της συσσώρευσης μοριακών δεδομένων ήταν η δημιουργία συλλογών και βάσεων όπως η GenBank, σκοπός των οποίων είναι η αποθήκευση και ταξινόμηση των δεδομένων αυτών ώστε να είναι διαθέσιμα στην επιστημονική κοινότητα (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, Benson *et al.* 2017).

Η ανάγνωση του γονιδιώματος κατέστη δυνατή μέσω της εφεύρεσης της τεχνικής «αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης» (Polymerase Chain Reaction, PCR) από τον Kary Mullis τη δεκαετία του '80 (βλ. Garcia & Ma 2005). Κατά τη διαδικασία της PCR, γίνεται ενίσχυση και πολλαπλασιασμός του επιλεγμένου τμήματος DNA με τη χρήση του ενζύμου DNA πολυμεράση (καταλύει την αντιγραφή του DNA) και εξειδικευμένων εκκνητιών (τμήματα DNA που συνδέονται με την αλληλουχία-στόχο και προσδένουν το ένζυμο της πολυμεράσης). Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τμήματα RNA (π.χ. Lane *et al.* 1985, Wheeler & Honeycutt 1988, Ash *et al.* 1991), ωστόσο αυτά γρήγορα αντικαταστάθηκαν από τμήματα DNA. Το γονίδιο *rbcl*, το οποίο κωδικοποιεί για τη μεγάλη υπομονάδα του φωτοσυνθετικού ενζύμου RUBISCO (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase), άρχισε να χρησιμοποιείται αρκετά στη μελέτη της φυλογένεσης των φυτικών οργανισμών μετά το 1990 (π.χ. Freshwater *et al.* 1994, Manhart 1994, Daugbjerg & Andersen 1997), ενώ οι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον στις μοριακές αναλύσεις των μικροφυκών σήμερα είναι τα ριβοσωμικά γονίδια (rDNA), δηλ. τα γονίδια που κωδικοποιούν για το ριβοσωμικό rRNA (π.χ. Ali *et al.* 2001, Buchheim *et al.* 2017, dos Santos *et al.* 2017, Liu *et al.* 2020). Τα γονίδια αυτά είναι ιδανικά για μελέτες μοριακής συστηματικής, γιατί περιέχονται σε πολλά αντίγραφα στο ευκαρυωτικό γονιδίωμα και οι αλληλουχίες τους περιέχουν περιοχές χαμηλής διαφοροποίησης αναμειγμένες με περιοχές υψηλής διαφοροποίησης, ο ρυθμός εξέλιξης των οποίων είναι αρκετά αργός ώστε να τα καθιστά κατάλληλα για τέτοιου είδους μελέτες (Soltis & Soltis 1998, Prokopyowich *et al.* 2003, Smit *et al.* 2007, Leliaert *et al.* 2012).

Η συνεχής εισροή μοριακών δεδομένων απεκάλυψε ότι τα μορφολογικά στοιχεία δεν είναι πάντα επαρκή για την περιγραφή και τον σαφή διαχωρισμό των ταξινομικών

μονάδων (Bickford *et al.* 2007). Αυτό γίνεται ακόμη πιο έντονο όσο μειώνεται το μέγεθος και η μορφολογική πολυπλοκότητα των οργανισμών που διερευνώνται (Whittaker *et al.* 2005, Verbruggen *et al.* 2009). Σε πολλές περιπτώσεις η μοριακή ταξινόμηση οδήγησε στην αποκάλυψη “κρυπτικών ειδών” (cryptic species), δηλαδή ειδών που με βάση την κλασική ταξινόμηση εντάχθηκαν λανθασμένα σε άλλες ταξινομικές μονάδες, γεγονός που ενισχύει ακόμη περισσότερο την άποψη ότι οι μορφολογικές παρατηρήσεις δεν επαρκούν για την σαφή ταυτοποίηση των μικροφυκών (Pröschold & Leliaert 2007, Moniz *et al.* 2012, Fučíková *et al.* 2014a, Škaloud *et al.* 2015). Τα τελευταία χρόνια οι ταξινομικές και φυλογενετικές μελέτες εστιάζουν μάλλον στον συνδυασμό των κλασικών και σύγχρονων μεθόδων ταξινόμησης (π.χ. Drummond *et al.* 2005, Manoylov *et al.* 2009, Leliaert *et al.* 2012, Kermarrec *et al.* 2013, Fučíková *et al.* 2014a) σε μια προσπάθεια να διασαφηνιστεί η εξελικτική καταγωγή και η φυλογένεση των μικροφυκών. Ο Butcher δήλωσε το 1952 ότι “οι συγγένειες των πιο κοινών μικροσκοπικών μαστιγωτών παραμένουν ασαφείς” (βλ. Parke 1972) κάτι που ισχύει μέχρι σήμερα, καθιστώντας την ταξινομική και φυλογενετική έρευνα επί των μικροφυκών σημείο μείζονος ενδιαφέροντος.

1.6 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Η καλλιέργεια των μικροφυκών συνίσταται στη διατήρηση και ανάπτυξη οργανισμών που προέρχονται από δειγματοληψία πεδίου, στο εργαστήριο (in vitro) ή στο πεδίο (in situ), υπό σταθερές συνθήκες, και είναι ζωτικής σημασίας για την εκτενή μελέτη και τον πειραματισμό επί της πολυποίκιλης αυτής ομάδας μικροσκοπικών οργανισμών. Ιστορικά, η πρώτη καταγεγραμμένη προσπάθεια “καλλιέργειας” (cultivation) μικροφυκών ήταν εκείνη του Γερμανού βακτηριολόγου Cohn (1850), ο οποίος κατάφερε να διατηρήσει το μονοκύτταρο μαστιγωτό *Haematococcus* Flotow 1844 nom. et typ. cons. (Chlorophyceae). Ωστόσο, ήταν ο Ρώσος Famintzin (1871) εκείνος που χρησιμοποίησε πρώτος “θρεπτικό διάλυμα” με τη μορφή διαλύματος ανόργανων αλάτων, για να αναπτύξει μικροφύκη χρησιμοποιώντας μια συνταγή θρεπτικών του Κνορ (βλ. Bold 1942) που προοριζόταν για ανώτερα φυτά (βλ. Andersen 2005). Κατά τη διάρκεια του 20^{ού} αιώνα η καλλιέργεια των φυκών έγινε πραγματικότητα και αποτελεί ένα από τα βασικά στοιχεία της έρευνας, συνδέοντας τη Φυκολογία με τη Μικροβιολογία. Η επίτευξη των αξενικών καλλιεργειών (καλλιέργειες ελεύθερες βακτηρίων) αλλά και των μονοκαλλιεργειών (καλλιέργειες με μόνο έναν οργανισμό) έφερε επανάσταση στην έρευνα και τον πειραματισμό επί των μικροφυκών

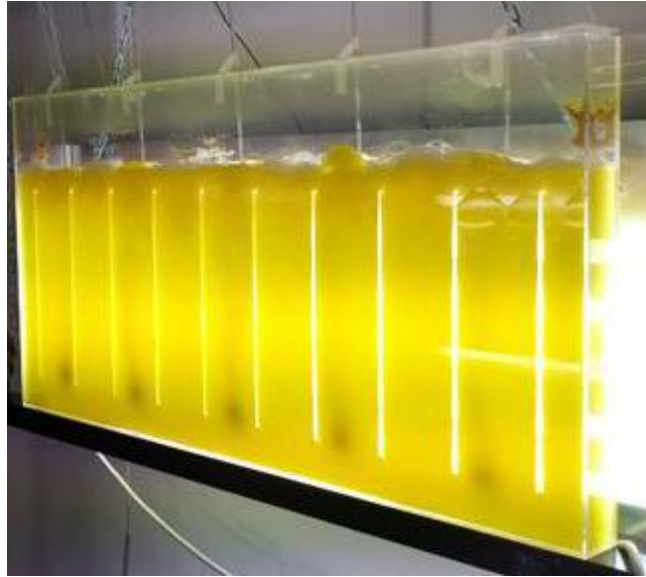
καθιστώντας δυνατή όχι μόνο τη συντήρηση αλλά και την ανάπτυξή τους στο εργαστήριο, σε πληθυσμιακά μεγέθη που προσφέρουν στους επιστήμονες τη δυνατότητα να διερευνήσουν αλλά και να πειραματιστούν, με αποτέλεσμα μια τεράστια πρόοδο στη μελέτη των μικροφυκών.

Τα μικροφύκη είναι δυνατόν να καλλιεργούνται σε μικρή (μερικά mL) ή μεγαλύτερη (λίτρα) κλίμακα, τόσο στο εργαστήριο όσο και στο πεδίο. Οι εργαστηριακές καλλιέργειες ενδέχεται να είναι αξενικές ή όχι, μονοκαλλιέργειες, ή πολυκαλλιέργειες (καλλιέργειες που περιέχουν πολλούς διαφορετικούς οργανισμούς), υγρής ή στερεάς (σε άγαρ ή χώμα) μορφής, ή ακόμη και πολυφασικές (χρήση διαφορετικών τύπων υποστρώματος στην ίδια καλλιέργεια) ανάλογα με το αντικείμενο και τους στόχους μελέτης (βλ. και Pringsheim 1946, Andersen 2005, Lorenz *et al.* 2005, Zhong *et al.* 2012). Οι καλλιέργειες πεδίου είναι συνήθως μονοκαλλιέργειες (με εξαίρεση τους μεσοκόσμους και τις πολυκαλλιέργειες για παραγωγή βιοκαυσίμων) αλλά όχι αξενικές διότι η πλήρης απομόνωση των μικροφυκών είναι πρακτικά αδύνατη σε υπαίθριους χώρους λόγω επαφής με τον ατμοσφαιρικό αέρα (Suh & Lee 2003, Sierra *et al.* 2008, Wang *et al.* 2012). Βάσει του ρυθμού ανανέωσης των θρεπτικών ουσιών, οι καλλιέργειες ενδέχεται να είναι στατικές (batch, χωρίς ανανέωση), ημι-συνεχείς (semi-continuous, ανανέωση μιας συγκεκριμένης ποσότητας σε τακτά χρονικά διαστήματα), ή συνεχείς (continuous, συνεχής ανανέωση μέσω συστημάτων συνεχούς ροής). Τέλος, βάσει της τροφικής κατάστασης των καλλιεργούμενων οργανισμών οι καλλιέργειες διακρίνονται σε αυτότροφες (σε ανόργανα υποστρώματα), ετερότροφες (σε οργανικά υποστρώματα) ή ημι-αυτότροφες (συνδυασμός οργανικών και ανόργανων υποστρωμάτων, βλ. Andersen 2005).

Η καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε εργαστηριακό επίπεδο πραγματοποιείται συνήθως σε μικρούς πληθυσμούς που προέρχονται από κύτταρα απομονωμένα από φυσικά δείγματα, και οι οποίοι διατηρούνται σε υάλινα (δοκιμαστικούς σωλήνες ή φιάλες Erlenmeyer διαφόρων μεγεθών) ή πλαστικά (π.χ. δοχεία Nalgene) δοχεία. Η καλλιέργεια στο ύπαιθρο πραγματοποιείται σε δεξαμενές αποτελούμενες από σκυρόδεμα ή πλαστικό, ή σε ρηχές χωμάτινες λίμνες με πλαστική επένδυση (Δολαψάκης 2008). Η συνήθης πρακτική στη βιομηχανία είναι καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας σε δεξαμενές σκυροδέματος (raceway ponds), συνήθως σε υπαίθριες εγκαταστάσεις, οι οποίες δεν επιτρέπουν τον πλήρη έλεγχο των συνθηκών καλλιέργειας και βασίζονται στο φυσικό φώς (Terry & Raymond 1985, Borowitzka 1999, Sierra *et al.* 2008, Chiaramonti *et al.* 2013). Ωστόσο, σε αρκετές περιπτώσεις για βιομηχανικής-κλίμακας καλλιέργειες χρησιμοποιούνται ειδικές εγκαταστάσεις σε εσωτερικό χώρο ώστε να αποφεύγονται κατά το δυνατόν οι επιμολύνσεις από την

ατμόσφαιρα αλλά και επειδή ενδέχεται να απαιτούνται ειδικές συνθήκες παραγωγής (π.χ. συνθήκες αερισμού και ανάδευσης, αυτοματοποίηση εξαγωγής της βιομάζας, συστήματα συνεχούς ροής) ανάλογα με το προϊόν (π.χ. Molina *et al.* 2001, Huang *et al.* 2017, Vo *et al.* 2019). Ο βασικός στόχος των βιομηχανικής-κλίμακας καλλιέργειών είναι η βέλτιστη παραγωγή βιομάζας πρωτίστως σε ποσοτικό αλλά και σε ποιοτικό επίπεδο (Molina *et al.* 2001). Η καλλιέργεια μικροφυκών για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες (διατροφή εμπορικής σημασίας ιχθύων, διθύρων, καρκινοειδών και ζωοπλαγκτού) απαιτεί αρκετά απλούστερες εγκαταστάσεις σε σχέση με την καλλιέργεια που αποσκοπεί στην παραγωγή υψηλής-αξίας προϊόντων (π.χ. χρωστικών και λιπιδίων) (π.χ. Jimenez *et al.* 2003, Carvalho *et al.* 2006, Mohemani & Borowitzka 2006). Η τελευταία χρήζει ιδιαίτερης προσοχής και ειδικών εγκαταστάσεων επειδή η ποσότητα και η ποιότητα της παραγόμενης βιομάζας είναι εξ ίσου σημαντικές (Goldman 1979, Borowitzka & Borowitzka 1988, Borowitzka 1990, Dolapsakis 1997, Tseng 2001, Andersen 2005). Τα τελευταία χρόνια, με την έκρηξη του ενδιαφέροντος για την παραγωγή βιοκαυσίμων με τη χρήση μικροφυκών, διερευνήθηκε η βελτιστοποίηση της απόδοσης, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ειδικών συστημάτων αυτότροφης ανάπτυξης μικροφυκών, γνωστών ως κλειστοί φωτο-βιοαντιδραστήρες (photo-bio reactors, PBR, Εικόνα 2) (π.χ. Masojídek *et al.* 2003, Huang *et al.* 2017, Kwon & Yeom 2017). Τα συστήματα αυτά εμφανίζουν σαφή πλεονεκτήματα σε σχέση με τα ανοιχτά συστήματα (μειωμένες πιθανότητες μόλυνσεων, ελάχιστες απώλειες νερού και CO₂, καλύτερος έλεγχος συνθηκών, αυξημένη παραγωγικότητα) αλλά ταυτόχρονα είναι οικονομικώς κοστοβόρα λόγω των αναγκών καθαρισμού και ψύξης του συστήματος και του αυξημένου ελέγχου των συνθηκών (Issarapayup *et al.* 2011, Yadala & Cremaschi 2014, Huang *et al.* 2017). Ωστόσο, η αυξημένη προσπάθεια για βελτιστοποίηση των συστημάτων αυτών, θεωρείται ότι θα επιτύχει την υπέρβαση του προβλήματος του οικονομικού κόστους (Oilgae 2010, Dogaris *et al.* 2015).

Η καλλιέργεια των μικροφυκών είναι μια διαδικασία που απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή όχι μόνο όσον αφορά στην εκτέλεση αλλά επίσης στον σχεδιασμό και την παρακολούθηση του όλου εγχειρήματος, δηλ. από την επιλογή και την απομόνωση του οργανισμού (ή των οργανισμών) που θα καλλιεργηθούν, μέχρι την εκτίμηση και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και των μετρήσεων. Απαιτείται λοιπόν εκτενής έρευνα, εξάσκηση και εξειδίκευση ώστε οι χρησιμοποιούμενες τεχνικές και οι πρακτικές κατά τα διάφορα στάδια της διαδικασίας (ιδίως όταν πρόκειται για πειραματικές διατάξεις) να επιφέρουν το επιθυμητό και βέλτιστο αποτέλεσμα (Richmond 2004, Richmond & Becker 2017). Η απομόνωση των μικροοργανισμών με

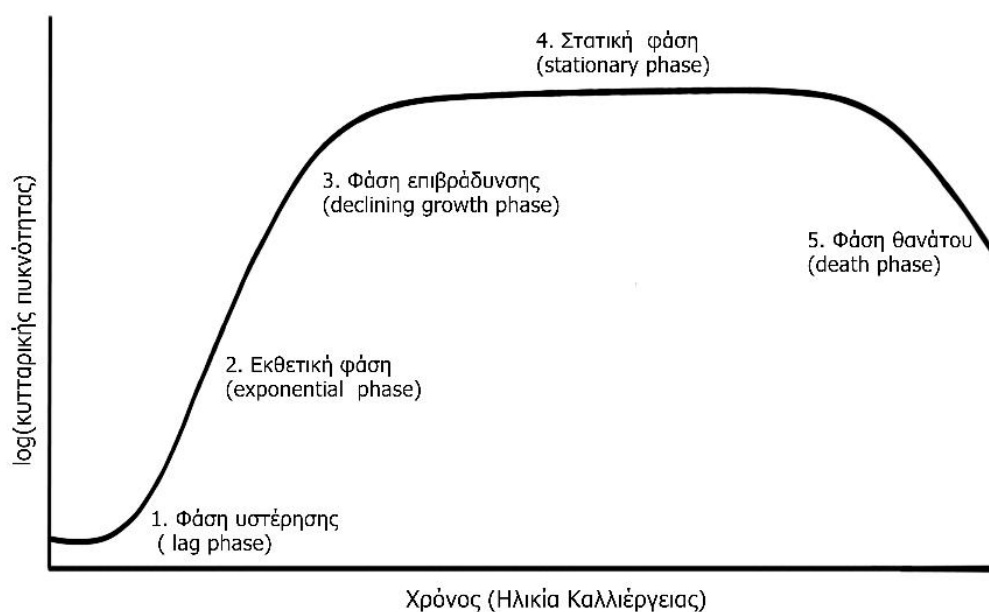


Εικόνα 2. Φωτοβιοαντιδραστήρας (PBR) τύπου flat panel στον θάλαμο καλλιέργειών της Τράπεζας AthU-AI, Τομέας Οικολογίας και Ταξινομικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ.

τη μέθοδο της μικρο-πιπέτας (τριχοειδής απορρόφηση, βλ. Phang & Chu 1999) είναι η πιο χρονοβόρα αλλά και η πλέον αποτελεσματική όσον αφορά στην ανάπτυξη μονοκαλλιιεργειών και αξενικών καλλιιεργειών, διότι είναι και εκείνη που επιτρέπει τη διατήρηση - κατά το δυνατόν - ασηπτικών συνθηκών και καθαρότητας στην τελική καλλιέργεια. Η επιλογή του θρεπτικού μέσου και των συνθηκών καλλιέργειας (θερμοκρασία, αλατότητα, pH, φωτεινή ακτινοβολία, φωτοπερίοδος κλπ) είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση και ανάπτυξη των οργανισμών και θα πρέπει να γίνεται πάντα με γνώμονα τις απαιτήσεις του οργανισμού (Andersen 2005). Η χρήση των κατάλληλων υλικών, δοχείων και τεχνικών είναι επίσης από τα βασικά στοιχεία που καθορίζουν την επιτυχία της καλλιέργειας. Ωστόσο, ίσως το πιο κρίσιμο στάδιο της διαδικασίας, είναι η παρακολούθηση της καλλιέργειας. Ανεξάρτητα από τους στόχους της έρευνας ή της παραγωγικής διαδικασίας, η καλλιέργεια είναι ένας ζωντανός οργανισμός που αναπτύσσεται ταχύτατα και η ανάπτυξη αυτού επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τις συνθήκες του περιβάλλοντος και τις πιθανότητες επιβίωσής του (Meireles *et al.* 2002, Havlik *et al.* 2013). Οι στατικές καλλιέργειες (batch cultures) των μικροφυκών κανονικά ακολουθούν μια κλασική σιγμοειδή καμπύλη μικροβιακής ανάπτυξης (Εικόνα 3) με διάφορα στάδια (Myers 1962, Richmond & Hu 2013, Kim & Chojnacka 2015):

- Φάση υστέρησης: αρχικά η καλλιέργεια αναπτύσσεται με πολύ χαμηλούς ρυθμούς καθώς οι οργανισμοί προσαρμόζονται στις συνθήκες του μέσου καλλιέργειας,

- Εκθετική (λογαριθμική) φάση: η καλλιέργεια αναπτύσσεται με ταχείς ρυθμούς επιτυγχάνοντας τον μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης,
- Φάση επιβράδυνσης: ο ειδικός ρυθμός αύξησης της καλλιέργειας αρχίζει να ελαττώνεται σταδιακά έως ότου μηδενιστεί (η καλλιέργεια συνεχίζει να αυξάνεται αλλά με συνεχώς μειούμενο ρυθμό),
- Στατική φάση: ο ειδικός ρυθμός αύξησης της καλλιέργειας έχει μηδενιστεί και η καλλιέργεια παραμένει σταθερή (δηλ. χωρίς αύξηση ή μείωση της βιομάζας) για κάποιο χρονικό διάστημα ανάλογα με τον οργανισμό,
- Φάση θανάτου: η έλλειψη τροφής, ο συνωστισμός των κυττάρων και πιθανώς η αυξημένη συγκέντρωση δυνητικά τοξικών μεταβολιτών στο θρεπτικό μέσον έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση της κυτταρικής πυκνότητας της καλλιέργειας και τον επακόλουθο θάνατο αυτής.



Εικόνα 3. Σιγμοειδής καμπύλη αύξησης κλειστής (batch) καλλιέργειας μικροφυκών.

Η συγκομιδή της βιομάζας, είτε για ερευνητικούς είτε για βιομηχανικούς σκοπούς, γίνεται συνήθως στα τελικά στάδια της λογαριθμικής φάσης, κατά τα οποία η καλλιέργεια και τα κύτταρα παραμένουν σε καλή κατάσταση (Kim *et al.* 2005, Grierson *et al.* 2013). Ωστόσο, είναι σημαντικό να γίνεται συνεχής παρακολούθηση (monitoring), η οποία καθορίζεται από το πρωτόκολλο καλλιέργειας, διότι η καλλιέργεια αποτελεί ένα σύστημα με ενδογενή αβεβαιότητα, το οποίο ενδέχεται να καταρρεύσει οποιαδήποτε στιγμή για διάφορους λόγους. Τα στοιχεία κινητικής των

καλλιεργειών διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους για διαφορετικούς οργανισμούς και καθορίζονται όχι μόνο από τις συνθήκες που ελέγχονται από τον επιστήμονα αλλά και από την εντροπία του συστήματος και τα ενδογενή χαρακτηριστικά κάθε οργανισμού (Richmond 2004, Andersen 2005, Juneja *et al.* 2013, Lee *et al.* 2015). Αυτός είναι και ο βασικός λόγος για τον οποίο ορισμένα μικροφύκη καλλιεργούνται ευκολότερα, ενώ κάποια άλλα δεν δύνανται να διατηρηθούν σε συνθήκες ελεγχόμενων καλλιεργειών εκτός του φυσικού τους περιβάλλοντος (Goldman 1971, De Pauw *et al.* 1984).

Η καλλιέργεια, δηλ. η δυνατότητα ανάπτυξης και συντήρησης πληθυσμών μικροφυκών υπό ελεγχόμενες συνθήκες στο εργαστήριο, αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στην ταξινόμηση των οργανισμών αυτών, συμβάλλοντας στη διατήρηση ζωντανού υλικού (Day *et al.* 2010). Το υλικό αυτό, επομένως, είναι μακροπρόθεσμα διαθέσιμο για ερευνητικούς και εκπαιδευτικούς σκοπούς αλλά και προς πιθανή αξιοποίηση σε βιομηχανικό επίπεδο.

1.7. ΠΟΙΚΙΛΟΜΟΡΦΙΑ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

1.7.1. Η Έννοια του Στελέχους στα Μικροφύκη

Ως στέλεχος φυτοπλαγκτικών μικροφυκών ορίζεται μια “μονοειδική φυτοπλαγκτική καλλιέργεια καθορισμένης προέλευσης, η οποία διατηρείται ως γενεαλογική σειρά μέσω διαδοχικών ανακαλλιεργειών” (Lakeman *et al.* 2009). Η έρευνα επί της φυσιολογίας και της οικολογίας του φυτοπλαγκτού στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό σε πειραματικά αποτελέσματα που λαμβάνονται με τη χρήση εργαστηριακών καλλιεργειών, καθιστώντας τις τελευταίες ένα σημαντικό εργαλείο για οικολογικές μελέτες (π.χ. Dortch 1982, Marshall & Newman 2002, de Boer *et al.* 2005, Ignatiades *et al.* 2007). Οι μελέτες αυτές στηρίζονται στην προϋπόθεση ότι τα δεδομένα τα οποία λαμβάνονται από εργαστηριακά πειράματα και πληθυσμούς που καλλιεργούνται στο εργαστήριο, ισχύουν και στους φυσικούς πληθυσμούς (Lakeman *et al.* 2009). Ωστόσο, όταν αναφερόμαστε σε “στελέχη” ή “κλώνους”, δηλ. πληθυσμούς μιας ταξινομικής μονάδας (συνήθως είδους) που έχουν αναπτυχθεί στο εργαστήριο, θα πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπ’ όψιν η ποικιλομορφία και η παρέκκλιση που δύναται να προκύψει από τη μακροχρόνια διατήρηση των πληθυσμών εκτός του φυσικού τους περιβάλλοντος. Οι συνθήκες καλλιέργειας των οργανισμών στο εργαστήριο είναι αδιαμφισβήτητα διαφορετικές από εκείνες του φυσικού περιβάλλοντος (Roszak & Colwell 1987). Μία από τις βασικότερες διαφορές (και μάλιστα όταν πρόκειται για

οργανισμούς που απομονώνονται από ακραία ή και μεταβατικά περιβάλλοντα) είναι η σταθερότητα των συνθηκών στο εργαστήριο σε σχέση με τις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες στην περιοχή προέλευσης. Η υποβολή οργανισμών -προσαρμοσμένων στη μεταβλητότητα των φυσικών οικοσυστημάτων- στη σταθερότητα των εργαστηριακών συνθηκών ενδέχεται να επιδρά εμφανώς στη φυσιολογία τους (Mann & Cherpurnov 2004, von Dassow *et al.* 2006).

Η περιοχή και η εποχή απομόνωσης αποτελούν μέρος της ταυτότητας ενός καλλιεργούμενου στελέχους και είναι στοιχεία που πρέπει να αναφέρονται με σαφήνεια σε κάθε σχετική ερευνητική εργασία (Day *et al.* 2010). Εν τούτοις, σε αρκετές μελέτες υποδεικνύεται ότι υπάρχουν σαφείς φαινοτυπικές και γενετικές διαφοροποιήσεις μεταξύ εργαστηριακών και φυσικών πληθυσμών ενός είδους, ακόμη και αν έχουν απομονωθεί από την ίδια περιοχή (π.χ. Hoshaw *et al.* 1985, Goho & Bell 2000, Harshman & Hoffmann 2000, Cullum *et al.* 2001, Elena & Lenski, 2003, Reed *et al.*, 2003, Montresor & Lewis 2005, von Dassow *et al.* 2008). Συνεπώς, ένα από τα βασικά προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι οικολογικές μελέτες, είναι το γεγονός ότι συχνά παραβλέπεται η ενδο-ειδική ποικιλομορφία που προκύπτει από τη μακροχρόνια καλλιέργεια ειδών σε εργαστηριακές συνθήκες (Wood & Leatham 1992). Η ποικιλομορφία αυτή μπορεί να προκύψει από μια πληθώρα διεργασιών που επιδρούν σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό τόσο στον γονότυπο όσο και στον φαινότυπο ενός στελέχους (βλ. Κεφάλαιο 1.7.2., Lakeman *et al.* 2009).

Στα πλαίσια της Διατριβής, η έννοια του στελέχους αναφέρεται σε εργαστηριακούς πληθυσμούς, οι οποίοι έχουν απομονωθεί από φυσικό περιβάλλον και στη συνέχεια έχουν εγκατασταθεί και εγκλιματιστεί (κατά έναν βαθμό) σε εργαστηριακές συνθήκες. Ως «οικολογία των στελεχών» νοούνται στην προκειμένη περίπτωση οι αποκρίσεις (αύξηση, επιβίωση, βιοχημικές, μορφολογικές και φυσιολογικές αποκρίσεις, αλληλεπιδράσεις κλπ.) των εργαστηριακών αυτών πληθυσμών στις συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας, οι οποίες εμπεριέχουν την πιθανή επίδραση του φυσικού περιβάλλοντος προέλευσης των στελεχών, και ταυτόχρονα ενσωματώνουν την ποικιλομορφία των καλλιεργούμενων πληθυσμών και την παρέκκλισή τους από τους φυσικούς, ως αποτέλεσμα των εργαστηριακών συνθηκών.

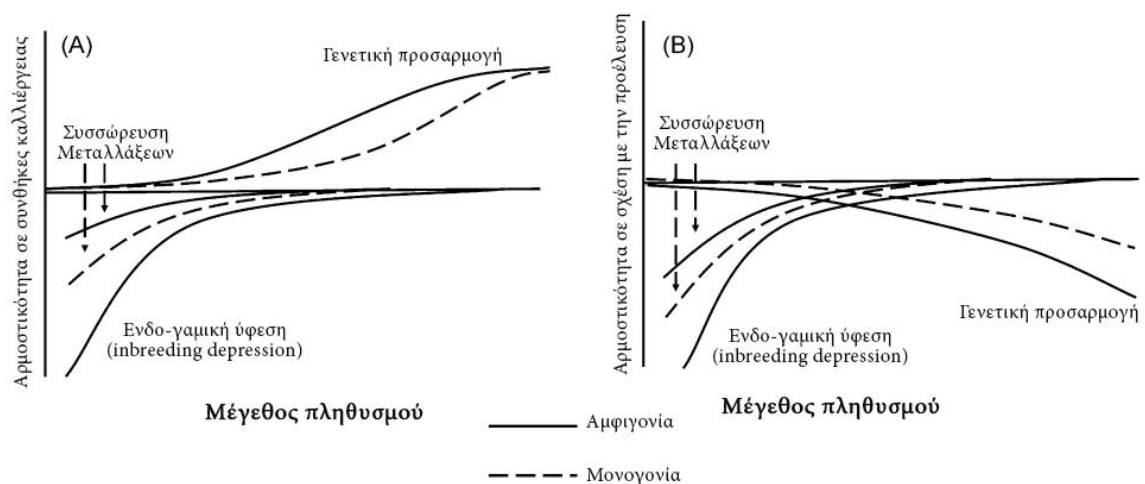
1.7.2. Ενδο-ειδική Ποικιλομορφία και Εξέλιξη σε Καλλιεργούμενους Πληθυσμούς Μικροφυκών

Η αυθόρμητη μετάλλαξη (spontaneous mutation) είναι μια αναπόφευκτη διεργασία που επισυμβαίνει στις εργαστηριακές καλλιέργειες ως αποτέλεσμα του διπλασιασμού

του DNA κατά την ανάπτυξη των κυττάρων και, εξ αιτίας των ταχέων ρυθμών αύξησης και των υψηλών πληθυσμιακών πυκνοτήτων που επιτυγχάνονται, μπορεί να έχει εμφανή αποτελέσματα στον φαινότυπο των καλλιεργούμενων οργανισμών (Reboud & Bell 1997, Costas *et al.* 1998, Kassen & Bell 1998, Goho & Bell 2000, Colegrave *et al.* 2002, Collins & Bell 2004, Lakeman & Cattolico 2007). Σε ορισμένες περιπτώσεις - τόσο σε δινομαστιγωτά όσο και σε χλωροφύκη - έχουν παρατηρηθεί και μεγαλύτερης-κλίμακας μεταβολές (whole-genome, π.χ. στον αριθμό των χρωμοσωμάτων), οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε φαινοτυπική παρέκκλιση των καλλιεργούμενων πληθυσμών σε σχέση με τους φυσικούς (Loper *et al.* 1980, Holt & Pfister 1982, Hoshaw *et al.* 1985, Montagnes & Weisse 2000, Lowe *et al.* 2005, Lohbeck *et al.* 2012). Ο γενετικός ανασυνδυασμός, εξ άλλου, επηρεάζει κυρίως πληθυσμούς όπου η αμφιγονική αναπαραγωγή (sexual reproduction) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, αρκετά συχνό φαινόμενο στους πληθυσμούς των μικροφυκών (Montesoro & Lewis 2005). Η μετάλλαξη και ο ανασυνδυασμός του γενετικού υλικού είναι οι βασικές διαδικασίες που οδηγούν στη γενετική ποικιλότητα, ωστόσο, η γενετική παρέκκλιση (genetic drift) και η επιλογή (selection) είναι εκείνες που δύνανται να μεταβάλουν τις γονιδιακές συχνότητες στους καλλιεργούμενους πληθυσμούς, αποτελώντας έτσι την κινητήρια δύναμη της εξέλιξης αυτών (Campillo 2009, Lakeman *et al.* 2009, Flores-Moya *et al.* 2012, Perrineau *et al.* 2014).

Η γενετική παρέκκλιση (drift) αποτελεί σημαντικό παράγοντα σε πληθυσμούς που έχουν μικρό μέγεθος, ή διέρχονται από «στενωπούς» (bottlenecks) που ενδέχεται να μειώσουν το μέγεθός τους, με αποτέλεσμα, τη «συσσώρευση» μεταλλάξεων (mutation accumulation). Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την τυχαία εγκατάσταση, στους καλλιεργούμενους πληθυσμούς, ορισμένων μεταλλάξεων οι οποίες είναι μη-προσαρμοστικές (non-adaptive) και θα αποκρύπτονταν σε μεγαλύτερους πληθυσμούς (Masel 2011). Η διαδικασία της γενετικής παρέκκλισης δεν μπορεί να παραβλέπεται στις εργαστηριακές καλλιέργειες μικροφυκών, αφού αποτελεί συνέπεια της τυχαιότητας στην ανακαλλιέργεια αυτών και συγκεκριμένα μπορεί να οφείλεται στη λήψη ενός μικρού τμήματος του αρχικού πληθυσμού (εμβόλιο, inoculum) για την ανάπτυξη του νέου πληθυσμού. Το μέγεθος του εμβολίου συνήθως δεν είναι αρκετό ώστε να διατηρηθούν όλες οι αυθόρμητες μεταλλάξεις που υπάρχουν στη γενετική δεξαμενή του αρχικού πληθυσμού, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της αρμοστικότητας (fitness) του στελέχους με την πάροδο του χρόνου, σε σχέση με αυτήν του αντίστοιχου φυσικού πληθυσμού (Εικόνα 4, Woodworth *et al.* 2002, βλ. Lakeman *et al.* 2009).

Ωστόσο, η εξελικτική διεργασία που επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό τους καλλιεργούμενους πληθυσμούς των μικροφυκών, είναι η επιλογή (selection). Αυτή προκύπτει από το γεγονός ότι, ενίοτε, οι συνθήκες καλλιέργειας ευνοούν την ανάπτυξη ορισμένων γονοτύπων, σε σχέση με άλλους, και είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την πρακτική διαδικασία της καλλιέργειας στελεχών του φυτοπλαγκτού. Συνεπώς, τα άτομα που φέρουν φυσιολογικές προσαρμογές, οι



Εικόνα 4. Αναμενόμενα αποτελέσματα των εξελικτικών διαδικασιών εντός της καλλιέργειας επί της συνολικής αρμοστικότητα (fitness) ως συνάρτηση του μεγέθους του πληθυσμού. **(Α)** Αρμοστικότητα σε συνθήκες καλλιέργειας. **(Β)** Αρμοστικότητα της καλλιέργειας σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό στο φυσικό περιβάλλον (δηλ. ο βαθμός στον οποίο μια καλλιέργεια αναμένεται να αποκλίνει από τον αρχικό πληθυσμό από τον οποίο προήλθε).

(Τροποποίηση από Woodworth *et al.* 2002 και Lakeman *et al.* 2009)

οποίες προσφέρουν επιλεκτικό πλεονέκτημα στις νέες συνθήκες, είναι και εκείνα που επικρατούν συνήθως στον νέο πληθυσμό (Service & Rose 1985).

Τέτοιου είδους επιλογή (selection) μπορεί να συμβεί σε διάφορα στάδια της διαδικασίας, όπως η απομόνωση (isolation) του στελέχους από το φυσικό δείγμα (π.χ. Brand 1982, Shankle *et al.* 2004), η εγκατάσταση (establishment) του πληθυσμού στο εργαστήριο (π.χ. Lynch *et al.* 1991, Mann & Chermunov 2004) και η συντήρηση (maintenance) του πληθυσμού στις συνθήκες καλλιέργειας (π.χ. Dykhuizen 1990, Kassen & Bell 1998, Rozen & Lenski 2000). Ως εκ τούτου, η επιλογή είναι και η βασικότερη αιτία της ενδο-ειδικής ποικιλομορφίας που εμφανίζεται στους καλλιεργούμενους πληθυσμούς στο επίπεδο του στελέχους, ενίοτε εισάγοντας συστηματικό σφάλμα (bias) στις οικολογικές μελέτες, οι οποίες προϋποθέτουν ότι οι πληθυσμοί αυτοί αντιπροσωπεύουν επαρκώς τους αντίστοιχους φυσικούς πληθυσμούς (Rodriguez-Valera 2004). Τα αίτια της διαδικασίας της επιλογής μπορεί να είναι ποικίλα, ωστόσο σχεδόν πάντα σχετίζονται με τις συνθήκες καλλιέργειας και

την προσαρμογή των οργανισμών που προέρχονται από το φυσικό περιβάλλον σε αυτές, είτε σε επίπεδο γενετικής είτε σε επίπεδο φυσιολογίας. Οι παράμετροι που διαδραματίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στην ανάπτυξη ενός στελέχους στο εργαστήριο είναι η θερμοκρασία, η αλατότητα, η ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας και η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών (Rosenberg *et al.* 2008). Πολύ συχνά οι παράμετροι αυτές στο εργαστήριο έχουν συγκεκριμένες τιμές, οι οποίες, αν και επιτρέπουν την επιβίωση των οργανισμών, δεν συνάδουν με εκείνες του περιβάλλοντος προέλευσης. Η επιλογή των τιμών των παραμέτρων καθορίζεται ανάλογα με τις δυνατότητες του εκάστοτε εργαστηρίου ή από τους ερευνητικούς στόχους του επιστήμονα που συντηρεί τις καλλιέργειες. Στην τελευταία κατηγορία συγκαταλέγονται περιπτώσεις όπου για τη μακροχρόνια συντήρηση των καλλιεργειών προτιμώνται χαμηλότεροι ρυθμοί αύξησης, οι οποίοι επιτυγχάνονται με τη διατήρηση σε μη βέλτιστες συνθήκες (Mann & Chervinov 2004), αλλά και περιπτώσεις πειραμάτων επιλεκτικής καταπόνησης (βλ. Κεφάλαιο 2.7.2). Στα πειράματα αυτά, οι συνθήκες καλλιέργειας τίθενται έτσι ώστε να επιτευχθεί αυξημένη απόδοση ενός γνωρίσματος (π.χ. παραγωγή ενός μεταβολίτη ή αυξημένη παραγωγή βιομάζας) ως απόκριση των κυττάρων σε συνθήκες καταπόνησης (π.χ. αυξημένη αλατότητα ή θερμοκρασία, στέρση θρεπτικών ουσιών). Οι συνθήκες αυτές επάγουν συγκεκριμένους βιοχημικούς και φυσιολογικούς μηχανισμούς των κυττάρων με αποτέλεσμα να επιλέγονται μόνον τα άτομα που φέρουν ευνοϊκές προσαρμογές οι οποίες επιτρέπουν την αποδοτικότερη απόκριση (Masojidek *et al.* 2000, Boussiba 2000, Chisti 2007, Li *et al.* 2008).

Εν τούτοις, η επιλογή είναι μια ενδογενής διαδικασία που εξελίσσεται εντός του καλλιεργούμενου πληθυσμού ακόμη και ανεξαρτήτως των χειρισμών του επιστήμονα ή των δυνατοτήτων του εργαστηρίου. Πολύ συχνά, οι φαινότυποι των πληθυσμών που εγκαθίστανται στο εργαστήριο, οδηγούνται προς νέα βέλτιστα (optima) μέσω των ευνοϊκότερων και σταθερότερων συνθηκών (Lynch *et al.* 1991), ενώ αυτή η διαδικασία μπορεί να επαναλαμβάνεται κάθε φορά που οι πληθυσμοί εγκαθίστανται σε νέες συνθήκες. Επιπροσθέτως, η εξέλιξη των πληθυσμών μέσω της διαδικασίας της επιλογής μπορεί να γίνεται ακόμη και στις διάφορες φάσεις της καλλιέργειας (βλ. Κεφάλαιο 1.6, Εικόνα 3). Οι διαφορετικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε φάση δύνανται να ασκούν διαφορετικές επιλεκτικές πιέσεις στους πληθυσμούς, με έμφαση τους μηχανισμούς καταπόνησης κατά τη στατική φάση (π.χ. αυξημένες συγκεντρώσεις μεταβολιτών, μεταβολή του pH και κυτταρικός συνωστισμός). Συνήθως οι πληθυσμοί δεν αντιμετωπίζουν τις πιέσεις αυτές στη φύση, με αποτέλεσμα στις καλλιέργειες να επικρατούν μόνον οι φαινότυποι που μπορούν να

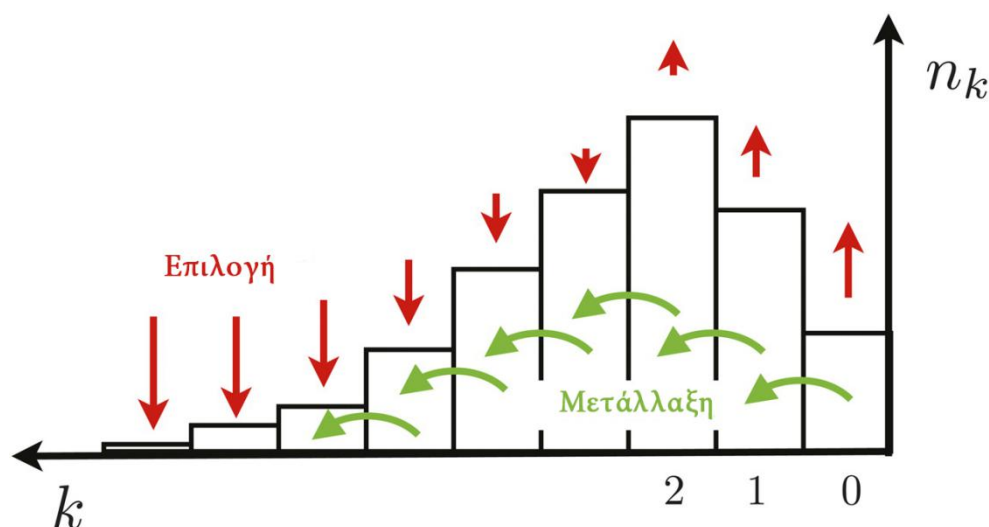
ανταποκριθούν στις πιέσεις της στατικής φάσης (Hellebust 1965, Dykhuizen 1990, Kassen & Bell 1998, Sunda *et al.* 2005).

1.7.3. Εγκλιματισμός

Η επιτυχία καλλιέργειας ενός στελέχους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την προσαρμογή των οργανισμών στις συνθήκες εργαστηρίου (π.χ. Sullivan & Andersen 2001, Martins *et al.* 2004), ή τουλάχιστον έως ότου μια συγκεκριμένη ιδιότητα του πληθυσμού (π.χ. ρυθμός αύξησης ή κυτταρική πυκνότητα) σταθεροποιηθεί (π.χ. Brand *et al.* 1981a). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται εγκλιματισμός (acclimation) και πραγματοποιείται σταδιακά, ενώ τα χρονικά πλαίσια αυτής διαφέρουν ανάλογα με τη φύση του οργανισμού και της καλλιέργειας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο σκοπός του εγκλιματισμού των στελεχών είναι να διαφοροποιηθούν οι εργαστηριακοί πληθυσμοί σε σχέση με τους αντίστοιχους φυσικούς πληθυσμούς ούτως ώστε να εκτιμηθεί η ενδο-ειδική ποικιλότητα που παρατηρείται κατά τη σύγκριση διαφορετικών στελεχών, η οποία μπορεί να οφείλεται σε ενδογενή (δηλ. γενετικά προγραμματισμένη) απόκριση αυτών στις συνθήκες καλλιέργειας, παρά στο ιστορικό των καλλιεργειών (Brand *et al.* 1981b, Sullivan & Andersen 2001, πρβ. Ursi *et al.* 2003, Martino *et al.* 2007, Lakeman *et al.* 2009, Tillmann *et al.* 2009). Ωστόσο, πολύ συχνά ο όρος “εγκλιματισμός” αναφέρεται στην ικανότητα ορισμένων ατόμων των πληθυσμών να διαφοροποιούν τις μεταβολικές τους δραστηριότητες, ως προσαρμοστική απόκριση στις μεταβαλλόμενες συνθήκες (Geider *et al.* 1998, Finkel *et al.* 2004, Staehr & Birkeland 2006). Μεταβολικοί μηχανισμοί οι οποίοι λειτουργούν ως απόκριση σε συγκεκριμένες συνθήκες στο φυσικό περιβάλλον ενδέχεται να αδρανούν σε εργαστηριακό περιβάλλον, όπου ο οργανισμός δεν αντιμετωπίζει συνθήκες αντίστοιχες με αυτές στη φύση. Ως αποτέλεσμα η συμπεριφορά των μεταγενέστερων καλλιεργούμενων πληθυσμών ενδέχεται να τροποποιείται, οπότε όταν εκτεθούν σε συνθήκες παρόμοιες με εκείνες του αρχικού φυσικού πληθυσμού να παρουσιάζουν τελείως διαφορετική συμπεριφορά (π.χ. Hoham *et al.* 2002). Η διαδικασία αυτή μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα ακόμη και τη μόνιμη απώλεια της αρμοστικότητας (fitness) σε γενετικό επίπεδο, π.χ. όταν στελέχη ίδιας προέλευσης (δηλ. που προέρχονται από τον ίδιο κλώνο) καλλιεργούνται σε διαφορετικές συνθήκες για αρκετές γενεές (π.χ. Goho & Bell 2000, Lewitus 2005).

Επιπροσθέτως, ο εγκλιματισμός φυτοπλαγκτικών πληθυσμών και η καλλιέργεια αυτών σε μονοκαλλιέργειες (ή ακόμη και αξενικές καλλιέργειες) έχει ως συνέπεια την απώλεια των βιοτικών (δια-ειδικών) αλληλεπιδράσεων, οι οποίες αποτελούν βασικό

γνώρισμα των βιο-κοινωνιών στο φυσικό περιβάλλον και συμβάλλουν στην εγκαθίδρυση ή/και τη σταθεροποίηση ορισμένων γνωρισμάτων των οργανισμών (Kisdi, 2001, Abrams & Chen 2002), ενώ ενδεχόμενο αποτέλεσμα είναι η πιθανή απώλεια γενετικής και φαινοτυπικής ποικιλομορφίας στους αντίστοιχους καλλιεργούμενους πληθυσμούς (πρβ. Dittami *et al.* 2016). Αντιθέτως, η απώλεια αυτή δύναται να έχει θετική επίπτωση επί των οργανισμών σε ενεργειακό επίπεδο, αφού σε ορισμένες περιπτώσεις οδηγεί στην αδρανοποίηση ενεργειακά κοστοβόρων βιοχημικών και φυσιολογικών μηχανισμών, οι οποίοι δεν είναι απαραίτητοι για την



Εικόνα 5. Muller's Ratchet Ισορροπία μεταξύ θνησιγόνων μεταλλάξεων (deleterious mutations) και επιλογής (selection). Ο πληθυσμός κατανέμεται σε κλάσεις ατόμων τα οποία φέρουν k θνησιγόνες μεταλλάξεις. Οι κλάσεις με λίγες μεταλλάξεις αυξάνονται εξ αιτίας της επιλογής (**κόκκινα βέλη**), αλλά χάνουν άτομα λόγω αυτών των μεταλλάξεων (**πράσινα βέλη**). Οι κλάσεις με πολλές μεταλλάξεις δεν επιλέγονται, αλλά αναπληρώνονται μέσω μεταλλάξεων.
 K = αριθμός μεταλλάξεων (αυθαίρετη μονάδα)
 n_k = τμήμα του πληθυσμού που φέρει τον εκάστοτε αριθμό μεταλλάξεων (Τροποποιημένο από Neher & Shraiman 2012)

επιβίωση στις συνθήκες καλλιέργειας (Zamenhof & Eichhorn 1967, Regal 1977, Lynch *et al.* 1991, Martins *et al.* 2004).

Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι καλλιεργούμενοι πληθυσμοί έχουν ένα σημαντικό μειονέκτημα σε σχέση με τους φυσικούς πληθυσμούς όσον αφορά στους μηχανισμούς αναπαραγωγής και τη διατήρηση της γενετικής ποικιλομορφίας. Οι εγκατεστημένοι στο εργαστήριο πληθυσμοί αναπαράγονται ως επί το πλείστον αγενώς, σε αντίθεση με τους φυσικούς πληθυσμούς όπου η εγγενής αναπαραγωγή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ποικιλομορφίας των οργανισμών αλλά και στην αποφυγή συσσώρευσης επιβλαβών μεταλλαγών (Zeyl & Bell 1997). Ως γνωστόν, μεταλλάξεις που έχουν ελαφρώς επιβλαβή αποτελέσματα συσσωρεύονται

σταδιακά μέσω γενετικής παρέκκλισης σε πληθυσμούς που αναπαράγονται αγενώς, με αποτέλεσμα τη μείωση της αρμοστικότητας, την ελάττωση των πληθυσμιακών μεγεθών και την επακόλουθη συσσώρευση ακόμη περισσότερων επιβλαβών μεταλλάξεων. Η διαδικασία αυτή, γνωστή ως “Muller’s Ratchet” (Muller 1964, Felsenstein 1974, βλ. Εικόνα 5, Neher & Shraiman 2012), δύναται μέσω της επαναλαμβανόμενης ανάδρασης να οδηγήσει στην κατάρρευση του καλλιεργούμενου πληθυσμού (Lynch & Gabriel 1990).

1.8 ΛΙΠΙΔΙΚΑ ΠΡΟΦΙΛ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Τα μικροφύκη αποτελούν την πιο σημαντική συνιστώσα της πρωτογενούς παραγωγής και την κύρια πηγή οργανικού υλικού στα θαλάσσια οικοσυστήματα, και συνεπώς είναι σε μεγάλο βαθμό η βάση των τροφικών πλεγμάτων παγκοσμίως (Bardach *et al.* 1972, Nichols *et al.* 1986, Becker 2007). Μια σημαντική συμβολή των μικροφυκών στα υδατικά οικοσυστήματα, είναι το ότι αποτελούν πηγή απαραίτητων λιπαρών οξέων, όπως των ω-3 λιπαρών οξέων για τους ζωικούς οργανισμούς, και εξ αιτίας της ιδιότητας αυτής θεωρούνται εναλλακτική διατροφική πηγή για ζωικούς οργανισμούς (κυρίως ψάρια) αλλά και για τον άνθρωπο (Becker 2007, Guschina & Harwood, 2006). Τα λιπιδικά προφίλ των μικροφυκών έχουν μελετηθεί εκτενώς κυρίως για μικροφύκη, τα οποία παραδοσιακά χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες και γενικότερα στη σχετική βιομηχανία (π.χ. Volkman *et al.* 1989, Zhukova & Aizdaicher 1995, Olaiola 2003). Μεταξύ άλλων προϊόντων υψηλής αξίας, τα μικροφύκη παράγουν σημαντικές ποσότητες πολυ-ακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA - Poly-Unsaturated Fatty Acids), όπως τα ω-3 λιπαρά οξέα εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA) και εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (DHA), τα οποία ο άνθρωπος λαμβάνει μέσω της διατροφής με ψάρια αλλά και έλαια που προέρχονται από ψάρια (Dunstan *et al.* 1992, Pereira *et al.* 2004). Ωστόσο, τα ψάρια ως ζωικοί οργανισμοί δεν συνθέτουν de novo τα λιπαρά αυτά οξέα, αλλά τα προσλαμβάνουν μέσω της διατροφής τους από τα μικροφύκη (Pohl & Zurheide 1979) είτε με άμεση είτε με έμμεση κατανάλωση (διατροφή με ζωοπλαγκτόν το οποίο τρέφεται με μικροφύκη), καθιστώντας τα μικροφύκη τις πρωτεύουσες πηγές των πολυακόρεστων μακράς-αλυσίδας λιπαρών οξέων στα υδάτινα τροφικά πλέγματα (De Pauw & Personne 1988, Ackman 1989, Griffiths *et al.* 2012, Adarme-Vega *et al.* 2012, Siriwardhana *et al.* 2012). Προσφάτως, το ενδιαφέρον επί του λιπιδικού περιεχομένου των μικροφυκών είναι έντονο λόγω της αναζήτησης εναλλακτικών πηγών ενέργειας και την επακόλουθη διερεύνηση της

δυνατότητας παραγωγής βιοκαυσίμων με τη χρήση μικροφυκών (π.χ. Patil *et al.* 2007, Lang *et al.* 2011, Liu *et al.* 2011, Nascimento *et al.* 2013, Hemaiswarya *et al.* 2013, Garcia *et al.* 2019, Carvalho *et al.* 2020).

Πέραν του ενδιαφέροντος που σχετίζεται με βιομηχανικές εφαρμογές, τα λιπιδικά αυτά προφίλ ενδέχεται να έχουν και ταξινομική αξία, αφού δίνουν πληροφορίες οι οποίες συνεισφέρουν τόσο στην ταυτοποίηση των μικροφυκών όσο και στη διασαφήνιση των περιβαλλοντικών παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους, αποτελώντας χρήσιμους χημειοταξινομικούς δείκτες σε μελέτες βιοποικιλότητας (Volkman 1989, Gugger *et al.* 2002, Dunstan *et al.* 2005, Temina *et al.* 2007, Hu *et al.* 2008, Sahu *et al.* 2013). Στην πλειονότητα, τα δεδομένα επί των λιπιδικών προφίλ των μικροφυκών προέκυψαν από την ανάγκη αξιολόγησης της δυνατότητας χρήσης τους στη βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών. Ωστόσο, το περιεχόμενο και οι περιεκτικότητες αυτών έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν σε μελέτες ταξινομικού ενδιαφέροντος (π.χ. Morris & Culkun 1976, Pohl & Zurheide 1979, Álvarez & Zarco 1989, Petkov & Garcia 2007, Hu *et al.* 2008). Εν τούτοις, τα δεδομένα που προκύπτουν είναι συχνά αντιφατικά, υποδεικνύοντας την ύπαρξη επιπλέον παραγόντων που επηρεάζουν τη σύσταση των λιπαρών οξέων στα μικροφύκη πέραν της εξελικτικής τους ιστορίας. Οι αντιφάσεις οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στην ενδογενή αβεβαιότητα της ταξινόμησης των μικροφυκών με βάση τα υπάρχοντα συστήματα αλλά και στις συνθήκες του περιβάλλοντος από το οποίο προέρχονται οι μελετώμενοι οργανισμοί, είτε πρόκειται για το φυσικό περιβάλλον είτε για εργαστηριακές καλλιέργειες (Zhukova & Aizdaicher 1995, Proschold & Leliaert 2007, De Clerck 2013, Borowitzka 2016). Η βιοχημική σύσταση των μικροφυκών και κατ' επέκταση το προφίλ των λιπαρών οξέων τους, τόσο σε ποιοτικό όσο και σε ποσοτικό επίπεδο, φαίνεται να επηρεάζεται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος και σε ορισμένες περιπτώσεις να αντικατοπτρίζει την απόκριση των οργανισμών σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις (Volkman & Johns 1977, Dunstan *et al.* 1992, Viso & Marty 1993, Lu *et al.* 2012).

1.9. ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΙΚΡΟΦΥΚΩΝ

Τα μικροφύκη αποτελούν μια ελκυστική πηγή βιοδραστικών, και κατ' επέκταση οικονομικά εκμεταλλεύσιμων, ουσιών όπως πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, καρωτενοειδή, στερόλες, πολυσακχαρίτες και άλλα σημαντικά βιομόρια που παράγουν κατά τις μεταβολικές διεργασίες τους (Norton *et al.* 1996, Matsui *et al.* 2003, Spolaore *et al.*

2005, Cardozo *et al.* 2007, Hemaiswarya *et al.* 2013). Ως εκ τούτου, πολλοί τομείς της βιομηχανίας έχουν στραφεί προς την έρευνα και τις εφαρμοσμένες χρήσεις των μικροφυκών (Borowitzka 1999, Guedes *et al.* 2011, Markou & Nerantzis 2013, Venkatesan *et al.* 2015). Τα μικροφύκη χρησιμοποιούνται πλέον σε ευρεία κλίμακα, στη διατροφή (τόσο των ζώων όσο και του ανθρώπου), στη φαρμακευτική, την παραγωγή ενέργειας και τη βιοεξυγίανση (βλ. Dominguez 2013). Συστατικά παραγόμενα από τα φύκη περιλαμβάνουν ουσίες με μια πληθώρα δράσεων, όπως αντιοξειδωτικούς, αντιμικροβιακούς, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικούς παράγοντες, καθώς και ουσίες που συμβάλλουν στην καλή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού και ειδικότερα στην καταπολέμηση της παχυσαρκίας, του διαβήτη και των καρδιαγγειακών παθήσεων (Metting *et al.* 1986, Borowitzka 1995, Li *et al.* 2007, Deng & Chow 2010, Goiris *et al.* 2012, Shanab *et al.* 2012, Senhorinho *et al.* 2015).

Τα μικροφύκη έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στο παρελθόν για τη διατροφή ζωικών οργανισμών, και ιδίως στις υδατοκαλλιέργειες, για τη διατροφή μαλακίων και καρκινοειδών καθώς και ως συμπληρώματα σε ιχθυοτροφές (Benemann 1992, Becker 2004). Τα γένη που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών είναι τα *Chlorella* Beyerinck, *Tetraselmis* Stein, *Isochrysis* Parke, *Pavlova* Butcher, *Phaeodactylum* Bohlin, *Chaetoceros* Ehrenberg, *Nannochloropsis* D.J.Hibberd, *Skeletonema* Greville και *Thalassiosira* Cleve (Brown *et al.* 1997, Spolaore *et al.* 2006), εξ αιτίας της υψηλής διατροφικής αξίας που τους προσδίδει το περιεχόμενό τους σε πρωτεΐνες, βιταμίνες, υδατάνθρακες και λιπαρά οξέα (Brown 1991, Becker 2007, Sun *et al.* 2014, Roy & Pal 2015). Εκτός από τη σημασία τους στις ιχθυοκαλλιέργειες, τα μικροφύκη μέσω του πρωτεϊνικού περιεχομένου τους είναι κατάλληλα και ως συμπληρώματα διατροφής για την κτηνοτροφία (Barclay *et al.* 1998, Yaakob *et al.* 2014, Costa *et al.* 2016) και για τον άνθρωπο (Radmer *et al.* 1996, Becker *et al.* 2004, Gershwin *et al.* 2007). Η σημασία των μικροφυκών στη διατροφή του ανθρώπου έγκειται κατά μεγάλο βαθμό στην παραγωγή χρωστικών, όπως το β-καρωτένιο, η ασταξανθίνη, η λουτεΐνη, οι φυκοβιλιπρωτεΐνες και η χλωροφύλλη, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως “φαρμακοτρόφιμα” (neutraceuticals, βλ. Zeisel 1999). Οι χρωστικές αυτές συμβάλλουν στη διατήρηση της καλής υγείας του ανθρώπου αποτελώντας προδρόμους βιταμινών, αντιοξειδωτικούς παράγοντες, ενισχυτές του ανοσοποιητικού συστήματος και ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση (π.χ. Romay *et al.* 1998, Lorenz & Cysewski 2000, Gouveia *et al.* 2006, Jaime *et al.* 2010, Soontornchaiboon *et al.* 2012, de Jesus Raposo *et al.* 2013, Borowitzka 2013, Munir *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2014, Montero-Lobato *et al.* 2018).

Ακόμη μία σημαντική διατροφική χρησιμότητα των μικροφυκών είναι ότι αποτελούν πηγές απαραίτητων ω-3 λιπαρών οξέων. Τα ω-3 λιπαρά οξέα είναι βιομόρια ζωτικής σημασίας για μια πληθώρα διεργασιών και λειτουργιών του ανθρώπινου οργανισμού διαδραματίζοντας ταυτόχρονα σημαντικό ρόλο στη θωράκιση του οργανισμού και την πρόληψη και αντιμετώπιση σημαντικών παθήσεων, καρδιαγγειακών, αυτο-άνοσων και ρευματικών νοσημάτων, εγκεφαλικών δυσλειτουργιών, πνευματικών διαταραχών και καρκίνου μεταξύ άλλων (Spector 1999, Connor 2000, Bishop & Zubeck 2012). Τα ω-6 και ω-3 λιπαρά οξέα αποτελούν πρόδρομα μόρια των φωσφολιπιδίων και συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του εγκεφάλου και των οφθαλμών του εμβρύου κατά την κύηση, και συνεπώς η επαρκής πρόσληψή τους είναι ζωτικής σημασίας για τις εγκύους (Ruyle *et al.* 1990, Van Houwelingen *et al.* 1995, Innis 2005, Sing 2005). Ωστόσο, η σωστή ανάπτυξη και λειτουργία του εγκεφάλου καθώς και η πρόληψη νευρολογικών παθήσεων στα πρώτα στάδια ζωής (π.χ. διαταραχές της προσοχής και μαθησιακές δυσκολίες) αλλά και σε μεγαλύτερες ηλικίες (π.χ. βελτίωση του μνημονικού και πιθανή μείωση κινδύνου εμφάνισης νόσου Alzheimer) απαιτούν συνεχή πρόσληψη ω-3 λιπαρών οξέων, μέσω της διατροφής, καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου (Connor 2000, Morris *et al.* 2003, Chiu *et al.* 2008, Jicha & Markesbery 2010). Οι διαιτητικές απαιτήσεις του ανθρώπου καλύπτονται σε μεγάλο βαθμό από την κατανάλωση φυτικών ελαίων, όπως έλαια σόγιας και ελαιοκράμβης (canola), τα οποία περιέχουν σε σημαντικές ποσότητες τον πρόδρομο των απαραίτητων εικοσανοειδών, το α-λινολενικό οξύ (ALA), αλλά και ιχθυελαίων, τα οποία αποτελούν άμεση πηγή των λιπαρών οξέων EPA και DHA που συμμετέχουν στον σχηματισμό των κυτταρικών μεμβρανών σε κύτταρα του νευρικού συστήματος (Kinsella 1990, Whelan & Rust 2006). Τα τελευταία χρόνια τα έλαια μικροφυκών διερευνώνται ως εναλλακτικές πηγές των ανωτέρω πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε χορτοφαγικές δίαιτες αφού έχει δειχθεί ότι έχουν παρόμοιες ιδιότητες με τα αντίστοιχα ιχθυέλαια (Doughman *et al.* 2007, Ryckebosch *et al.* 2012). Λιπαρά οξέα προερχόμενα από μικροφύκη έχουν χρησιμοποιηθεί και ως πρόσθετα μητρικού γάλακτος σε σκόνη (baby formula), με σκοπό τη βέλτιστη προσομοίωση του φυσικού μητρικού γάλακτος (Boswell *et al.* 1996, Tai *et al.* 2013).

Οι παραγόμενοι από μικροφύκη βιοδραστικοί μεταβολίτες δύνανται να χρησιμοποιηθούν και στη βιομηχανία καλλυντικών και φαρμάκων. Ουσίες παραγόμενες από κυανοβακτήρια εμφανίζουν σημαντική κυτταροτοξική δράση, η οποία έχει εφαρμογές σε αντικαρκινικά φάρμακα (Sirenko & Kirpenko 1999, Simmons *et al.* 2005), ενώ πρόσφατα έχει δειχθεί ότι και καρωτενοειδή παραγόμενα από μικροφύκη, όπως η ασταξανθίνη, δύνανται να δρουν κατά συγκεκριμένων μορφών

καρκίνου (Anderson 2001, Talero *et al.* 2015). Επιπλέον, η αντιφλεγμονώδης και αντιοξειδωτική δράση που παρουσιάζουν ορισμένα λιπαρά οξέα (Serini *et al.* 2012, Robertson *et al.* 2015), χρωστικές (Romay *et al.* 2003, Xia *et al.* 2013, Manivasagan *et al.* 2018) και πολυσακχαρίτες (Guzmán *et al.* 2003, Matsui *et al.* 2003), τα καθιστά δυνητικούς υποψήφιους προς χρήση στην παρασκευή αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (Lauritano *et al.* 2016). Παρά την αξιοσημείωτη ικανότητα των μικροφυκών να παράγουν ποικίλες ουσίες με σημαντική βιολογική δράση, η χρήση τους δεν είναι διαδεδομένη στη φαρμακοβιομηχανία. Ωστόσο, η εντατική τους διερεύνηση ανοίγει σημαντικές προοπτικές προς αυτήν την κατεύθυνση (Kharkwal *et al.* 2012, Venkatessen *et al.* 2015, de Jesus Raposo *et al.* 2015, de Morais *et al.* 2015, Montero-Lobato *et al.* 2018). Αντιθέτως, η χρήση των ουσιών αυτών σε καλλυντικά και προϊόντα προσωπικής υγιεινής, είναι εκτενής. Αρκετές εταιρίες καλλυντικών ανά τον κόσμο, χρησιμοποιούν εκχυλίσματα φυκών σε προϊόντα αντιγήρανσης και κυτταρικής ανάπλασης (βλ. Posten & Walter 2012). Τα κλωροφύκη των μικροφυκών χρησιμοποιούνται ευρέως σε προϊόντα δερματικής περιποίησης, αντιγήρανσης και αντιηλιακής προστασίας, εξ αιτίας των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων (Guerin *et al.* 2003, Lorenz & Cyswski 2000, Stolz & Obermayer 2005, Tominaga *et al.* 2012, Mourelle 2017, Sathasivam & Ki 2018).

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1.8, τα μικροφύκη έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην παραγωγή βιοκαυσίμων εξ αιτίας της υψηλής φωτοσυνθετικής απόδοσης, παραγωγικότητας σε βιομάζα, και της ταχείας τους ανάπτυξης (Miao & Wu 2004), καθώς παράγουν συστατικά υψηλού ενεργειακού περιεχομένου (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και λιπίδια), τα οποία με κατάλληλη επεξεργασία μετατρέπονται σε βιοκαύσιμα (Li *et al.* 2008, Mutanda *et al.* 2011, Raja *et al.* 2013, Hemaiswarya *et al.* 2013). Τα μικροφύκη έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή μιας ποικιλίας διαφορετικών ανανεώσιμων πηγών ενέργειας όπως το βιο-αέριο (μεθάνιο) (Spolarore *et al.* 2006), η βιο-αιθανόλη (bioethanol) (Gray *et al.* 2006), το βιο-υδρογόνο (bio-hydrogen) (Ghirardi *et al.* 2000, Rashid *et al.* 2013, Nagarajan *et al.* 2017) και το βιο-ντίζελ (biodiesel) (Felizardo *et al.* 2006). Η δυνατότητα παραγωγής βιο-ντίζελ από μικροφύκη στηρίζεται στην ικανότητα ορισμένων ειδών να παράγουν σημαντικές ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Li *et al.* 2008, Gouveia & Oliveira 2009, Francisco *et al.* 2010, Halim *et al.* 2011). Στα είδη αυτά, το λιπιδικό περιεχόμενο κυμαίνεται στο 20-50% του ξηρού βάρους του κυτάρου (Chisti 2007), υπερβαίνοντας ενίοτε το 80% (Metting 1996, Spolaore *et al.* 2006). Τα ουδέτερα λιπίδια, και ιδίως οι τρι-ακυλ-γλυκερόλες (TAG), είναι κατάλληλα για την παραγωγή βιοκαυσίμων, λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητάς τους σε λιπαρά οξέα προς μεθυλ-εστεροποίηση, η

οποία έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή απόδοση του παραγόμενου βιοκαυσίμου (Williams & Laurens 2010). Τα βιομόρια TAG παράγονται φυσιολογικά κατά τον μεταβολισμό στα κύτταρα των μικροφυκών, ως αποθηκευτικές ουσίες. Υπό ειδικές συνθήκες, τα κύτταρα τροποποιούν τους μηχανισμούς του μεταβολισμού τους ώστε να παράγουν αυξημένες ποσότητες αποθηκευτικών λιπιδίων με τη μορφή TAG (Hu *et al.* 2008, Rodolfi *et al.* 2009, Chisti 2007).

Λόγω του έντονου ενδιαφέροντος των μικροφυκών ως προς την εκμετάλλευση βιοδραστικών ουσιών και προϊόντων υψηλής αξίας, αρκετές πρόσφατες μελέτες εστιάζουν στη διερεύνηση της επίδρασης διαφόρων φυσικών και χημικών παραμέτρων σε καλλιέργειες ιδιαίτερου βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος (π.χ. Dunstan *et al.* 1993, Brown *et al.* 1997, Cordero *et al.* 2011, Cheirslip & Torpee 2012, Costache *et al.* 2013, San Pedro *et al.* 2013, Gim *et al.* 2014, Han *et al.* 2015, da Silva Ferreira *et al.* 2017). Οι βιοχημικές αποκρίσεις των καλλιεργειών των μικροφυκών σε ακραίες ή μεταβαλλόμενες τιμές αβιοτικών παραμέτρων (όπως αλατότητα, θερμοκρασία, ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας, συγκέντρωση των θρεπτικών ουσιών στο μέσον καλλιέργειας κ.α.) μελετώνται με τον σχεδιασμό πειραμάτων όπου οι αβιοτικές παράμετροι είναι ελεγχόμενες, οπότε οι αποκρίσεις των καλλιεργειών εκτιμώνται αναλόγως με τη μέτρηση λοιπών βιοτικών παραμέτρων (π.χ. κυτταρική πυκνότητα, ξηρή βιομάζα, παραγωγικότητα μεταβολίτη, κλπ) (González-Fernández & Ballesteros 2012, Costache *et al.* 2013, Gim *et al.* 2014, da Silva Ferreira *et al.* 2017). Μέσω πειραμάτων καταπόνησης έχουν διερευνηθεί και οι αποκρίσεις των μικροφυκών σε ακραίες τιμές των προαναφερθέντων αβιοτικών παραμέτρων (π.χ. Holcomb *et al.* 2011, Ördög *et al.* 2012, Bartley *et al.* 2013, San Pedro *et al.* 2013, Subhash *et al.* 2014, Goiris *et al.* 2015, Pancha *et al.* 2015). Είναι γνωστόν ότι τέτοιες συνθήκες καταπόνησης (stress conditions) ενεργοποιούν συγκεκριμένους μεταβολικούς μηχανισμούς σε ορισμένα μικροφύκη, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή χρήσιμων μεταβολιτών, δυνάμενων να αξιοποιηθούν σε βιομηχανικές εφαρμογές (Mata *et al.* 2010, González-Fernández & Ballesteros 2012, Mulders *et al.* 2014, González *et al.* 2015). Ως εκ τούτου, οι πειραματικές διαδικασίες εστιάζουν συχνά στον “χειρισμό” (manipulation) των καλλιεργειών ώστε να επιτευχθεί ή να βελτιστοποιηθεί η παραγωγή μεταβολιτών (Chen *et al.* 2017). Οι μεταβολικοί μηχανισμοί που συνδέονται με την παραγωγή βιοδραστικών ουσιών, επάγονται, πυροδοτούνται ή ενισχύονται από τις συνθήκες καταπόνησης ενώ ενίοτε, μηχανισμοί που προϋπήρχαν στο φυσικό περιβάλλον αλλά έχουν αδρανήσει εξ αιτίας του εγκλιματισμού στις εργαστηριακές συνθήκες, ενεργοποιούνται εκ νέου λόγω καταπόνησης (Lakeman *et al.* 2009). Η διεξαγωγή πειραμάτων καταπόνησης και

διαχείρισης των συνθηκών καλλιέργειας σε συνδυασμό με την αναζήτηση στελεχών μικροφυκών με επιθυμητές ιδιότητες αποτελούν, επί του παρόντος, το βασικό αντικείμενο ερευνητικών προσπαθειών για τη βιομηχανική και βιοτεχνολογική χρήση των μικροφυκών (Chen *et al.* 2013, Talebi *et al.* 2013, Wijffels *et al.* 2013, Ruiz-Domínguez *et al.* 2016.)

1.10. ΤΟ ΓΕΝΟΣ *Tetraselmis* STEIN 1878

1.10.1. Ταξινόμική Θεώρηση του Γένους *Tetraselmis*

Το γένος *Tetraselmis* Stein (1878) αποτελεί ένα πολυπληθές, πολυποίκιλο και κοσμοπολιτικό γένος (John *et al.* 2002). Η ταξινόμική θέση του γένους υπήρξε ένα πολύ σημαντικό ζήτημα κατά τις τελευταίες δεκαετίες, και διαφέρει ανάλογα με το υιοθετούμενο σύστημα των εκάστοτε ερευνητών (π.χ. Margulis 1990, Tomas 1997, Adl *et al.* 2012, Leliart *et al.* 2012). Οι μέθοδοι ταξινόμησης των μικροφυκών στηρίχθηκαν στο παρελθόν αποκλειστικά σε μορφολογικούς χαρακτήρες. Οι πρώτες ταξινομήσεις του γένους *Tetraselmis* βασίστηκαν επίσης σε παρατηρήσεις κυττάρων στο φωτονικό μικροσκόπιο και στη συνέχεια στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (π.χ. Butcher 1959, Domozych 1981, Melkonian 1982, Hori *et al.* 1982, 1983, 1986). Βάσει μορφολογικών γνωρισμάτων, το γένος είχε ενταχθεί στην κλάση Prasinophyceae του φύλου Chlorophyta (στο οποίο ανήκουν όλα τα ευκαρυωτικά μικροφύκη και ορισμένα μακροφύκη), η οποία θεωρήθηκε και ως μία από τις πρώτες εξελικτικές γραμμές των ευρύτερων χλωροφυκών (green algae). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η κλάση αυτή περιελάμβανε ορισμένα γνωρίσματα, τα οποία θεωρούνται ως αρχέγονα για τα ευρύτερα μικροφύκη με αποτέλεσμα να αναγνωρίζεται ως ένα ενδιάμεσο εξελικτικό στάδιο μεταξύ των πλέον αργέχονων ομάδων των πρασινοφυκών και των πιο σύγχρονων ομάδων των χλωροφυκών (Norris *et al.* 1980, Sym & Pienaar 1993). Σύμφωνα με πολλούς επιστήμονες, η μορφολογία του οργανικού περιβλήματος των κυττάρων του γένους *Tetraselmis* αποτελεί μια ένδειξη που ενίσχυε την παραπάνω υπόθεση. Το περίβλημα αυτό προέρχεται από τη συμπαγοποίηση (coalescence) των οργανικών φολίδων (scales), οι οποίες συντίθενται στο σύμπλεγμα Golgi του κυττάρου (Gooday 1971) και μεταφέρονται στο εξωτερικό του κυττάρου μέσω εξωκύτωσης, ώστε να σχηματίσουν μια χαρακτηριστική “άλω” (theca), η οποία ενδεχομένως αποτέλεσε μια προγονική μορφή της χαρακτηριστικής θήκης που καλύπτει τα κινητά κύτταρα των χλωροφυκών (Becker *et al.* 1991). Οι οργανικές αυτές φολίδες διατάσσονται σε διακριτές στρώσεις στις πιο

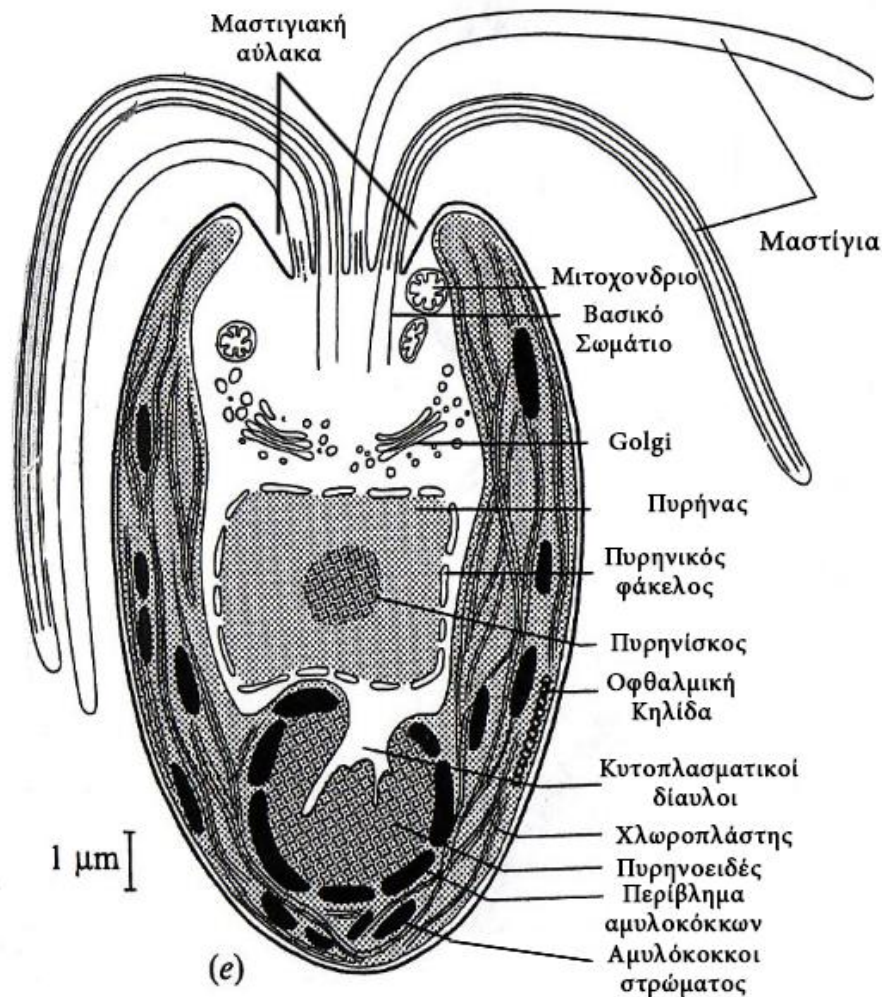
πρωτόγονες ομάδες των πρασινοφυκών, κάτι το οποίο έχει παρατηρηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις και στα μαστίγια του γένους *Tetraselmis*, τα οποία περιβάλλονται επίσης από οργανικό περίβλημα όπου, ωστόσο, οι οργανικές φολίδες συμπαγοποιούνται ή όχι ανάλογα με το είδος (Manton & Parke 1960, Domozych *et al.* 1981, Mattox & Stewart 1984). Επιπλέον, οι οργανικές φολίδες του γένους *Tetraselmis* αποτελούνται κυρίως από γλυκοπρωτεΐνες και όχι κυτταρίνη, όπως το περίβλημα των περισσότερων χλωροφυκών (Goodenough & Heuser 1985). Ο συνδυασμός αυτός των αρχέγονων και σύγχρονων γνωρισμάτων, η εξαιρετική πολυπλοκότητα των σωματικών φολίδων καθώς και η παρουσία μιας σκληρής εξωτερικής στρώσης τριχών (τριχοειδών φολίδων) στο τοίχωμα του μαστιγίου ορισμένων ειδών θεωρήθηκε ως ισχυρή ένδειξη, ικανή να υποστηρίξει τη μονοφυλετικότητα της κλάσης (Moestrup & Throndsen 1988). Ωστόσο, αρκετοί επιστήμονες αντιτάχθηκαν στην άποψη αυτή, υποστηρίζοντας ότι η εμφανιζόμενη ανομοιογένεια σε σημαντικά γνωρίσματα (όπως η γεωμετρία της μαστιγιακής συσκευής, οι διαδικασίες της μίτωσης-κυτοκίνησης και η αρχιτεκτονική των βασικών σωματίων), αποτελούσε ισχυρή ένδειξη για την παραφυλετικότητα της κλάσης (Steinkötter *et al.* 1994, Nakayama *et al.* 1998, Fawley *et al.* 2000, Latasa *et al.* 2004, Guillou *et al.* 2004).

Ωστόσο, παρά την αρχική τους κατάταξη στην κλάση Prasinophyceae, οι αντιπρόσωποι του γένους *Tetraselmis* εμφανίζουν κοινά γνωρίσματα με τα γνήσια Χλωροφύκη (core Chlorophyta, αποτελούμενα από τις κλάσεις Trebouxiophyceae, Ulvophyceae και Chlorophyceae, και γνωστά και ως κλάδος UTC), όπως η κλειστή μίτωση και η δημιουργία φυκοπλάστη (σύστημα μικροσωληνίσκων που αναπτύσσεται παράλληλα στο επίπεδο της πυρηνικής διαίρεσης) κατά την κυτοκίνηση (Mattox & Stewart 1984, Melkonian 1990, Sym & Pienaar 1993). Η εμφάνιση του φυκοπλάστη θεωρείται μάλιστα ότι αποτελεί μια καινοτομία, η οποία προέκυψε κατά τα πρώτα εξελικτικά στάδια των Χλωροφυκών ενώ δεν εμφανίζεται στα Πρασινοφύκη (Mattox & Stewart 1984, Leliaert *et al.* 2012, Marin 2012.). Άλλο ένα γνώρισμα που διαχωρίζει το γένος *Tetraselmis* από τα Prasinophyceae είναι η έλλειψη της χρωστικής πρασινοξανθίνης, η οποία είχε θεωρηθεί ως χαρακτηριστικό γνώρισμα της κλάσης (Latasa *et al.* 2004). Όλα τα παραπάνω στοιχεία, σε συνδυασμό με μοριακά δεδομένα, αποκάλυψαν τη φυλογενετική σχέση του γένους με τον κλάδο UTC και οδήγησαν στην αναθεώρηση της ταξινόμησης αυτού (Fawley *et al.* 2000, Guillou *et al.* 2004, Massjuk 2006, Cocquyt *et al.* 2010, Marin 2012, Leliaert *et al.* 2012). Το γένος εντάσσεται πλέον σε μια νέα κλάση, τα Χλωροδενδροφύκη (Chlorodendrophyceae, sensu Massjuk & Lilitska 2006), στην οποία περιλαμβάνεται ακόμη ένα γένος, το

Scherffelia Pascher (1911). Η κλάση αυτή θεωρείται ότι διαχωρίστηκε από τα Πρασινοφύκη σε προηγούμενο εξελικτικό στάδιο σε σχέση με εκείνο των Χλωροφυκών (Leliaert *et al.* 2012).

Το γένος *Tetraselmis* έχει μελετηθεί εκτενώς από ταξινομική άποψη (π.χ. Parke & Manton 1965, Melkonian 1979, Norris *et al.* 1980, Salisbury *et al.* 1981, Hori *et al.* 1982, 1893, 1896, Throndsen & Zingone 1988, Marin *et al.* 1993, Arora *et al.* 2013) και επί του παρόντος απαριθμεί 33 είδη (Guiry & Guiry 2020). Ορισμένα από τα είδη αυτά είχαν προηγουμένως ενταχθεί στα γένη *Platymonas* G.S. West (1916) (Parke & Green 1976), *Prasinocladus* Kuckuck (1894) (Parke & Manton 1965) και *Aulacochlamys* Margalef (1946). Η ταξινομική ασάφεια σε σχέση με το γένος *Platymonas* διευκρινίστηκε από τον Melkonian (1979), ενώ και ο Butcher (1959) είχε μεταφέρει αρκετά είδη από το γένος *Platymonas* στο γένος *Tetraselmis*. Οι Norris, Hori & Chihara (1982, 1983, 1986), σε μια πλήρη ανασκόπηση του γένους, διέκριναν 3 διαφορετικά υπο-γένη (*Prasinocladia*, *Parviselmis*, *Tetraselmis*), στηριζόμενοι στα μορφολογικά γνωρίσματα και τη λεπτή δομή των μέχρι τότε γνωστών ειδών (βλ. και Norris *et al.* 1980). Τα ταξινομικά κριτήρια βάσει των οποίων διαχωρίζονται τα διάφορα είδη του γένους *Tetraselmis* είναι: το σχήμα και μέγεθος του κυττάρου, η μορφολογία του χλωροπλάστη, η θέση της οφθαλμικής κηλίδας, το σχήμα και η θέση του πυρηνοειδούς, η λεπτή δομή του πυρηνοειδούς και της μαστιγιακής συσκευής και η μορφολογία των διαφορετικών σταδίων του κύκλου ζωής (Kylin 1935, Carter 1937, Margalef 1946, Proskauer 1950, Butcher 1959, Hori *et al.* 1982, 1983, 1986, Arora *et al.* 2013). Τα κινητά (μαστιγιοφόρα) κύτταρα φέρουν τέσσερα ισομήκη, ομοδύναμα (homodynamic) μαστίγια, τα οποία εκφύονται από μια χαρακτηριστική για το γένος πρόσθια αύλακα και περιβάλλονται από ένα λεπτό κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο σχηματίζεται από τη συμπαγοποίηση οργανικών φολίδων, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως. Τα μαστίγια καλύπτονται από στρώσεις φολίδων πενταγωνικού σχήματος καθώς και από μία εξωτερική στρώση “τριχών” (τριχοειδείς φολίδες). Τα κύτταρα φέρουν έναν ευμεγέθη χλωροπλάστη, ο οποίος περιέχει συνήθως ένα πυρηνοειδές και μία κατά το μάλλον ή ήττον ευδιάκριτη οφθαλμική κηλίδα. Η μαστιγιακή συσκευή εντοπίζεται κάτω από την πρόσθια μαστιγιακή αύλακα, και περιλαμβάνει δύο ζεύγη βασικών σωματίων καθένα εκ των οποίων συνδεόμενο με έναν ριζοπλάστη. Στο εσωτερικό του χλωροπλάστη εντοπίζονται αρκετοί αμυλοπλάστες, ενώ και το πυρηνοειδές φέρει διακριτό περίβλημα πυκνών αμυλοπλαστών. Ο πυρήνας εντοπίζεται κάτω από τη μαστιγιακή συσκευή, και μεταξύ αυτών των δύο σχηματισμών υπάρχει το σύμπλεγμα Golgi (Εικόνα 6) (Butcher 1959,

Melkonian 1979, Norris *et al.* 1980, Melkonian 1990, Sym & Pienaar 1993, Arora *et al.* 2013).



Εικόνα 6. Μορφολογικά γνωρίσματα του κυττάρου στο γένος *Tetraselmis*. (Τροποποιημένο από Van den Hoek, Jahns & Mann 1995)

Η αναπαραγωγή και ο κύκλος ζωής του γένους *Tetraselmis* έχουν επίσης αποτελέσει αντικείμενο έρευνας. Τα είδη του γένους αναπαράγονται αγενώς με εγκάρσια διχοτόμηση του πρωτοπλάστη, και τα θυγατρικά κύτταρα (2-4 συνήθως) αναπτύσσονται εντός της μητρικής θήκης και ενίοτε τοποθετούνται με ανάστροφο προσανατολισμό (180°). Η νέα θήκη κάθε κυττάρου αναπτύσσεται εντός της μητρικής, ενώ τα μαστίγια αναπτύσσονται συνήθως εντός της νέας θήκης. Στη συνέχεια τα θυγατρικά κύτταρα αποβάλλουν τη μητρική θήκη και απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Πολλά είδη του γένους, υπό ειδικές συνθήκες (π.χ. καταπόνηση), δημιουργούν ιδιαίτερης μορφής ακίνητα κύτταρα (κύστεις) -τα ονομαζόμενα παλμελλοειδή κύτταρα (palmelloid cells)- με την απόρριψη των μαστιγίων τους, τον σχηματισμό επιπλέον στρώσεων τοιχωματικού υλικού (πολυσακχαρικής φύσεως)

και την αύξηση του μεγέθους του κυττάρου. Οι κύστεις συχνά περιέχουν 4, μη μαστιγιοφόρα κύτταρα. Τα κύτταρα ενδέχεται να παραμένουν σε αυτό το στάδιο για μεγάλα χρονικά διαστήματα και όταν οι συνθήκες είναι κατάλληλες, σχηματίζουν νέα μαστίγια αποβάλλοντας το επιπλέον τοιχωματικό υλικό καθώς μετατρέπονται εκ νέου σε κινητές μορφές. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι επιπλέον θήκες που αποβάλλονται στοιβάζονται δημιουργώντας μίσχους (stalks) (βλ. Kylin 1935, Proskauer 1950, Kobara & Hori 1975, Tanoue & Aruga 1975, Norris *et al.* 1980, Sym & Pienaar 1993, Barberena & Montoya 2009, Arora *et al.* 2015, González *et al.* 2015). Εγγενής αναπαραγωγή δεν έχει παρατηρηθεί στην κλάση Chlorodendrophyceae, αλλά έχουν παρατηρηθεί ενδείξεις διπλοειδίας γεγονός που δεν αποκλείει την πιθανότητα εγγενούς αναπαραγωγής (Huber & Lewin 1896). Από άποψη μοριακής φυλογένεσης η έρευνα επί του γένους είναι σχετικά περιορισμένη, και κυρίως έχει διεξαχθεί με τη χρήση των γονιδίων 18S rDNA και ITS (internal transcribed spacers, εσωτερικές μεταγραφόμενες περιοχές) (Lee & Hur 2009, Arora *et al.* 2013, González *et al.* 2015). Η μοριακή προσέγγιση έθεσε νέες βάσεις στην έρευνα των φυλογενετικών σχέσεων των Χλωροφύτων. Ωστόσο, η εξέλιξη των διαφόρων κλάδων και δη των Χλωροδενδροφυκών, παραμένει ασαφής, χωρίς να είναι ακόμη σαφές εάν τα δύο γένη (*Tetraselmis* και *Scherffelia*) της κλάσης αποτελούν ξεχωριστούς κλάδους (Guillou *et al.* 2004, Marin 2012, Leliaert *et al.* 2012, Fučíková *et al.* 2014, Fang *et al.* 2018, Arora *et al.* 2013, Arora 2016, Turmel *et al.* 2016).

1.10.2 Οικολογική Θεώρηση του Γένους *Tetraselmis*

Το *Tetraselmis* είναι ένα κοσμοπολιτικό γένος, και αντιπρόσωποι αυτού εμφανίζονται σε μια πληθώρα διαφορετικών ενδιαιτημάτων παγκοσμίως. Τα περισσότερα είδη του γένους είναι θαλάσσια και διαβιούν στο πλαγκτόν ή το βένθος ωκεάνιων και παράκτιων συστημάτων, ενώ ορισμένα είδη εμφανίζονται σε υφάλμυρα και γλυκά ύδατα (John *et al.* 2002, Worden *et al.* 2004). Το γένος αποτελεί σημαντικό τμήμα της βιοτικής συνιστώσας σε μεταβατικά και παράκτια συστήματα όπου τα είδη του αναπτύσσουν πυκνούς πληθυσμούς και παροδικές ή εποχικές παράκτιες ανθίσεις (blooms), αποτελώντας βασικό στοιχείο της πρωτογενούς παραγωγής των εκεί τροφικών πλεγμάτων (Hori *et al.* 1982, Caroppo 2002). Ωστόσο, υπάρχουν και είδη του γένους, τα οποία διαβιούν σε ιδιαίτερα περιβάλλοντα, όπως υπεράλυμα ύδατα ή και ως συμβιώτες ζωικών οργανισμών. Στους συμβιωτικούς αντιπροσώπους του γένους συγκαταλέγονται α) το είδος *Tetraselmis convolutae* (Parke & Manton) R.E.Norris, Hori & Chihara 1980, το οποίο συνάπτει συμβιωτική σχέση με τον

ακοιλωματικό πλατυέλμινθα *Symsagittifera roscoffensis* (προηγουμένως *Convoluta roscoffensis*) (Parke & Manton 1965, 1967, Provasoli *et al.* 1968, Norris *et al.* 1980, Serôdio *et al.* 2011), και β) ένα στέλεχος της τάξης Chlorodendrales, το οποίο σύμφωνα με μοριακά δεδομένα έχει στενή συγγένεια με το γένος *Tetraselmis* και έχει απομονωθεί από το Ακτινόζωο *Spongodymus* sp., χωρίς, ωστόσο, να έχει προσδιοριστεί ακόμη η ακριβής ταξινομική του θέση (Anderson 1983, Gast *et al.* 2000, Gast & Garon 2001, Viprey *et al.* 2008, Decelle *et al.* 2015). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν στελέχη που έχουν απομονωθεί από περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας ευδοκιμώντας εκεί, αλλά και ευρύαλα στελέχη που δύνανται να επιβιώσουν σε περιβάλλοντα με μεταβαλλόμενη αλατότητα (βλ. Arora *et al.* 2013, D'Adamo 2014, Erkelens *et al.* 2015, Fon-Sing & Borowitzka 2016, Abomohra *et al.* 2017). Η ευρεία εξάπλωση ορισμένων ειδών του γένους μπορεί να αποδοθεί στην αξιοσημείωτη ικανότητα αυτών να επιβιώνουν σε ένα μεγάλο εύρος τιμών διαφόρων περιβαλλοντικών παραμέτρων όπως η αλατότητα, η ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας και η συγκέντρωση θρεπτικών ουσιών (Fabregas *et al.* 1985, Otero *et al.* 1997, Duan *et al.* 2003, Sen *et al.* 2005, Meseck *et al.* 2005, Borghini *et al.* 2009, Alsull & Omar 2012).

Σε μια πληθώρα μελετών της βιοχημικής απόκρισης των κυττάρων του γένους στις συνθήκες του περιβάλλοντος έχει δειχθεί ότι αρκετά είδη αποκρίνονται στη μεταβολή της αλατότητας, της θερμοκρασίας, των θρεπτικών στοιχείων (στέρση αζώτου ή/και φωσφόρου, ποσοστά N/P), το pH, τη θήρευση, και την παρουσία τοξικών ουσιών και βαρέων μετάλλων (π.χ. Molina *et al.* 1991, Nassiri *et al.* 1996, Wikfors *et al.*, 1996, Qin *et al.* 1999, Olsen *et al.* 2006, Borghini *et al.* 2009, Laws *et al.* 2011, Vieira & Guilhermino 2012, Stachowski-Haberkorn *et al.* 2013, Fon Sing & Borowitzka 2016, Pereira *et al.* 2016, Carneiro *et al.* 2019). Η απόκριση των ειδών του γένους σε βιοχημικό επίπεδο αποτελεί το επίκεντρο και ιδιαίτερος η παραγωγή λιπαρών οξέων ως απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης (stress) (Otero & Fabregas 1997, D'Souza & Kelly 2000, Xu *et al.* 2013, Sharma *et al.* 2014, Fon-Sing & Borowitzka 2016, Pereira *et al.* 2016, Tsai *et al.* 2016). Ως εκ τούτου, οι μελέτες αυτές πραγματοποιούνται σε απομονωμένους πληθυσμούς, δηλ. σε εργαστηριακά στελέχη. Η ποικιλότητα (τόσο δια-ειδική όσο και ενδο-ειδική) που παρατηρείται στο λιπιδικό περιεχόμενο και την παραγωγικότητα των στελεχών των μικροφυκών, αποδίδεται πρωτίστως στις συνθήκες καλλιέργειας και εμφανίζει σημαντική μεταβλητότητα (plasticity) ως απόκριση σε αυτές (Patil *et al.* 2007, Petkov & Garcia 2007). Η μεταβλητότητα αυτή επιτρέπει τη διαχείριση (manipulation) της παραγωγής λιπαρών οξέων στους καλλιεργούμενους πληθυσμούς, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά, με τη μεταβολή των

συνθηκών καλλιέργειας, ενώ ταυτόχρονα φαίνεται να έχει γενετική προέλευση (Roessler 1990, Swaaf 2003, Mendoza Guzmán *et al.* 2009). Η συμπεριφορά των στελεχών είτε οφείλεται σε γενετικό προγραμματισμό είτε σε βιοχημική προσαρμογή στις εκάστοτε συνθήκες καλλιέργειας εξαρτάται, όπως προαναφέρθηκε (Κεφάλαιο 1.7) από τον εγκλιματισμό τους στις συνθήκες εργαστηρίου. Η ταξινομική και φυλογενετική σημασία των λιπιδικών προφίλ των μικροφυκών, καθώς και η χρήση τους ως βιοδεικτών (biomarkers) σε οικολογικές μελέτες, έχουν διερευνηθεί εκτενώς (Pohl & Zurheide 1979, Mourente *et al.* 1990, Cohen *et al.* 1995, Mostaert *et al.* 1998, Lang *et al.* 2011, Sahu *et al.* 2013 Hemaiswarya *et al.* 2013, Cañavate *et al.* 2016). Ωστόσο, δεν υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες για το γένος *Tetraselmis*. Αυτό οφείλεται εν πολλοίς στο γεγονός ότι η έρευνα εστιάζει στα στελέχη του γένους τα οποία έχουν βιομηχανική και οικονομική σημασία, και ιδιαίτερος στα είδη *T. chui* Butcher και *T. suecica* (Kylin) Butcher που χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες στη βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών (Molina *et al.* 1991, Brown 2002, Papandroulakis *et al.* 2002, Spolaore *et al.* 2006, Guzmán *et al.* 2010, Guedes & Malcata 2012).

Η απόκριση ορισμένων ειδών του γένους *Tetraselmis* στην παρουσία και συγκέντρωση διαφόρων μη-θρεπτικών χημικών ουσιών παρουσιάζει επίσης ιδιαίτερο οικολογικό ενδιαφέρον, δεδομένου ότι πολλές από τις ουσίες αυτές δύνανται να έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις στα υδάτινα οικοσυστήματα και στις εκεί βιοκοινότητες (π.χ. Liu *et al.* 2011, Vieira & Guilhermino 2012, Stachowski-Haberkorn *et al.* 2013). Στελέχη του γένους επιδεικνύουν σημαντική ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων και έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν ορισμένα από αυτά στο εσωτερικό των κυττάρων τους, και να τα απομακρύνουν από το περιβάλλον (Pérez-Rama *et al.* 2001, Malik 2004, Adam 2015, Cameron 2018). Αυτό επιτυγχάνεται συχνά με τη σύνθεση στο εσωτερικό των κυττάρων, ειδικών χημικών παραγόντων, οι οποίοι δεσμεύουν τα εν λόγω μέταλλα ως απόκριση στις υψηλές συγκεντρώσεις αυτών. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι μεταλλοθειονίνες (metallotheionins, βλ. Pérez-Rama *et al.* 2001) και οι φυτοχελατίνες (βλ. Σεφερλής 2012, Pérez-Rama *et al.* 2009). Η απόκριση των αντιπροσώπων του γένους στην επίδραση διαφόρων ρυπαντών, όπως αντιβιοτικά, παρασιτοκτόνα, πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες, αλλά και στον ευτροφισμό, ανοίγει σημαντικές προοπτικές για την αξιοποίηση στελεχών του γένους στους τομείς της βιοεξυγίανσης και των οικοτοξικολογικών δοκιμών (bioassays) (Matthiessen *et al.* 1998, Petroutsos *et al.* 2008, Macken *et al.* 2008, Giacco *et al.* 2011, Vieira & Guilhermino 2012, Ebenezer & Ki 2013a,b, Stachowski-Haberkorn 2013, Seoane *et al.* 2014, Sirakov & Velichkova 2014, Andreotti *et al.* 2017). Επί του παρόντος, το είδος στο οποίο εστιάζουν οι

περισσότερες έρευνες είναι το *T. suecica* (π.χ. Pérez-Rama *et al.* 2002, 2009, 2010, Solovchenko & Khozin-Goldberg 2013, Moheimani 2016, Sayadi *et al.* 2016, Andreotti *et al.* 2017, 2019, Sathasivam *et al.* 2018), αλλά και άλλοι αντιπρόσωποι του γένους έχουν επιδείξει αντίστοιχη δραστηριότητα (π.χ. Sirakov & Velichkova 2014, Adam *et al.* 2015, Chandra *et al.* 2017, Cameron *et al.* 2018), και θα έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον μέλλον να μελετηθούν ακόμη περισσότερα είδη και στελέχη του γένους προς αυτήν την κατεύθυνση.

1.10.3 Βιομηχανικό Ενδιαφέρον του Γένους *Tetraselmis*

Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, στελέχη του γένους *Tetraselmis* έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη σχετιζόμενη με τα μικροφύκη βιομηχανία. Αρχικά το ενδιαφέρον στράφηκε προς το γένος εξ αιτίας της δυνατότητας χρήσης των ειδών του στη βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών, και συγκεκριμένα στη διατροφή μαλακίων, καρκινοειδών και ιχθυοπρονυμφών στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς (π.χ. De la Noue & De Paw 1988, Molina *et al.* 1991, Cid *et al.* 1991, Benemann 1992, Wikfors *et al.* 1996, Fabregas *et al.* 2001, Shields 2001, Papandroulakis *et al.* 2002, Theodorou 2002, Becker 2004, Serdar *et al.* 2007). Ως εκ τούτου, η καλλιέργεια αντιπροσώπων του γένους αποτελεί αντικείμενο έντονου ενδιαφέροντος. Ωστόσο, το ενδιαφέρον αυτό επεκτείνεται πλέον στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών, καθώς και στον τομέα των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας (Austin *et al.* 1992, Carballo-Cárdenas *et al.* 2003, Rosa *et al.* 2005, Borghini *et al.* 2009, Bondioli *et al.* 2012, Carneiro *et al.* 2019). Στελέχη του γένους έχει δειχθεί ότι παράγουν σημαντικές υψηλής-αξίας βιοδραστικές ουσίες. Το είδος *T. suecica* έχει προταθεί προς χρήση στη βιομηχανία τροφίμων ως πηγή βιταμινών λόγω της σημαντικής παραγωγής τοκοφερόλης (βιταμίνη E), αλλά και ως πηγή απαραίτητων ω-3 λιπαρών οξέων (Goes *et al.* 1994, Otero & Fabregas 1997, Carballo-Cárdenas *et al.* 2003, Custodio *et al.* 2013, Xu 2013). Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά και στο Κεφάλαιο 1.10.2, η σημαντική ικανότητα στελεχών του γένους να συσσωρεύουν βαρέα μέταλλα απομακρύνοντας αυτά από το περιβάλλον και να χρησιμοποιούν το θρεπτικό φορτίο (κυρίως φώσφορο) των λυμάτων από τις υδατοκαλλιέργειες έχει διερευνηθεί με την προοπτική της χρήσης τους στη βιοεξυγίανση λυμάτων και αποβλήτων που προέρχονται από τις υδατοκαλλιέργειες ή άλλες βιομηχανικές δραστηριότητες (Pérez-Rama *et al.* 2001, 2002, Malik 2004, Pérez-Rama *et al.* 2009, Moheimani 2016, Sirakov & Velichkova 2014, Adam *et al.* 2015, Andreotti *et al.* 2017, Cameron *et al.* 2018). Υπάρχουν στελέχη με αντιμικροβιακές ιδιότητες, όπως για παράδειγμα στελέχη του είδους *T.*

suecica, τα οποία παρεμποδίζουν τη δράση παθογόνων βακτηρίων στα ψάρια και καρκινοειδή (Austin *et al.* 1992, Regunathan & Wesley 2004) και γενικότερα εμφανίζουν αντιβακτηριακή δραστηριότητα (Makridis *et al.* 2006, Kokou *et al.* 2012, Bai & Krishnakumar 2013). Επιπροσθέτως, ορισμένα στελέχη εμφανίζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες που δημιουργούν προοπτικές για τη χρήση τους στη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία καλλυντικών, όπως για παράδειγμα αντικαρκινική (Rosa *et al.* 2005), αντιγηραντική (Jo *et al.* 2012) και αντιφλεγμονώδη δράση (Jo *et al.* 2010).

Οι δυνατότητες για βιομηχανική και οικονομική αξιοποίηση του γένους *Tetraselmis*, δημιούργησαν τεράστιο ενδιαφέρον γύρω από τη μαζική του καλλιέργεια και την διαχείριση αυτής (π.χ. Rigobello-Masini *et al.* 2006, Zitelli *et al.* 2006, Danquah *et al.* 2010, Guzmán *et al.* 2010, Azma *et al.* 2010, 2011, Yao *et al.* 2012, Raes *et al.* 2014, Fon Sing *et al.* 2014, Imamoglu *et al.* 2015, Kim *et al.* 2016, Fon Sing & Borowitzka 2016, Dammak *et al.* 2017, Park *et al.* 2018). Ο τομέας ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι εκείνος των βιοκαυσίμων. Συνεπώς οι περισσότερες έρευνες εστιάζουν στο λιπιδικό περιεχόμενο των καλλιεργούμενων στελεχών, αλλά και στην προσπάθεια ενίσχυσης της παραγωγικότητας και τροποποίησης του περιεχομένου της παραγόμενης βιομάζας ώστε να λαμβάνονται οι επιθυμητοί μεταβολίτες σε επαρκή ποσοστά (Molina *et al.* 1991, Grima *et al.* 1994 Guzmán *et al.* 2010, Huang *et al.* 2014, Adarme-Vega 2014, Bondioli *et al.*, 2014, Kim *et al.* 2016, Park *et al.* 2018). Η καλλιέργεια του γένους *Tetraselmis* μελετήθηκε αρκετά στο παρελθόν, εξ αιτίας -όπως προαναφέρθηκε- της χρήσης τους στις υδατοκαλλιέργειες. Ωστόσο, το ενδιαφέρον λιπιδικό περιεχόμενο ορισμένων στελεχών του γένους οδήγησε σε περαιτέρω διερεύνηση των τεχνικών μαζικής τους καλλιέργειας (Zitelli *et al.* 2006, Moheimani 2013, Fon Sing *et al.* 2014, Jeong *et al.* 2015, Lu *et al.* 2017). Η έντονη αναζήτηση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας από τη βιομηχανία, έχει μεταστραφεί τα τελευταία χρόνια προς την αξιοποίηση των μικροφυκών (Benneman 2009, Lam & Lee 2012, Prabandono & Amin 2015, Milano *et al.* 2016). Τα αλόφιλα μικροφύκη αποτελούν μια εξαιρετική εναλλακτική πηγή βιοκαυσίμων, αφού δεν ανταγωνίζονται καλλιέργειες βρώσιμης βιομάζας όσον αφορά στους φυσικούς πόρους αλλά και στη χρήση γης, ενώ ταυτόχρονα, η χρήση θαλασσινού νερού περιορίζει τον κίνδυνο επιμολύνσεων των καλλιεργειών μικροφυκών από άλλα είδη (Pate *et al.* 2011, Resurreccion *et al.* 2012, Fon Sing & Borowitzka 2016). Το γένος *Tetraselmis* περιλαμβάνει αρκετά αλόφιλα και ευρύαλα είδη, τα οποία αποτελούν δημοφιλείς οργανισμούς για χρήση στην παραγωγή βιοκαυσίμων (Fon Sing & Borowitzka 2015). Η επιλογή των κατάλληλων στελεχών, αλλά και η βελτιστοποίηση των συστημάτων και τεχνικών

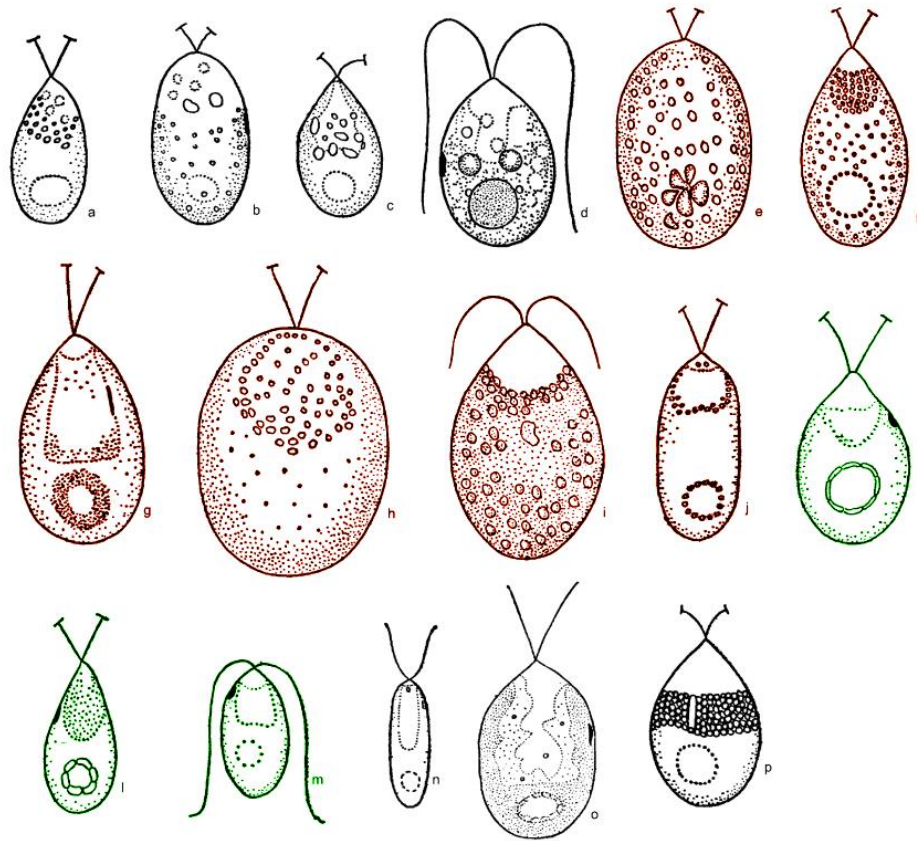
μαζικής καλλιέργειας, αποτελούν τα σημαντικότερα βήματα προς αυτήν την κατεύθυνση, με τελικό σκοπό την παραγωγή βιομάζας με το επιθυμητό λιπιδικό προφίλ (Carneiro *et al.* 2019). Το γένος *Tetraselmis* έχει μελετηθεί στο παρελθόν, ως προς τη δυνατότητα παραγωγής τρι-ακυλ-γλυκερολών (triacylglycerols, TAGs, βλ. κεφάλαιο 1.8). (Hu *et al.* 2008, Montero *et al.* 2011, Custodio *et al.* 2014, Pereira *et al.* 2016, Sansone *et al.* 2017). Οι έρευνες αυτές εστιάζουν τόσο στην ανακάλυψη και απομόνωση κατάλληλων στελεχών, όσο και στη διαχείριση διαφόρων σταδίων και μεταβλητών κατά τη διαδικασία της καλλιέργειας. Ο τύπος και το καθεστώς καλλιέργειας (culture regime, δηλ. το αν η καλλιέργεια θα είναι σε κλειστό ή ανοιχτό σύστημα), ο ρυθμός ανανέωσης των θρεπτικών (στατικές, ημι-συνεχείς ή συνεχείς καλλιέργειες), ο αερισμός κλπ., αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν το λιπιδικό περιεχόμενο των καλλιεργούμενων στελεχών (Fábregas *et al.* 1996, Otero *et al.* 1997, San Pedro *et al.* 2013, He *et al.* 2016, Martínez-Macías *et al.* 2018), ενώ ο προσδιορισμός του κατάλληλου χρονικού πλαισίου της συγκομιδής (harvesting) συμβάλλει σημαντικά στην επιτυχία της διαδικασίας (Guzmán *et al.* 2010). Αρκετές μελέτες έχουν καταγράψει την αυξημένη παραγωγή τρι-ακυλ-γλυκερολών σε καλλιέργειες *Tetraselmis* υπό συνθήκες καταπόνησης, όπως η στέρηση αζώτου (Xu *et al.* 2013, Sharma *et al.* 2014, Fon-Sing & Borowitzka 2016, Pereira *et al.* 2016, Tsai *et al.* 2016). Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες που διαφωνούν με τα αποτελέσματα αυτά, καθώς σε αντίστοιχες συνθήκες δεν καταγράφουν σημαντικές διαφορές στο λιπιδικό προφίλ των μελετηθέντων στελεχών (Otero *et al.* 1997, Rodolfi *et al.* 2009, Bondioli *et al.* 2012). Αυτό υποδεικνύει ότι η επιλογή του στελέχους διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο, δεδομένου ότι τα διάφορα στελέχη ενδέχεται να έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς απόκρισης στη μεταβολή των συνθηκών καλλιέργειας (Carneiro *et al.* 2019). Ως εκ τούτου, μια πληθώρα μελετών επικεντρώνεται στην αναζήτηση και απομόνωση στελεχών *Tetraselmis*, τα οποία εμφανίζουν επιθυμητά προφίλ παραγωγής λιπαρών οξέων και προσφέρουν τη δυνατότητα περαιτέρω βελτιστοποίησης του λιπιδικού περιεχομένου της βιομάζας τους μέσω κατάλληλων χειρισμών των μεθόδων καλλιέργειας (π.χ. Montero *et al.* 2011, Moheimani 2013, Teo *et al.* 2014, Wei *et al.* 2015, Fon Sing & Borowitzka 2016, Pereira *et al.* 2016, Carneiro *et al.* 2019).

1.11. ΤΟ ΕΙΔΟΣ *Dunaliella salina* (DUNAL) THEODORESCO 1905

1.11.1. Ταξινόμική Θεώρηση του Είδους *Dunaliella salina*

Το μονοκύτταρο γένος *Dunaliella* (Dunal) Theodoresco 1905 (Chlorophyta) έχει περιγραφεί για πρώτη φορά το 1905 από τον Ρουμάνο βοτανολόγο Emanoil. C. Teodorescu (Teodoresco), σε δείγματα που είχαν συλλεγεί από μια αλμυρή λίμνη στη Ρουμανία. Το γένος ονομάστηκε έτσι προς τιμήν του Γάλλου βοτανολόγου Michel Felix Dunal, ο οποίος ήταν ο πρώτος που παρατήρησε ερυθρόχροα μονοκύτταρα φύκη σε υπεράλμυρα ύδατα, το 1838 (βλ. Oren 2014). Ο Theodoresco περιέγραψε δύο αλόφιλα είδη, τα *D. salina* (Dunal) Teodoresco 1905 και *D. viridis* Teodoresco 1905, με το πρώτο να αποτελεί το τυπικό είδος του γένους. Με την πάροδο των ετών, το γένος αποτέλεσε αντικείμενο εντατικής έρευνας, κυρίως εξ αιτίας του ενδιαφέροντος επί των αλόφιλων ειδών του. Μία από τις σημαντικότερες εργασίες είναι εκείνη της Massjuk (1973), η οποία μετά από συστηματική εξέταση των μέχρι τότε διαθέσιμων ταξινομικών στοιχείων, προχώρησε σε μια ενδελεχή αναθεώρηση του γένους *Dunaliella* αναγνωρίζοντας 29 είδη καθώς και έναν αριθμό ποικιλιών (Εικόνα 7). Από αυτά, τα 26 είναι επί του παρόντος αποδεκτά ως διακριτές ταξινομικές μονάδες, καθώς και 3 (τρεις) ενδοειδικές μονάδες (ένα υπο-είδος, μία μορφή και μία ποικιλία), αλλά η αποδοχή των ταξινομικών μονάδων ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων ερευνητών (Guiry & Guiry 2020). Παρά τις πολυάριθμες επιστημονικές εργασίες που έχουν ασχοληθεί κατά καιρούς με το γένος, η ταξινόμική του θεώρηση, η οποία βασίζεται ως επί το πλείστον σε μορφολογικούς και φυσιολογικούς χαρακτήρες, θεωρείται ακόμη και σήμερα ανεπαρκής (Preisig 1992, Borowitzka & Siva 2007, Oren 2014, Borowitzka 2018, Polle *et al.* 2019). Η προσθήκη μοριακών και φυλογενετικών δεδομένων στα ήδη υπάρχοντα ταξινομικά στοιχεία θεωρείται ότι ενδεχομένως θα οδηγήσει σε νέες αναθεωρήσεις. Ωστόσο η ταξινόμική θέση του γένους δεν έχει διασαφηνιστεί ακόμη (González *et al.* 2001, Olmos *et al.* 2000, Olmos-Soto *et al.* 2002, Olmos *et al.* 2009, Hejazi *et al.* 2010, Assunção *et al.* 2012, 2013).

Από απόψεως συστηματικής, το γένος είχε παλαιότερα ενταχθεί στην τάξη Volvocales, οικογένεια Polyblepharidaceae, των Χλωροφυκών (Fritsch 1948). Η Massjuk (1973) τοποθέτησε το γένος στην οικογένεια Dunaliellaceae (sensu Christensen 1967), τάξη Chlamydomonadales, ενώ ο Ettl το 1983 εισήγαγε την τάξη Dunaliellales όπου και τοποθέτησε την οικογένεια Dunaliellaceae. Ωστόσο, η τάξη Dunaliellales sensu Ettl θεωρήθηκε παραφυλετική σύμφωνα με τους Nakayama *et al.* (1996). Η ταξινόμηση



Εικόνα 7. Απόσπασμα από τη μονογραφία της Massjuk (1973). Απεικονίσεις επιλεγμένων ειδών. Κόκκινο: *D. salina*, Πράσινο: *D. viridis*. (Τροποποιημένο από Borowitzka & Siva 2007)

που υιοθετείται από τους περισσότερους ερευνητές σήμερα είναι εκείνη που εντάσσει το γένος στην τάξη Chlamydomonadales, οικογένεια Dunaliellaceae (Friedl & O'Kelly 2002, Gonzáles *et al.* 2019), αλλά αρκετές ταξινομικές μελέτες αποδέχονται ακόμη το σύστημα του Ettl και την τάξη Dunaliellales (π.χ. Borowitzka & Siva 2007, Massjuk *et al.* 2007, Assunção *et al.* 2013, Cobbs 2015, Borowitzka 2013). Η σύγχυση γύρω από την ταξινόμηση του γένους οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη μορφολογία των κυττάρων και πιο συγκεκριμένα στην έλλειψη κυτταρικού τοιχώματος σε αυτά. Αντ' αυτού, τα κύτταρα του γένους καλύπτονται από ένα κολλώδες κάλυμμα τύπου-γλυκοκάλυκα, το οποίο μπορεί να παρατηρηθεί στα γηραιότερα κύτταρα (λόγω αυξημένου πάχους) αλλά συνήθως δεν είναι εμφανές στο οπτικό μικροσκόπιο (Massjuk 1973, Oliveira *et al.* 1980, Melkonian & Preisig 1984, Chardard 1987, 1990, Leonardi & Cáceres 1994, Hatanaka *et al.* 1998, Borowitzka 2018). Παρά τις ομοιότητες μεταξύ των γενών *Dunaliella* και *Chlamydomonas* Ehrenberg 1833 nom. cons. (το τελευταίο με κυτταρικό τοίχωμα), οι Melkonian & Preisig (1984) υπέδειξαν ότι οι διαφορές στη λεπτή δομή των δύο γενών είναι αρκετές ώστε το γένος *Dunaliella* να μην θεωρείται απλώς μια α-τοιχωματική μορφή του *Chlamydomonas* (Gonzáles *et al.* 2019). Οι

Chappell *et al.* (1989) υπέθεσαν ότι οι ομοιότητες στην κυτταρική διαίρεση (όπως η εμφάνιση φυκοπλάστη κατά την κυτοκίνηση) υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός προγόνου του γένους *Dunaliella*, ο οποίος έφερε κυτταρικό τοίχωμα. Η ποικιλομορφία που προκύπτει από την έλλειψη τοιχώματος στα κύτταρα *Dunaliella* στις μορφολογικές αναλύσεις έχει οδηγήσει στην εσφαλμένη ταυτοποίηση αρκετών στελεχών κατατεθειμένων σε διεθνείς συλλογές. Η αναπαραγωγή των εσφαλμένων ονομασιών στη βιβλιογραφία έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω σύγχυση γύρω από την ταξινόμηση του γένους (Loeblich 1982, Borowitzka & Borowitzka 1988, Borowitzka & Siva 2007). Το 2007, οι Borowitzka και Siva επεχείρησαν να βελτιώσουν την εν λόγω κατάσταση, συγκεντρώνοντας τα υπάρχοντα δεδομένα στην μέχρι τότε έρευνα επί του γένους, προσθέτοντας νέα και θεσπίζοντας μια κλειδα αναγνώρισης με έμφαση στα αλόφιλα είδη, η οποία και χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.

Το είδος *Dunaliella salina* αποτελεί ίσως τον πλέον μελετημένο αντιπρόσωπο του γένους. Πρόκειται για ένα αλόφιλο είδος που εμφανίζει όλα τα βασικά γνωρίσματα του γένους. Τα κύτταρα είναι ελλειψοειδή, επιμήκη, κυλινδρικά έως απιοειδή (pyriform), ενώ υπό ακραίες συνθήκες το σχήμα τους γίνεται σφαιρικό προτού επανέλθει στην κανονική του μορφή. Σε γηραιότερες καλλιέργειες, μπορεί να εμφανίζονται σφαιροειδή κύτταρα πολύ μεγάλου μεγέθους (Melkonian 1980). Το μέγεθος του κυττάρου ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος και το στάδιο του κύκλου ζωής, αλλά συνήθως κυμαίνεται από 10,9 - 16,9 μm σε μήκος και 7,9 - 13,2 μm σε πλάτος (μέσες τιμές κατά Borowitzka & Siva 2007). Το οπίσθιο άκρο του κυττάρου είναι πάντοτε αμβλύ, ενώ το εμπρόσθιο άκρο ενδέχεται να είναι ελαφρώς οξύληκτο. Τα κύτταρα ενδέχεται να έχουν αξονική συμμετρία ή να είναι ελαφρώς ασύμμετρα και νωτοκοιλιακώς πεπλατυσμένα. Από το εμπρόσθιο άκρο του κυττάρου εκφύονται δύο ισομήκη, ομοδύναμα (homodynamic) μαστίγια μήκους ίδιου με αυτό του κυττάρου. Ο χλωροπλάστης είναι ευμεγέθης, με επαρκώς ανεπτυγμένους οπίσθιους λοβούς και καταλαμβάνει σημαντικό τμήμα του κυττάρου, ενίοτε εκτεινόμενος μέχρι και τη βάση των μαστιγίων. Το πυρηνοειδές είναι ευμέγεθες, εντοπίζεται στο οπίσθιο τμήμα του χλωροπλάστη και φέρει διακριτό και επαρκώς ανεπτυγμένο περίβλημα αμυλοκοκκών. Η οφθαλμική κηλίδα εντοπίζεται στο οπίσθιο τμήμα του κυττάρου, συνήθως διαχέεται και δεν είναι ευδιάκριτη, κυρίως στα ερυθρά κύτταρα. Το είδος εμφανίζει αμφιγονική, ετεροθαλική -συνήθως- αναπαραγωγή, η οποία φαίνεται να επάγεται από την ελάττωση της αλατότητας στο μέσον καλλιέργειας (Borowitzka & Siva 2007). Σε ορισμένες περιπτώσεις τα μικρότερα κύτταρα σχηματίζουν παλμελλοειδείς μορφές, αυξάνοντας σταδιακά το μέγεθός τους πριν επανέλθουν στην κανονική τους μορφή, γεγονός που υποδεικνύει ότι ενδέχεται τα κύτταρα να απαιτείται να φτάνουν σε ένα

συγκεκριμένο μέγεθος ώστε να είναι ικανά για αμφιγονική αναπαραγωγή (Leonardi & Cáceres 1997). Παλμελλοειδή κύτταρα σχηματίζονται και ανεξαρτήτως της αναπαραγωγής, υπό ακραίες συνθήκες αλατότητας (είτε πολύ υψηλή είτε πολύ χαμηλή) (Teodoresco 1906, Lerche 1937, Borowitzka *et al.* 1991, Montoya & Olivera 1993, Leonardi & Cáceres 1997, Samanamud 1998, Wei *et al.* 2017). Σε αυτό το στάδιο, τα κύτταρα αποβάλλουν τα μαστίγια και την οφθαλμική κηλίδα και εκκρίνουν ένα βλεννώδες υλικό εντός του οποίου αναπαράγονται ταχέως σχηματίζοντας συσσωματώματα πράσινων κυττάρων. Όταν οι συνθήκες αλατότητας επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα, τότε τα μαστίγια σχηματίζονται εκ νέου και τα κύτταρα επιστρέφουν στην κινητή τους μορφή (Massjuk 1973, Borowitzka & Siva 2007). Στο είδος *Dunaliella salina* έχει παρατηρηθεί και σχηματισμός απλανοσπορίων (aplanosporoes, βλαστητικές κύστες) υπό ιδιαίτερες συνθήκες όπως μειωμένη αλατότητα, χαμηλές θερμοκρασίες και εξάντληση αζώτου στο μέσον (γρηραιότερες καλλιέργειες) (Loeblich 1969, 1972, Margulis *et al.* 1980, Borowitzka & Huisman 1993, Samanamud 1998, Borowitzka & Siva 2007, Schubert *et al.* 2010, Borowitzka 2013). Τα απλανοσπόρια έχουν σφαιρικό σχήμα, διάμετρο 12-20 μm κατά μέσον όρο, φέρουν παχύ, πτυχωτό τοίχωμα με δύο στρώσεις τοιχωματικού υλικού, ενώ στο εσωτερικό τους εμφανίζουν πράσινο, καστανέρυθρο ή ερυθρό χρωματισμό και κοκκιώδη υφή (Borowitzka & Siva 2007).

Το βασικό διαγνωστικό γνώρισμα που διαχωρίζει το είδος *D. salina* από τα άλλα είδη του γένους, δεν βασίζεται στη μορφολογία αλλά είναι βιοχημικό. Το είδος αυτό είναι αλόφιλο και ευδοκιμεί σε υπεράλμυρα περιβάλλοντα, όπως φυσικές και τεχνητές αλμυρές λίμνες, λιμνίσκους, τάφρους και αλυκές. Διαβιό σε ένα εύρος αλατοτήτων από περίπου 5‰ έως και συνθήκες κορεσμού, με συνήθη βέλτιστα σε συγκεντρώσεις NaCl 200–250‰. Υπό συνθήκες αυξημένης αλατότητας και υψηλής φωτεινής έντασης, τα κύτταρα του είδους παράγουν σημαντικές ποσότητες καρωτενοειδών και συγκεκριμένα β-καρωτενίου. Η περιεκτικότητα των κυττάρων σε β-καρωτένιο στα στελέχη του είδους υπερβαίνει το 5% του ξηρού βάρους του κυττάρου, ενώ μπορεί να φτάσει μέχρι και το 14% (Loeblich 1982, Borowitzka & Borowitzka 1988, Avron & Ben-Amotz 1992). Σύμφωνα με τους Borowitzka & Siva (2007) το είδος *D. salina* μπορεί να διακριθεί από άλλα παρόμοια αλόφιλα είδη του γένους βάσει του ποιοτικού και ποσοτικού περιεχομένου του σε καρωτενοειδή. Συγκεκριμένα, στο είδος *D. pseudosalina* Massjuk & Radchenko, το οποίο είναι επίσης αλόφιλο και παράγει σημαντικές ποσότητες καρωτενοειδών, το βασικό καρωτενοειδές είναι η κανθαξανθίνη (canthaxanthin) και όχι το β-καρωτένιο (Massjuk & Radchenko 1973, Massjuk 1973), ενώ στο *D. viridis*, το οποίο ομοιάζει με τις

πράσινες μορφές του *D. salina*, συνήθως δεν παράγονται καρωτενοειδή και ο χρωματισμός των κυττάρων παραμένει πράσινος ακόμη και σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και φωτεινής ακτινοβολίας (Borowitzka & Borowitzka 1988). Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα απλανοσπόρια *D. salina* παράγουν κατά το μάλλον κανθαξανθίνη και όχι β-καρωτένιο (Borowitzka & Huismann 1993).

Στη μελέτη στελεχών του είδους *D. salina* θα πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν το γεγονός ότι το είδος αυτό είναι πολυμορφικό, κάτι που περιπλέκει την αναγνώριση και την ταξινόμηση. Η Massjuk (1973) περιέγραψε μια σειρά υπο-ειδών (subspecies) και μορφών (forma) του είδους, αρκετά εκ των οποίων πλέον θεωρούνται συνώνυμα του είδους (Borowitzka & Siva 2007). Σημειώνεται ότι το *D. bardawil* Ben-Amotz & Avron 1982 (nom. inval.) που αποτέλεσε αντικείμενο έντονου ενδιαφέροντος και εμφανίζεται σε μια πληθώρα δημοσιεύσεων σχετιζόμενων με τη μελέτη των καρωτενοειδών (π.χ. Ben-Amotz & Avron 1983a,b, Ben-Amotz *et al.* 1988, Lers *et al.* 1990, Jimenez *et al.* 1993, Rabbani *et al.* 1998, Jahnke 1999, Salguero *et al.* 2003), θεωρείται συνώνυμο του *D. salina* (Borowitzka & Siva 2007, Guiry & Guiry 2020). Ορισμένα από τα προαναφερθέντα υπο-είδη και μορφές ενδεχομένως αντιπροσωπεύουν διαφορετικά είδη, γεγονός που ενισχύεται από την ένδειξη ότι εντός του είδους υπάρχει η πιθανότητα κρυπτικής ειδογένεσης (cryptic speciation), όπως υποδεικνύουν μοριακά δεδομένα γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των στελεχών του (Gómez & González 2001, 2004, βλ. επίσης Borowitzka & Siva 2007). Ωστόσο, τα μέχρι σήμερα μορφολογικά και μοριακά δεδομένα δεν επαρκούν ώστε να υποστηριχθεί ένας τέτοιος διαχωρισμός. Το γεγονός ότι το διαγνωστικό γνώρισμα, δηλ. η παραγωγή σε β-καρωτένιο των στελεχών του είδους, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις εκάστοτε περιβαλλοντικές παραμέτρους, και συμβάλλει στην ταξινομική ασάφεια του είδους και τον μορφολογικό πολυμορφισμό που εμφανίζουν τα στελέχη του. Οι μελέτες του γένους *Dunaliella* εστιάζουν ως επί το πλείστον στην παραγωγή β-καρωτενίου. Οι μοριακές φυλογενετικές μελέτες είναι περιορισμένες και δεν έχουν οδηγήσει στη διασαφήνιση της συστηματικής του γένους (Wilcox *et al.* 1992, Olmos *et al.* 2000, 2002, González *et al.* 1998, 2019, Hejazi *et al.* 2010, Smith *et al.* 2010, Assunção *et al.* 2012, Olmos-Soto 2012).

1.11.2. Οικολογική Θεώρηση του Είδους *Dunaliella salina*

Το γένος *Dunaliella* έχει παγκόσμια εξάπλωση και σημαντικό οικολογικό εύρος, περιλαμβάνοντας είδη που ευδοκίμουν σε θαλάσσια (υπο-γένος *Dunaliella*, sectio

Tertiolectae), υπεράλμυρα (υπο-γένος *Dunaliella*, sectio *Dunaliella*, *Virides* και *Peirceinae*) αλλά και γλυκά (υπο-γένος *Pascheria*) ύδατα (González *et al.* 2019). Το γένος παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσον αφορά στην οικολογία των υπεράλμυρων οικοσυστημάτων, αφού τα αλόφιλα είδη του αποτελούν τους κυριότερους -αν όχι μοναδικούς- πρωτογενείς παραγωγούς στα περιβάλλοντα αυτά, επιβιώνοντας σε συνθήκες αλατότητας όπου είναι σχεδόν αδύνατη η ανάπτυξη άλλων οξυγονο-παραγωγικών (oxygenic), αυτότροφων οργανισμών (Baas Beeking 1934, Oren *et al.* 1995, 2005, 2014, Liska *et al.* 2004, Bardavid *et al.* 2006, Seckbach & Oren 2007, Boutaiba *et al.* 2011). Η εξαιρετική προσαρμογή των ειδών αυτών σε συνθήκες υψηλής αλατότητας οδήγησε στη χρήση τους ως προτύπων συστημάτων για τη μελέτη της φωτοσύνθεσης, της προσαρμογής στην αλατότητα (π.χ. Ginzburg 1987, Avron & Ben-Amotz 1992, Melis *et al.* 1998, Liu & Shen 2006, Giordano & Beardall 2009, Oren 2009, Ramos *et al.* 2011, Park *et al.* 2015, Ben-Amotz *et al.* 2019) και της απόκρισης στην περιβαλλοντική καταπόνηση (Cowan *et al.* 1992, Heidari *et al.* 2000, Coesel *et al.* 2008). Η ικανότητα των αλόφιλων και αλο-ανθεκτικών ειδών του γένους να επιβιώνουν σε τέτοια περιβάλλοντα, οφείλεται στη δυνατότητα ωσμωτικής εξισορρόπησης του ενδοκυττάρου με το εξωκυττάριο υπέρτονο περιβάλλον, μέσω της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης του μεταβολίτη γλυκερόλη. Η γλυκερόλη είναι μια τρισθενής αλκοόλη (τριόλη), η οποία δεν κρυσταλλοποιείται αλλά εμφανίζει αξιοσημείωτη διαλυτότητα και δρα ως ωσμωρρυθμιστικό μόριο, προστατεύοντας την ακεραιότητα του κυττάρου υπό συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης (Ben-Amotz & Avron 1973, Borowitzka & Brown 1974, Ben-Amotz *et al.* 1982, Chitlaru & Pick 1991, Chen *et al.* 2009).

Το είδος *D. salina* είναι ένα από εκείνα που, όπως προαναφέρθηκε, διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στα τροφικά πλέγματα των υπεράλμυρων περιβαλλόντων, αποτελώντας πηγή τροφής για το εκεί ζωοπλαγκτόν, και ιδιαίτερος για τα καρκινοειδή του γένους *Artemia* (Davis & Giordano 1995, Mohebbi 2010) αλλά και για ετερότροφα Δινομαστιγωτά (Jeong 1999). Η σημασία του είδους για το περιβάλλον των αλυκών (salterns, salt pans) είναι επίσης αξιοσημείωτη, αφού το είδος αυτό φαίνεται να σχετίζεται με την παραγωγή κρυστάλλων NaCl, αυξάνοντας την εξάτμιση των υδάτων λόγω της εστίασης της ηλιακής ακτινοβολίας στις περιοχές όπου αναπτύσσεται (Javor 2002, Δολαψάκης 2008, Oren 2010). Ωστόσο, οι υψηλές αφθονίες των πληθυσμών κατά τη διάρκεια παροδικών ανθίσεων (blooms) ενδέχεται να έχουν αρνητικές επιδράσεις στην ποιότητα των κρυστάλλων του άλατος (Giordano *et al.* 1994, Davis 2000, Giordano *et al.* 2014). Η πλειονότητα των μελετών σχετίζεται μάλλον με τη βιοχημεία του είδους αυτού και την ικανότητα των κυττάρων του να παράγουν

αξιοσημείωτες ποσότητες β-καρωτενίου, ενός οικονομικά αξιοποιήσιμου μεταβολίτη (βλ.Κεφάλαιο 1.11.4), παρά με την *in situ* οικολογία του. Ωστόσο, ο Oren (2014) παρουσίασε μια εκτενή οικολογική ανασκόπηση επί των πληθυσμών του γένους σε διάφορα φυσικά περιβάλλοντα όπου τα είδη επιβιώνουν. Φαίνεται εκεί ότι το είδος *D. salina* έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη βιοτική συνιστώσα πολλών διαφορετικών οικοσυστημάτων ανά τον κόσμο. Παρατίθενται παραδείγματα αλμυρών λιμνών όπως η λίμνη Great Salt Lake στις Η.Π.Α., όπου κατά περιόδους τα είδη *D. salina* και *D. viridis* διαπιστώθηκε ότι έχουν αποτελέσει τη βασική συνιστώσα των βιοκοινοτήτων (Post 1977, Felix & Rushforth 1979, Meuser *et al.* 2013, Larson & Belovsky 2013), και η εποχιακή αλμυρή λίμνη Tyrell στην Αυστραλία, όπου τα υπεράλμυρα είδη *Dunaliella* διαπιστώθηκε ότι αποτελούν τη συντριπτική πλειοψηφία των βιοτικών μονάδων εντός του ορυκτού άλατος (αλίτης, halite) που καλύπτει τον πυθμένα της λίμνης (Heidelberg *et al.* 2013). Αναφέρεται επίσης ότι αλυκές είναι ένα περιβάλλον όπου το είδος *D. salina* ευδοκιμεί ιδιαίτερω σε ευτροφικές αλυκές ενώ μπορεί να απουσιάζει σχεδόν πλήρως από τις ολιγοτροφικές (Rodriguez-Valera *et al.* 1985, Javor 1983, 2002, Dolapsakis *et al.* 2005, Δολαψάκης 2008).

Οι Dolapsakis *et al.* (2005), διεξάγοντας μια συγκριτική μελέτη *in situ* πληθυσμών *D. salina* στις βιοκοινωνίες των αλυκών του Μεγάλου Εμβόλου στο Αγγελοχώρι Θεσσαλονίκης (περιοχή από την οποία απομονώθηκαν τα περισσότερα από τα μελετηθέντα στελέχη στα πλαίσια της διατριβής του Ν. Δολαψάκη 2008) με εργαστηριακούς πληθυσμούς του είδους, παρατήρησαν τα εξής: ενώ το είδος ευδοκιμεί σε υψηλές αλατότητες στις *in situ* βιοκοινωνίες (καταλαμβάνοντας μέχρι και το 1/4 της αφθονίας), δεν παρουσίασε αντίστοιχη ανάπτυξη σε αντίστοιχες αλατότητες των εργαστηριακών πειραμάτων. Επίσης προσδιόρισαν τους βασικούς παράγοντες που επιδρούν επί της αύξησης των στελεχών τόσο στο πεδίο όσο και στα εργαστηριακά πειράματα. Παράγοντες όπως η αλατότητα, η επαρκής διαθεσιμότητα φωσφόρου και ο χαμηλός λόγος αζώτου/φώσφορο (N/P) φαίνεται να ευνοούν την αύξηση των στελεχών τόσο σε φυσικό όσο και σε εργαστηριακό περιβάλλον, ενώ για τους φυσικούς πληθυσμούς σημαντικό ρόλο φάνηκε ότι διαδραματίζει και η θήρευση από το ζωοπλαγκτόν (Dolapsakis *et al.* 2005). Στην Ελλάδα, η μελέτη της οικολογίας του είδους τόσο *in situ* όσο και *in vitro* (σε εργαστηριακά στελέχη) είναι ουσιαστικά ανύπαρκτη, με την προαναφερθείσα μελέτη των Dolapsakis *et al.* (2005) και την αντίστοιχη Διδακτορική διατριβή (Δολαψάκης 2008) να είναι οι μοναδικές εργασίες επί του παρόντος που έχουν ασχοληθεί με τοπικά στελέχη από φυσικούς και εργαστηριακούς πληθυσμούς *D. salina* σε επίπεδο οικολογίας.

Η μελέτη του είδους *D. salina* in vitro προτιμάται στην πλειονότητα των μελετών έχοντας ως πλεονέκτημα την ευκολία καλλιέργειας των στελεχών αυτού (Gibor 1956, Dolapsakis *et al.* 2005, Borowitzka & Siva 2007), σε αντιπαράθεση με τη δυσκολία της αντίστοιχης in situ μελέτης των πληθυσμών του (Oren 2009). Η δυσκολία αυτή σχετίζεται ως επί το πλείστον με τη μεταβλητότητα της μορφολογίας των κυττάρων στους φυσικούς πληθυσμούς ανάλογα με τις συνθήκες και τον κύκλο ζωής (Massjuk 1973, Borowitzka & Borowitzka 1988, Borowitzka & Siva 2007). Ένα επιπλέον πρόβλημα είναι η δυσκολία διάκρισης των κυττάρων του είδους *D. salina* από παρόμοια είδη, όπως το ανταγωνιστικό είδος *D. viridis* το οποίο είναι επίσης αλόφιλο και επιβιώνει στις ίδιες συνθήκες με το *D. salina* (Moulton *et al.* 1987, Borowitzka & Borowitzka 1988, Borowitzka & Siva 2007). Συχνά, τα είδη αυτά αποτελούν το μεγαλύτερο τμήμα της ευκαρυωτικής βιοτικής συνιστώσας των συστημάτων όπου διαβιούν, αναπτύσσονται ταυτοχρόνως και οι πληθυσμοί τους δρουν ανταγωνιστικά (Brock 1975, Moulton *et al.* 1987, Giordano & Beardall 2009, Oren *et al.* 2014). Επιπροσθέτως, τα πράσινα κύτταρα των δύο ειδών είναι σχεδόν πανομοιότυπα, γεγονός που καθιστά αρκετά δυσχερή τη διάκριση μεταξύ τους. Η επιτυχής αναγνώριση των κυττάρων *D. salina* εξαρτάται, κατά συνέπεια, από το στάδιο του κύκλου ζωής τους κατά τη χρονική στιγμή της παρατήρησης (Massjuk 1973, Borowitzka & Siva 2007, Δολαψάκης 2008). Αν και το είδος *D. salina* συνήθως επικρατεί του *D. viridis* στις πολύ υψηλές αλατότητες (>100‰), η μεταβλητότητα των συνθηκών στα περιβάλλοντα όπου οι οργανισμοί επιβιώνουν μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα εσφαλμένη αξιολόγηση των ποσοτικών δεδομένων επειδή κατά τη δειγματοληψία υπαίθρου παρατηρείται μετακίνηση των κυττάρων *D. viridis* από την υδάτινη στήλη σε μεγαλύτερα βάθη προς αποφυγή των υψηλών εντάσεων ακτινοβολίας (Moulton *et al.* 1987). Επίσης, σε χαμηλές θερμοκρασίες, το *D. viridis* μπορεί να επικρατεί ακόμη και σε υψηλότερες αλατότητες (Larson & Belovsky 2013). Αντιθέτως, η ευκολία διαχείρισης των συνθηκών στο εργαστήριο επιτρέπει την “επιλογή” από τον εκάστοτε ερευνητή των στελεχών *D. salina* με την αύξηση της αλατότητας, της θερμοκρασίας και της φωτεινής ακτινοβολίας στην καλλιέργεια, σε τιμές ευνοϊκές για το είδος αυτό έναντι του *D. viridis* (Moulton *et al.* 1987).

1.11.3. Βιοχημικό ενδιαφέρον του Είδους *Dunaliella salina*

Η in vitro μελέτη του είδους *D. salina* εστιάζει ως επί το πλείστον στη μεταβολική απόκριση αυτού σε συνθήκες καταπόνησης και κυρίως στην παραγωγή και συσσώρευση καρωτενοειδών στο εσωτερικό των κυττάρων του. Λιπαρά σταγονίδια

β-καρωτενίου συσσωρεύονται εντός του χλωροπλάστη, στους χώρους μεταξύ των θυλακοειδών και περιφερειακά, πλησίον της πλασματικής μεμβράνης, δίνοντας στο κύτταρο κίτρινο, καστανό ή ερυθρό χρωματισμό (Ben-Amotz 1982, Hejazi *et al.* 2004). Η παραγωγή β-καρωτενίου φαίνεται να έχει ως πρωταρχικό ρόλο την προστασία του κυττάρου από οξειδωση (Ben-Amotz & Avron 1983a, Ben-Amotz *et al.* 1987, White & Jahnke 2002). Η οξειδωση αυτή προκύπτει από τη δημιουργία ελευθέρων ριζών οξυγόνου και υδροξυλίου (reactive oxygen species, ROS), οι οποίες σχηματίζονται κατά τη διέγερση της χλωροφύλλης όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε έντονη φωτεινή ακτινοβολία (Reddy & Raghavendra 2006, Ramel *et al.* 2012, Kottuparambil *et al.* 2012, Foyer 2018). Τα καρωτενοειδή έχουν τη δυνατότητα να εξουδετερώνουν αυτές τις ελεύθερες ρίζες, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη φωτο-αναστολή (photoinhibition), δηλαδή τη διαταραχή της λειτουργίας της φωτοσυνθετικής συσκευής (Krinsky & Denke 1982, Ben-Amotz *et al.* 1987, 1989, Choudhury & Behera 2002). Η υψηλή ένταση της φωτεινής ακτινοβολίας δεν είναι ο μόνος παράγοντας που επάγει τη συσσώρευση β-καρωτενίου στα κύτταρα του είδους *D. salina*. Η παραγωγή του μεταβολίτη φαίνεται να πυροδοτείται και από άλλους παράγοντες καταπόνησης, όπως η αυξημένη αλατότητα, οι ακραίες τιμές pH και θερμοκρασίας και η στέρση θρεπτικών συστατικών στο μέσον. Η καρωτενο-γένεση (carotenogenesis) έχει υποδειχθεί ότι σχετίζεται με την επιβράδυνση της κυτταρικής διαίρεσης, την οποία και προκαλούν οι προαναφερθέντες παράγοντες (Milko 1963, Loeblich 1970, 1974, Massjuk & Radchenko 1971, Ben-Amotz *et al.* 1982, Ben-Amotz & Avron 1983a, Ben-Amotz 1996, Borowitzka *et al.* 1990, Shaish *et al.* 1993, Kró *et al.* 1997, Kleinegris *et al.* 2010a). Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός που πυροδοτεί την παραγωγή β-καρωτενίου στα κύτταρα *D. salina*, παραμένει ασαφής. Ο μηχανισμός αυτός δεν σχετίζεται με φωτο-υποδοχή (Ben-Amotz & Avron 1989, Jahnke 1999) αλλά μάλλον με την οξειδωτική καταπόνηση (stress), η οποία προκαλείται από την εμφάνιση ελευθέρων ριζών (Shaish *et al.* 1993). Οι μηχανισμοί ανίχνευσης των ελευθέρων ριζών στους φυτικούς οργανισμούς δεν έχουν διαλευκανθεί ακόμη (Pitzschke & Hirt 2006), αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι η κατάσταση αναγωγής της πλαστοκινόνης στη φωτοσυνθετική αλυσίδα ενδεχομένως διαδραματίζει κάποιο ρόλο στον μηχανισμό αυτό και στη συσσώρευση β-καρωτενίου στο είδος *D. salina* (Lamers 2011). Η συσσώρευση β-καρωτενίου και η επίδραση των συνθηκών καταπόνησης στον μηχανισμό που την πυροδοτεί, σε στελέχη του γένους *Dunaliella*, αποτελεί ένα από τα πλέον ενδιαφέροντα ζητήματα στην έρευνα του γένους (π.χ. Borowitzka *et al.* 1990, Gómez *et al.* 2003, Cifuentes *et al.* 1996, 2001, Fazelli *et al.* 2006, Abu-Rezq *et al.* 2010, Farhat *et al.* 2011, Pasqualetti *et al.* 2011, Wu *et al.* 2016). Οι ερευνητικές αυτές προσπάθειες υποκινούνται κυρίως από την αναζήτηση εγχώριων στελεχών τα

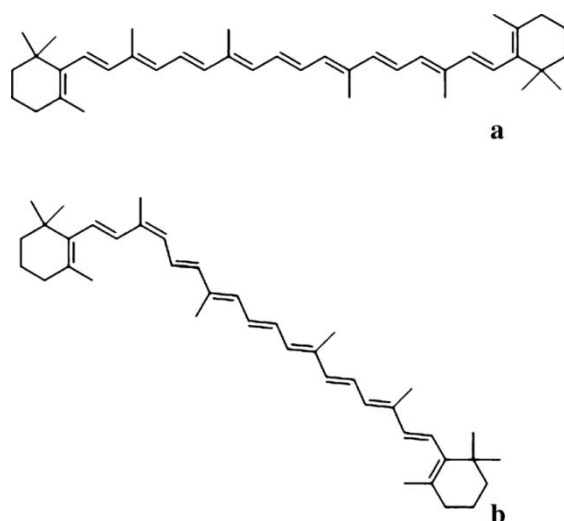
οποία θα δύνανται να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανική παραγωγή φυσικού β-καρωτενίου (βλ. Κεφάλαιο 1.11.4.). Ταυτοχρόνως, οι έρευνες αυτές προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη δια-ειδική και την ενδο-ειδική ποικιλότητα του γένους και συμβάλλουν στη διαλεύκανση των ταξινομικών και φυλογενετικών ασαφειών που σχετίζονται με αυτήν (Markovits *et al.* 1993, Gómez & González 2001, 2004, 2005, Olmos-Soto *et al.* 2002, Garcia *et al.* 2007, Mendoza *et al.* 2008, Guzmán *et al.* 2012, Hashemi *et al.* 2020).

1.11.4. Βιομηχανικό ενδιαφέρον

Είναι εμφανές, από το προηγούμενο κεφάλαιο, ότι το αλόφιλο είδος *Dunaliella salina* εμφανίζει μια αξιοσημείωτη ικανότητα προσαρμογής σε ακραίες τιμές αλατότητας. Παράγοντας β-καρωτένιο και γλυκερόλη σε περίσσεια, τα κύτταρα του είδους επιτυγχάνουν να διατηρούν την ωσμωτική ισορροπία τους παρά την υψηλή εξωκυτάρια συγκέντρωση αλάτων. Αυτή η πλεονάζουσα παραγωγή μεταβολιτών αποτελεί αντικείμενο εκτενούς εκμετάλλευσης σε μαζική κλίμακα και έχει μεγάλο εύρος εφαρμογών (Borowitzka *et al.* 1984, Ben-Amotz & Avron 1990, Raja *et al.* 2007, Lamers *et al.* 2008, Hosseini Tafreshi & Shariati 2009, Emeish 2012, Ben-Amotz 2019). Το είδος *D. salina* είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος για τις υδατοκαλλιέργειες, (Ben-Amotz *et al.* 1989, Supamattaya *et al.* 2005, Cañavate *et al.* 2007, Bhosale *et al.* 2010, Ramos *et al.* 2011, Markou & Nerantzis 2013) εξ αιτίας της ανοχής που εμφανίζει σε διάφορες συνθήκες περιβαλλοντικής καταπόνησης και της βιοχημικής απόκρισής του σε αυτές και, συνεπώς, αποτελεί ένα από τα πλέον μελετημένα είδη του γένους *Dunaliella* από βιοχημικής απόψεως. Τις τελευταίες δεκαετίες, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στο είδος αυτό για την παραγωγή β-καρωτενίου, το οποίο χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων, αλλά και για μελέτες γενετικής μηχανικής και βιοτεχνολογίας (Borowitzka & Borowitzka 1990, Xue *et al.* 2006, Lamers *et al.* 2008, Zhu & Jiang 2008, Borowitzka 2013, Feng *et al.* 2014).

Επί του παρόντος, ένας μεγάλος αριθμός καρωτενοειδών έχουν αναφερθεί στη φύση και αρκετά από αυτά αποτελούν πρόδρομα μόρια της βιταμίνης Α (προ-βιταμίνη Α) συμπεριλαμβανομένων του α-καρωτενίου, β-καρωτενίου και της β-κρυπτοξανθίνης (Bauernfeind 1972, Simpson 1983, Faure *et al.* 1999, Handelman 2001, Cardoso *et al.* 2017, Rodriguez-Concepcion *et al.* 2018, Amengual 2019, von Lintig & Babino 2020). Αν και ορισμένα καρωτενοειδή - για παράδειγμα το β-καρωτένιο και η ζεαξανθίνη - είναι διαθέσιμα σε συνθετική μορφή, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για

καρωτενοειδή προερχόμενα από φυσικές πηγές όπως τα μικροφύκη, βακτήρια και τους μύκητες (Ventosa & Nieto 1995, Harker *et al.* 1996, Bhosale 2004, Abe *et al.* 2007, Papaioannou & Liakopoulou-Kyriakides 2008, Kleinegris *et al.* 2010b, Varzakakou *et al.* 2010, Marova *et al.* 2011, Vaquero *et al.* 2012, βλ. και Da Costa Cadroso *et al.* 2017), προσφέροντας τη δυνατότητα για οικονομικά εκμεταλλεύσιμη βιολογική παραγωγή β-καρωτενίου. Εκτός από τη χρήση του στις υδατοκαλλιέργειες και τη βιομηχανία τροφίμων, η αντι-οξειδωτική δράση του β-καρωτενίου έχει οδηγήσει στη διερεύνηση και της ανοσορρυθμιστικής του δράσης και της πιθανής εφαρμογής του στη χημειο-προστασία (chemo-prevention) κατά του καρκίνου (Toba *et al.* 1997, Nishino *et al.* 2002) αλλά και στην αποτοξίνωση από ραδιενέργεια (Ben-Amotz *et al.* 1998).



Εικόνα 8. Ισομερή του β-καρωτενίου που εμφανίζονται στα μικροφύκη.
a) 9-cis β-καρωτένιο, b) all-trans β-καρωτένιο.
(Τροποποιημένο από Raja *et al.* 2007)

Στο παρελθόν, οι βασικές διατροφικές πηγές β-καρωτενίου για τον άνθρωπο (συμπληρώματα) περιείχαν κατά βάση συνθετικό καρωτένιο, και μόνο ένα μικρό ποσοστό προερχόταν από άμεση κατανάλωση τροφίμων όπως φρούτα και λαχανικά, που αποτελούν φυσικές πηγές της χρωστικής αυτής (Castenmiller & West 1998, Raja *et al.* 2007, Aberoumand 2011, Jaswir *et al.* 2011). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον έχει στραφεί προς τη βιοτεχνολογική παραγωγή φυσικού β-καρωτενίου από μικροοργανισμούς (Dominguez-Espinoza & Webb 2003, Kumar *et al.* 2015, Da Costa Cadroso *et al.* 2017) εξ αιτίας των αυξανόμενων προβληματισμών σχετικά με την τοξικότητα των συνθετικών χημικών που χρησιμοποιούνται στη διατροφή του ανθρώπου (Dufossé *et al.* 2005, Kumar *et al.* 2015, Da Costa Cadroso *et al.* 2017). Το β-καρωτένιο υπάρχει στη φύση υπό μορφή διαφόρων ισομερών (all-trans, 9-cis, 13-cis, 15-cis) (Wang *et al.* 1994). Το παραγόμενο από τα μικροφύκη β-καρωτένιο

συνήθως περιέχει δύο ισομερή, τα all-trans και 9-cis (Εικόνα 8) (Ben-Amotz *et al.* 1982). Το αντι-οξειδωτικό δυναμικό του β-καρωτενίου εξαρτάται από την αναλογία των δύο αυτών μορφών, και η υψηλότερη περιεκτικότητα σε 9-cis ισομερές έχει ως αποτέλεσμα ανώτερης ποιότητας χρωστική διότι εμφανίζει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση (Jimenez & Pick 1993). Επίσης, το 9-cis ισομερές δρα ως άμεσο πρόδρομο μόριο για το 9-cis ρετινοϊκό οξύ (9-cis retinoic acid), το οποίο σχετίζεται με την καλή λειτουργία των επιθηλιακών ιστών (Nagao & Olson 1994), ενώ παράλληλα επιδεικνύει και χημειο-προστατευτική αντικαρκινική δράση (Krinsky *et al.* 1994, Rubin *et al.* 1994, Gottardis *et al.* 1996, Hansen *et al.* 2000, Hieber *et al.* 2000, Eskra *et al.* 2017).

Το περιεχόμενο του β-καρωτενίου που παράγεται από τα κύτταρα *Dunaliella salina* μπορεί να περιέχει μέχρι και 50% 9-cis-β-καρωτένιο ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας (Ben-Amotz *et al.* 1988, Johnson *et al.* 1996, Garcia-González *et al.* 2005) ενώ εμφανίζει και επιπλέον πλεονεκτήματα όπως αυξημένη απορρόφηση και υψηλή αποδοτικότητα, και μπορεί να παράγεται σε ποσότητες μέχρι και 14% του ξηρού βάρους του κυττάρου (Metting 1996). Εκτός αυτού, το είδος *D. salina* παρουσιάζει πλεονεκτήματα εξ αιτίας των ενδογενών γνωρισμάτων του, όπως οι υψηλοί μεταβολικοί ρυθμοί, η φυσιολογική και μεταβολική του ευελιξία, αλλά και η δυνατότητα αποδοτικής καλλιέργειάς του σε βιομηχανική κλίμακα με ταυτόχρονο “χειρισμό” (manipulation) των καλλιεργειών του προς παραγωγή των επιθυμητών ποσοτήτων του μεταβολίτη (Borowitzka 1990, Garcia-González *et al.* 2005, Raja *et al.* 2007, Zhu & Jiang 2008, Kleinegriss *et al.* 2010b, 2011, Prieto *et al.* 2011, Lamers *et al.* 2012, Sathasivam *et al.* 2013, Ying *et al.* 2014, Morowvat & Ghasemi 2016).



Εικόνα 9. Μονάδα μαζικής καλλιέργειας *D. salina* στη λιμνοθάλασσα Hutt, Αυστραλία (Τροποποιημένο από Bordenes 2017)

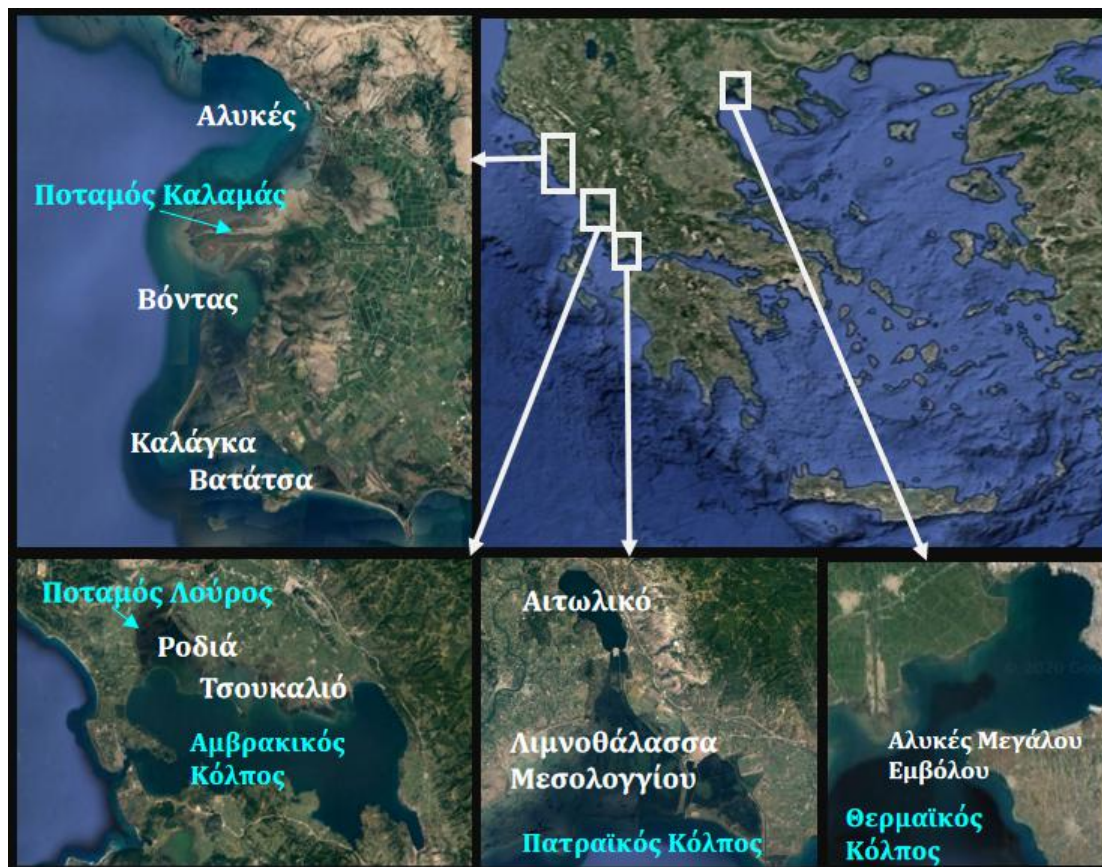
Μονάδες μαζικής καλλιέργεια *D. salina* προς εμπορική παραγωγή β-καρωτενίου (Εικόνα 9) υπάρχουν επί του παρόντος στην Αυστραλία, τις ΗΠΑ, το Ισραήλ και την

Κίνα (Wu *et al.* 2017). Οι καλλιέργειες σε εξωτερικούς χώρους προτιμώνται σε αυτές τις περιπτώσεις, λόγω του χαμηλού κόστους και της ευκολίας στη διαχείριση, παρά τη χαμηλή αποδοτικότητά τους σχέση με τα κλειστά συστήματα (Jiang & Zhu 2010, Borowitzka 2013). Ωστόσο, οι σχετικές έρευνες εστιάζουν πλέον σε κλειστά συστήματα καλλιέργειας ούτως ώστε το υψηλότερο κόστος αυτών να αντισταθμιστεί από την αποδοτικότερη παραγωγή βιομάζας και μεταβολιτών που είναι εφικτά εξ αιτίας του καλύτερου ελέγχου του συστήματος (Gomes 2018, Khadim *et al.* 2018, Zhu *et al.* 2018, Ershad *et al.* 2019, Hashemi *et al.* 2020). Παράλληλα, το ενδιαφέρον έχει στραφεί προσφάτως και στην παραγωγή βιοκαυσίμων με τη χρήση στελεχών *D. salina* (π.χ. Weldy & Huesemann 2007, Stephenson *et al.* 2011, Shenbaga Devi *et al.* 2012, Eman & El 2013, Gimpel *et al.* 2013, Liu *et al.* 2013, Rasoul-Amini *et al.* 2014, Cho *et al.* 2016). Ως αποτέλεσμα η απομόνωση και ταυτοποίηση στελεχών που παράγουν υψηλές ποσότητες των επιθυμητών μεταβολιτών καθώς και η βελτιστοποίηση των καλλιεργειών αυτών για την παραγωγή φυσικού β-καρωτενίου είναι στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος και αποτελούν τους βασικούς άξονες των μελλοντικών σχετικών ερευνών (Gómez *et al.* 2003, Hejazi *et al.* 2004, Raja *et al.* 2007, Mendoza *et al.* 2008, Farhat *et al.* 2011, Rad *et al.* 2011, Emeish 2012, Sathasivam *et al.* 2012, Park *et al.* 2013, Morowvat & Ghasemi 2016).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι περιοχές προέλευσης των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της Διατριβής απεικονίζονται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 10. Περιοχές προέλευσης των στελεχών της Τράπεζας AthU-AI (ήδη απομονωθέντων και κατατεθειμένων στα πλαίσια της διατριβής).
(Εικόνες: © GoogleEarth, TerraMetrics 2020)

Η Δυτική Ελλάδα δέχεται την επίδραση του ισχυρού κυματισμού της θάλασσας του Ιονίου που σε συνάρτηση με τις χαμηλές παλίρροιες και τις αυξημένες βροχοπτώσεις και ποτάμιες αποθέσεις δημιουργούν ένα τοπίο το οποίο καλύπτει περισσότερο από το 40% της λιμνοθαλάσσιας επιφάνειας στην Ελλάδα (Nicolaidou *et al.* 2005).

Η λιμνοθάλασσα του Μεσολογίου αποτελεί το μεγαλύτερο λιμνοθαλάσσιο σύστημα της Ελλάδος και ένα από τα σημαντικότερα αντίστοιχα συστήματα στη Μεσόγειο, τόσο από άποψη οικολογίας όσο και ιχθυοπαγωγής (Katselis *et al.* 2003), προστατεύεται δε από διεθνείς συνθήκες (π.χ. Σύμβαση Ramsar 1971, βλ. Maragou & Mantziou 2000, Οικολογικό Δίκτυο Natura 2000). Σημαντικό τμήμα της λιμνοθάλασσας έχει σχηματιστεί από τις αποθέσεις των ποταμών Αχελώου και Ευήνου. Στα παρόχθια

αβαθή σημεία της λιμνοθάλασσας φύονται εκτενείς λειμώνες σπερματοφύτων (π.χ. *Ruppia maritima* Linnaeus, *Zostera marina* Linnaeus) καθώς και ορισμένων ανώτερων φυκών και φαιοφυκών (Wolff 1968, Δανιηλίδης 1991). Σε αρκετά σημεία της λιμνοθάλασσας αναπτύσσονται μονάδες παραδοσιακής εκτατικής καλλιέργειας (διβάρια), ενώ το σύστημα είναι επίσης αποδέκτης γεωργικών και αστικών αποβλήτων μέσω προσωρινών χειμαρρικών απορροών, σταθμών αποστράγγισης και καναλιών (Avramidis *et al.* 2010).

Η λιμνοθάλασσα του Αιτωλικού εντοπίζεται στο βόρειο τμήμα του συστήματος και είναι μια σχετικώς απομονωμένη, μερομικτική, υφάλμυρη παράκτια λίμνη, η οποία δεν επικοινωνεί απευθείας με την ανοιχτή θάλασσα αλλά επικοινωνεί μέσω στενών διαύλων (βάθους περίπου 1m) με τη νοτίως παρακείμενη λιμνοθάλασσα του Μεσολογγίου. Ως εκ τούτου, εμφανίζει περιορισμένη ανάμιξη γεγονός που σε συνάρτηση με το μεγάλο της βάθος (~33m), έχει ως αποτέλεσμα το Αιτωλικό να εμφανίζει μόνιμο θερμοκλινές και αλοκλινές καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Δανιηλίδης 1991, Gianni 2011). Στο νοτιοδυτικό τμήμα υπάρχει απορροή γλυκών υδάτων προερχομένων από κατακρημνίσεις και αρδευτικά κανάλια των γύρω γεωργικών περιοχών (Nicolaidou *et al.* 2005). Στο παρελθόν έχουν καταγραφεί αρκετές περιπτώσεις ανοξικών συμβάντων, η συχνότητα των οποίων έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες, ενδεχομένως εξ αιτίας των προαναφερθεισών εκροών αλλά και της αυξημένης προσθήκης θρεπτικών μέσω του εργοστασίου Βιολογικού Καθαρισμού που λειτουργεί στην πόλη του Αιτωλικού (Nicolaidou *et al.* 2005, Kehayias *et al.* 2013, Koutsodendris *et al.* 2015).

Στα χρονικά πλαίσια της εν λόγω Διατριβής πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες στο λιμνοθαλάσσιο σύστημα Μεσολογγίου-Αιτωλικού. Στην Εικόνα 11 φαίνονται οι δειγματοληπτικοί σταθμοί. Όλοι οι σταθμοί τοποθετήθηκαν σε σημεία όπου η στάθμη των υδάτων ήταν > 2 m ώστε να αποφευχθεί κατά το δυνατόν η λήψη περιφύτου.

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε εποχική βάση, σε έναν (1) σταθμό εντός της λιμνοθάλασσας του Αιτωλικού (A), καθώς και σε τρεις (3) σταθμούς εντός της λιμνοθάλασσας του Μεσολογγίου (M1, M2, M3). Οι σταθμοί του Μεσολογγίου επελέγησαν ούτως ώστε να καλύπτουν τις “τυπικές” ζώνες μιας λιμνοθάλασσας, οι οποίες διαμορφώνονται ανάλογα με την αλατότητα των υδάτων και τη σύνθεση των βιοκοινωνιών, σύμφωνα με τους Remane & Schlieper (1971) και Barnes (1980). Οι ζώνες αυτές είναι:

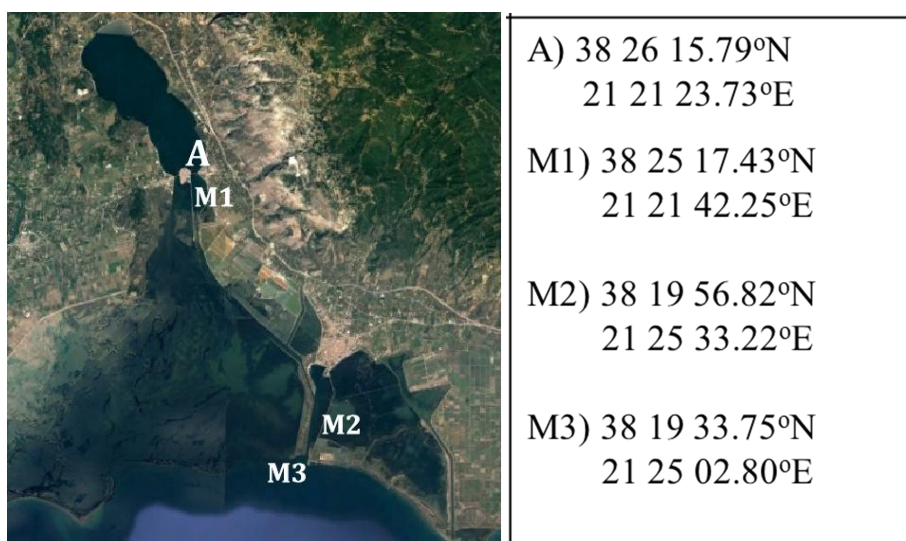
α) Η **αλμυρή** ζώνη, η οποία εντοπίζεται σε περιοχή του διαύλου κοντά στη θάλασσα, με σαφείς ομοιότητες με την παρακείμενη θάλασσα (Πατραϊκός κόλπος), αντιπροσωπευόμενη από τον σταθμό **M3** (“αλμυρός σταθμός”).

β) Η **υπεράλμυρη** ζώνη, η οποία εντοπίζεται σε ρηχές περιοχές όπου λαμβάνει χώρα σημαντική εξάτμιση υδάτων (κυρίως κατά τους θερινούς μήνες) με αποτέλεσμα την κρυστάλλωση των αλάτων στις όχθες και στον πυθμένα και τη δημιουργία αλυκών, αντιπροσωπευόμενη από τον σταθμό **M2** (“σταθμός αλυκής”).

γ) Η **υφάλμυρη** ζώνη, η οποία εντοπίζεται στην περιοχή της λιμνοθάλασσας που συνορεύει με απορροές γλυκών υδάτων και εμφανίζει χαμηλές αλατότητες, αντιπροσωπευόμενη από τον σταθμό **M1** (“υφάλμυρος σταθμός”).

Η επιλογή των σταθμών έγινε με βάση στοιχεία που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια προκαταρκτικής δειγματοληψίας, η οποία πραγματοποιήθηκε τον Νοέμβριο του 2014 καθώς και στοιχεία της βιβλιογραφίας (Δανιηλίδης 1991). Τα κριτήρια επιλογής των σταθμών, πλέον του πρηνούς αλατότητας, ήταν η εμφάνιση και η αφθονία των οργανισμών-στόχων (γέννη και είδη επιθυμητά προς απομόνωση) στους σταθμούς. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν κατά την περίοδο Μαρτίου 2015 - Ιανουαρίου 2016. Το σύνολο των δειγμάτων ήταν 48 (4 σταθμοί x 4 εποχές x 3 επαναλήψεις).

Αναφέρονται επίσης ήδη υπάρχοντα (μη δημοσιευμένα) στοιχεία που αφορούν στις λιμνοθάλασσες των δελταϊκών συστημάτων των ποταμών Καλαμά και Λούρου (Αλυκές, Βόντας, Καλάγκα, Βατάτσα, Ροδιά, Τσουκαλιό), ενώ τα στοιχεία που αφορούν στις αλυκές του Μεγάλου Εμβόλου παρουσιάζονται από τους Δολαφάκη (2008) και Dolapsakis et. al. (2005).



Εικόνα 11. Δειγματοληπτικοί σταθμοί στο λιμνοθαλάσσιο σύστημα Μεσολογίου / Αιτωλικού (Περίοδος 2015-2016).
(Εικόνες: © GoogleEarth, TerraMetrics 2020)

2.2. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΠΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι δειγματοληψίες σε όλους τους σταθμούς πραγματοποιήθηκαν κατά τις πρώτες πρωινές ώρες, μετά την ανατολή του ηλίου και πριν από το μεσημέρι. Οι ώρες αυτές είναι οι πλέον κατάλληλες όταν ο σκοπός της δειγματοληψίας είναι η απομόνωση, διότι το φυτοπλαγκτόν μεταναστεύει σε μεγαλύτερα βάθη κατά τη διάρκεια της νύχτας λόγω της χαμηλής φωτεινότητας, αλλά και κατά τις μεσημβρινές ώρες, όταν η φωτεινότητα είναι πολύ έντονη (Sommer & Gliwicz 1986, Harris 1986, Figueroa *et al.* 1998, Litchman & Kalusmeier 2001, Haupt 2011). Επιπλέον, κατά κανόνα, η κατανομή των πληθυσμών των μικροφυκών του φυτοπλαγκτού φαίνεται να είναι πιο ομοιόμορφη αυτές τις ώρες της ημέρας, λαμβάνοντας πάντα υπ' όψιν ότι οι κατανομές των πληθυσμών εξαρτώνται τόσο από την οικολογία και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του κάθε είδους όσο και από τις διεργασίες του τροφικού πλέγματος και ιδίως τη θήρευση από το ζωοπλαγκτόν (Raynolds 2006, Haupt 2011, Harris 2012).



Εικόνα 12. Υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τη δειγματοληψία.
Φωτογραφίες: Ι. Τζοβενής

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από βάθος 1m με δειγματολήπτη νερού τύπου Ruttner (Hydro Bios, Germany) χωρητικότητας 1L, όπου ήταν δυνατόν, ενώ όταν το βάθος δεν επέτρεπε τη χρήση δειγματολήπτη, τα δείγματα ελήφθησαν διά χειρός με τη χρήση πλαστικής φιάλης 1L (Nalgene, Thermo Fisher Scientific, USA) (Εικόνα 12). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε επί τόπου διήθηση των δειγμάτων με πλαγκτικό δίχτυ, διαμετρήματος οπών 25μm, προς απομάκρυνση του ζωοπλαγκτού ώστε να αποφευχθεί η θήρευση στο ζωντανό δείγμα. Κάθε δείγμα διαχωρίστηκε σε δύο

τμήματα: το ένα τμήμα μονιμοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος Lugol's Iodine (I_3K σε CH_3COOH) ώστε να χρησιμοποιηθεί για την ποιοτική και ποσοτική καταγραφή του στιγμιοτύπου βιοκοινότητας (μονιμοποιημένο δείγμα), ενώ το δεύτερο τμήμα (ζωντανό δείγμα) μεταφέρθηκε στο εργαστήριο σε ισοθερμικά δοχεία και μετά την προσθήκη θρεπτικών, καλλιεργήθηκε προς ανάπτυξη φυσικών ανθίσεων φυκών (natural algal blooms, NAB).

Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε επί τόπου (*in situ*) καταγραφή αβιοτικών παραμέτρων στους σταθμούς δειγματοληψίας. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν η θερμοκρασία $T^{\circ}C$ με θερμόμετρο, η συγκέντρωση $NaCl$ (αλατότητα ‰) με διαθλασίμετρο, και το pH με πεχάμετρο πεδίου.

2.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΕΙΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

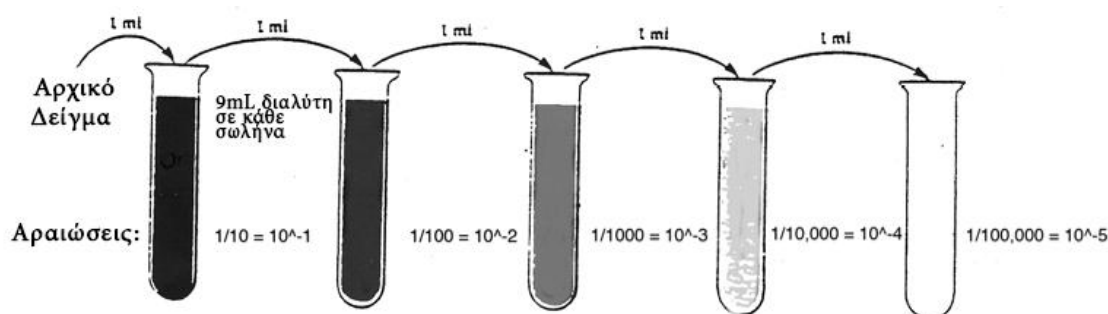
2.3.1 Ανάπτυξη Φυσικών Ανθίσεων Φυκών (NAB)

Τα ζωντανά δείγματα καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο με την προσθήκη θρεπτικού διαλύματος. Δεδομένου ότι δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση θρεπτικών στοιχείων στα πλαίσια της εργασίας αυτής, ο σταδιακός εγκλιματισμός των φυσικών πληθυσμών στο θρεπτικό μέσο έγινε με βάση βιβλιογραφικά στοιχεία (Δανιηλίδης 1991, Kormas *et al.* 2001, Sylaios & Theocharis 2002). Το θρεπτικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Walne's Medium (Walne 1970), σύμφωνα με τη συνταγή που είναι διαθέσιμη στην ιστοσελίδα της Συλλογής CCAP (Παράρτημα 1). Τα φυσικά δείγματα συντηρήθηκαν και επωάστηκαν σε συνθήκες που καθορίστηκαν βάσει των μετρήσεων πεδίου. Οι ανθίσεις (NAB), οι οποίες προέκυψαν από την επώαση των δειγμάτων, παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο Zeiss εξοπλισμένο με καταδυτικό φακό ($\times 1000$) ώστε να γίνει επιλογή των στελεχών προς απομόνωση, με κριτήρια την επιβίωση και την αφθονία (κυτταρική πυκνότητα) του πληθυσμού στο αρχικό δείγμα και στην καλλιέργεια, και φυσικά το αν αυτά ανήκουν στους επιθυμητούς προς απομόνωση οργανισμούς.

Για την απομόνωση των επιλεγμένων στελεχών χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις (4) διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης, οι οποίες παρατίθενται παρακάτω.

2.3.2. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

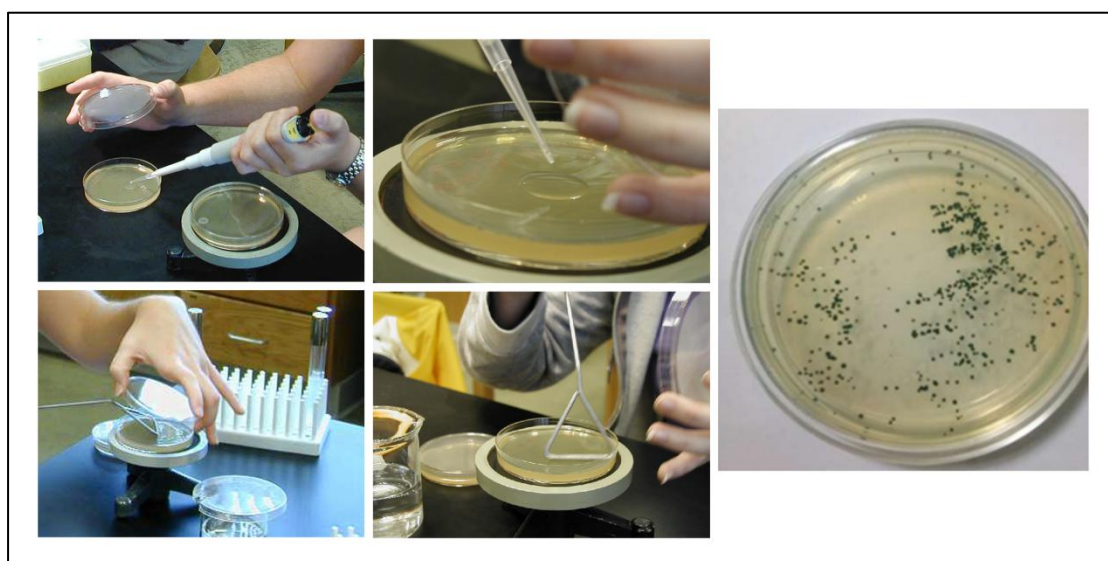
Χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις όπου ο πληθυσμός του επιλεγμένου στελέχους είναι ο επικρατέστερος στην καλλιέργεια (NAB): Για κάθε δείγμα χρησιμοποιείται μια σειρά 10 υάλινων δοκιμαστικών σωλήνων χωρητικότητας 20ml, οι οποίοι περιέχουν 10ml μέσου καλλιέργειας εμπλουτισμένου με διάλυμα Walne's medium. Οι σωλήνες με το μέσον καλλιέργειας αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο και στη συνέχεια απαριθμούνται (1-10). Πραγματοποιείται εμβολιασμός 1ml από την αρχική καλλιέργεια (NAB) στον σωλήνα 1 και έπεται ανάδευση, στη συνέχεια δε από τον σωλήνα 1 γίνεται εμβολιασμός 1 ml στον σωλήνα 2 κ.ο.κ. Στον σωλήνα 10 αρχικά τοποθετούνται 9 ml καλλιέργειας ώστε ο τελικός όγκος να είναι 10 ml σε όλους τους σωλήνες (Εικόνα 13). Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται στον θάλαμο καλλιέργειών της Τράπεζας AthU-AL (βλ. Κεφάλαιο 2.4.4) για περίπου 1 μήνα και κατόπιν, πραγματοποιείται μικροσκοπική παρατήρηση για να ελεγχθεί η καθαρότητα των καλλιέργειών σε κάθε σωλήνα και να επιλεγούν εκείνοι από τους οποίους πιθανώς θα προκύψει η καθαρή μονοκαλλιέργεια του στελέχους. Στην περίπτωση όπου σε κάποιον από τους δοκιμαστικούς σωλήνες παρατηρηθεί παρουσία μόνο του οργανισμού-στόχου, τότε από την καλλιέργεια αυτή γίνεται εμβολιασμός 1 ml σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα με θρεπτικό υλικό και επαναλαμβάνεται η επώαση και ο μικροσκοπικός έλεγχος τουλάχιστον ακόμη 3 φορές ώστε να διασφαλιστεί η καθαρότητα της τελικής μονοστελεχικής καλλιέργειας. Στην περίπτωση όπου από τη διαδικασία αυτή δεν προκύψει μονοστελεχική καλλιέργεια, τότε πραγματοποιείται περαιτέρω καθαρισμός με τη μέθοδο της μικροπιπέτας (βλ. παρακάτω).



Εικόνα 13. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων. Κάθε δείγμα περιέχει κυτταρική συγκέντρωση $\times 10^{-1}$ σε σχέση με το αμέσως προηγούμενο δείγμα. (Τροποποιημένο από Brady 2008, Πανεπιστήμιο του Wisconsin, ΗΠΑ)

2.3.3. Μέθοδος επίστρωσης σε άγαρ

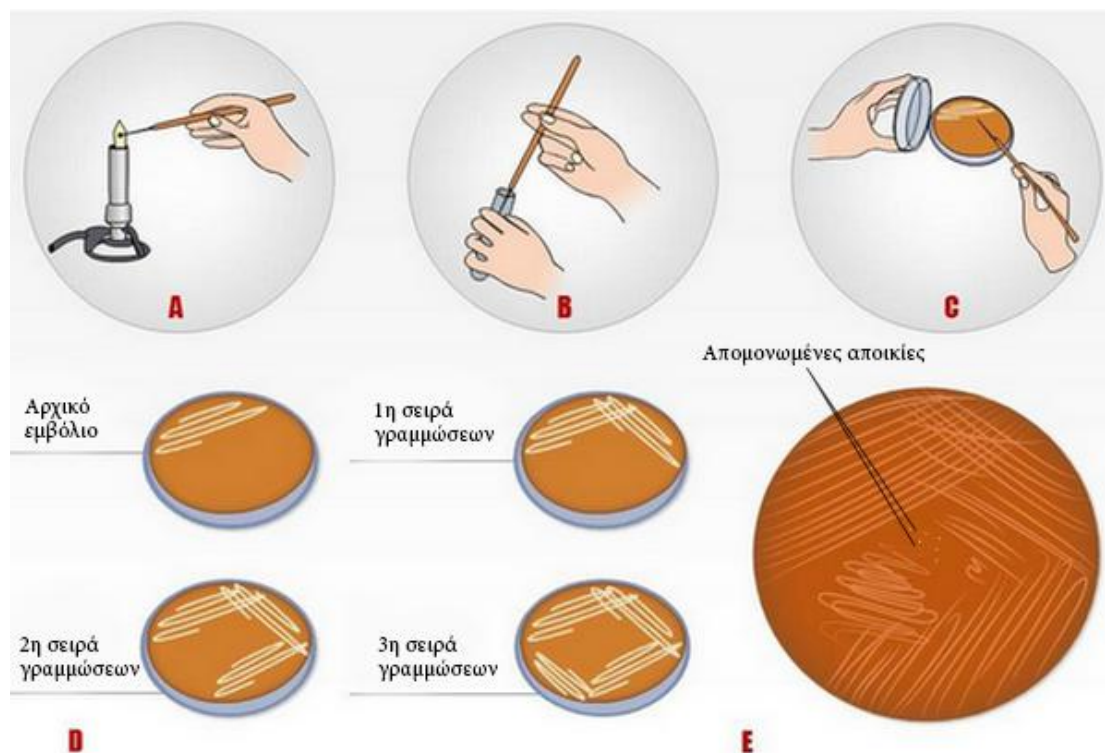
Χρησιμοποιείται για οργανισμούς οι οποίοι αναπτύσσονται επάνω σε άγαρ: Αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσον καλλιέργειας με την προσθήκη άγαρ προς τελική συγκέντρωση 0,9%, τοποθετείται σε πλαστικά τρυβλία υπό ασηπτικές συνθήκες (η συγκέντρωση αυτή επελέγη ώστε το άγαρ να είναι αρκετά υδαρές και να επιτρέπει την ανάπτυξη των υδρόβιων οργανισμών). Αφού το άγαρ στερεοποιηθεί, πραγματοποιείται επίστρωση μικρής ποσότητας (συνήθως 1mL) της αρχικής καλλιέργειας (NAB), που απλώνεται ομοιόμορφα στην επιφάνεια του τρυβλίου με τη χρήση αποστειρωμένης καμπτόμενης υάλινης ράβδου (plating), υπό στείρες συνθήκες (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Τεχνική επίστρωσης σε άγαρ με τη μέθοδο του plating.
(Τροποποιημένο από Frankhauser 1983)

Στη συνέχεια, τα τρυβλία επωάζονται σε θάλαμο καλλιέργειών (Τράπεζα AthU-AI) για κατάλληλο κατά περίπτωση χρονικό διάστημα έως ότου αναπτυχθούν αποικίες στην επιφάνεια του τρυβλίου. Τα τρυβλία παρατηρούνται σε στερεοσκόπιο ώστε να επιλεγούν οι καλλιέργειες των στελεχών που ανήκουν στους οργανισμούς-στόχους. Στη συνέχεια, με τη μέθοδο των διαδοχικών γραμμώσεων (streaking) (Εικόνα 15) και με τη χρήση κρίκου ενοφθαλμισμού (loop) κατάλληλης κατά περίπτωση διαμέτρου, η επιλεγμένη αποικία επιστρώνεται στην επιφάνεια νέου τρυβλίου υπό στείρες συνθήκες. Τα επιστρωμένα τρυβλία επωάζονται στις ίδιες συνθήκες όπως προηγουμένως έως ότου εμφανιστούν απομονωμένες αποικίες αρκετά πυκνές ώστε να μεταφερθούν σε υγρό θρεπτικό μέσο. Η απομόνωση με επίστρωση σε άγαρ προϋποθέτει ότι είναι δυνατή η μακροσκοπική αναγνώριση των αποικιών των στελεχών-στόχων. Οι επιλεγόμενες προς απομόνωση αποικίες μεταφέρονται

προσεκτικά με αποστειρωμένη βελόνα ή κρίκο ενοφθαλμισμού σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 10 ml αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού υλικού, ο οποίος και επωάζεται στον θάλαμο καλλιέργειών. Η επιβίωση των κυττάρων και η καθαρότητα των καλλιέργειών εκτιμάται με μικροσκοπική παρατήρηση και, αν κρίνεται σκόπιμο, πραγματοποιείται περαιτέρω καθαρισμός των προκυττωσών καλλιέργειών με τη μέθοδο της μικροπιπέτας.



Εικόνα 15. Τεχνική επίστρωσης σε άγαρ με τη μέθοδο των διαδοχικών γραμμώσεων (streaking).
(Τροποποιημένο από slideteam.net)

2.4.4. Μέθοδος απομόνωσης με αυξημένη αλατότητα

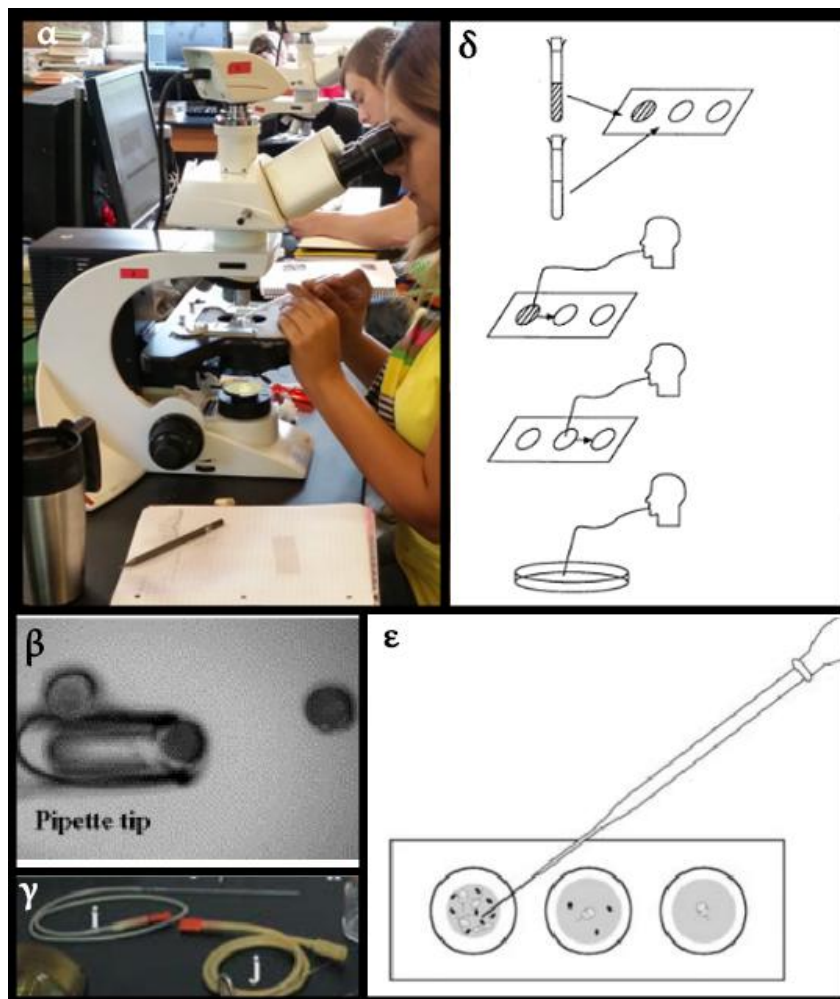
Για την απομόνωση στελεχών από υπεράλμυρα περιβάλλοντα (όπως οι αλυκές) χρησιμοποιείται η μέθοδος καλλιέργειας ποσότητας του δείγματος σε θρεπτικό μέσο υψηλής αλατότητας ώστε να απομονωθούν οι οργανισμοί που επιβιώνουν σε υψηλές αλατότητες. Οι οργανισμοί αυτοί είναι κυρίως ευρύαλοι, όπως το είδος *Dunaliella salina*, το οποίο μπορεί να επιβιώνει σε ένα εύρος αλατότητας από 40‰ έως και >300‰ κατά περίπτωση (Borowitzka & Siva 2007). Με τον τρόπο αυτόν αποφεύγονται επιμολύνσεις από άλλα φύκη αλλά και άλλους οργανισμούς (όπως οι μύκητες), οι οποίοι δεν επιβιώνουν σε πολύ υψηλές αλατότητες. Για τη διαδικασία αυτή, προετοιμάζονται υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες (όπως στην περίπτωση των

διαδοχικών αραιώσεων, βλ. παραπάνω) που περιέχουν θρεπτικό διάλυμα διαφόρων συγκεντρώσεων NaCl. Στη συνέχεια 1ml από το αρχικό δείγμα εμβολιάζεται σε κάθε έναν από τους σωλήνες και γίνεται επώαση σε συνθήκες καλλιέργειας για περίπου 2-3 εβδομάδες. Το εύρος των χρησιμοποιούμενων συγκεντρώσεων εξαρτάται κάθε φορά από το είδος προς απομόνωση αλλά και τις *in situ* μετρήσεις αλατότητας κατά τη δειγματοληψία. Στην εν λόγω εργασία, για την απομόνωση των στελεχών του είδους *D. salina* από δείγματα των αλυκών Μεσολογίου, χρησιμοποιήθηκαν αλατότητες από 60‰ έως 140‰. Οι καθαρότερες καλλιέργειες που προέκυψαν από τη διαδικασία προήλθαν από τις συγκεντρώσεις 120‰ και 140‰. Στη συνέχεια, τα στελέχη εγκλιματίστηκαν εκ νέου σε αλατότητα 60‰ (αλατότητα συντήρησης στην τράπεζα στελεχών), με σταδιακή ανακαλλιέργεια σε διαδοχικά χαμηλότερες τιμές (με συνεχή μικροσκοπικό έλεγχο της υγείας των κυττάρων) και υπεβλήθησαν επιπλέον στη διαδικασία τριχοειδούς απομόνωσης ώστε να διασφαλιστεί η καθαρότητα των μονοκαλλιεργειών για τα προκύπτοντα στελέχη.

2.4.5. Μέθοδος τριχοειδούς απομόνωσης με μικροπιπέτα

Για τα στελέχη που εμφανίζουν μικρές πυκνότητες στην αρχική καλλιέργεια και δεν αναπτύσσονται επάνω στο άγαρ ή όταν οι καλλιέργειες που προκύπτουν από τις τρεις ανωτέρω διαδικασίες δεν είναι αρκετά καθαρές, χρησιμοποιείται η τεχνική της τριχοειδούς αναρρόφησης μεμονωμένων κυττάρων με μικροπιπέτα μικροσκοπικής διατομής (Phang & Chu 1999, Δολαψάκης 2008) (Εικόνα 16). Για την τεχνική αυτή, προετοιμάζονται αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες με θρεπτικό υλικό, όπως έχει περιγραφεί στην τεχνική των διαδοχικών αραιώσεων. Επίσης, κατασκευάζονται λεπτά τριχοειδή υάλινα αγγεία (μικροπιπέτες) με τη χρήση πιπετών τύπου Pasteur και λύχνου Bunsen, τα οποία επίσης αποστειρώνονται. Για να γίνουν οι απομονώσεις, μία σταγόνα από την αρχική καλλιέργεια (NAB) τοποθετείται προσεκτικά με πιπέτα Pasteur σε καθαρή αντικειμενοφόρο και παρατηρείται με μικροσκόπιο σε μεγέθυνση x100 ή x200 ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία κυττάρων από τους επιλεγμένους οργανισμούς στα δείγματα (Εικόνα 16α). Στις περιπτώσεις όπου τα δείγματα είναι πολύ πυκνά κρίνεται απαραίτητο οι σταγόνες να αραιωθούν με αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό. Οπότε, στην ίδια αντικειμενοφόρο προστίθενται προσεκτικά, σε διπλανές θέσεις, και μερικές σταγόνες αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια της μικροπιπέτας (στο άκρο της οποίας έχουμε εφαρμόσει λεπτό ελαστικό σωλήνα για αναρρόφηση διά στόματος, Εικόνα 16γ) και με πολλή προσοχή, αφαιρούνται τριχοειδώς 1-5 κύτταρα και τοποθετούνται στη διπλανή

σταγόνα θρεπτικού υλικού (στην ίδια αντικειμενοφόρο). Αμέσως μετά μεμονωμένα κύτταρα μεταφέρονται διαδοχικά σε 5-6 νέες σταγόνες θρεπτικού (σε διαφορετικές αντικειμενοφόρους ή σε microplates) ώστε να εκπλυθούν κατά το δυνατόν επιμολύνσεις (μύκητες, βακτήρια, άλλα φύκη) (Εικόνα 16 δ-ε). Τελικά ένα μεμονωμένο κύτταρο τοποθετείται σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα ώστε από αυτό να προκύψει μία μονοκαλλιέργεια (κλώνος).



Εικόνα 16. Απομόνωση κυττάρων με τη μέθοδο της τριχοειδούς αναρρόφησης. α) Μικροσκοπική παρατήρηση και μικροχειρισμός (Sylvia Lee, *Diatoms of North America* 2016), β) Μικροσκοπική εικόνα αναρρόφησης μεμονωμένου κυττάρου, γ) σωληνάκι αναρρόφησης διά στόματος, δ-ε) διαδικασία διαδοχικής αναρρόφησης και πλύσης σε σταγόνες αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος επί αντικειμενοφόρων πλακών. (Τροποποιημένο από seaweedinfo.blogspot.com 2015)

Για να θεωρηθεί επιτυχημένη η διαδικασία απομόνωσης θα πρέπει να προκύψουν τουλάχιστον 10 τέτοιες μονοκαλλιέργειες μεμονωμένων κυττάρων για κάθε οργανισμό-στόχο, δηλαδή θα πρέπει να απομονωθούν τουλάχιστον 10 ξεχωριστά κύτταρα από κάθε πληθυσμό. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι σε καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας γίνεται προσεκτική παρατήρηση των κυττάρων πριν από κάθε βήμα

ούτως ώστε να ελέγχεται η απόκριση των κυττάρων στο θρεπτικό υλικό. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η απομόνωση κυττάρων που έχουν υποστεί καταπόνηση (π.χ. απώλεια μαστιγίων, συρρίκνωση ή λύση των κυττάρων κλπ) και έχουν χαμηλές πιθανότητες επιβίωσης. Οι απομονώσεις και παρατηρήσεις γίνονται σε μεγέθυνση έως και x200, ώστε να υπάρχει επαρκής χώρος μεταξύ του υλικού και του μικροσκοπικού φακού για την είσοδο του τριχοειδούς αγγείου. Κάθε απομόνωση και μεταφορά κυττάρου πραγματοποιείται με τη χρήση νέας, αποστειρωμένης πιπέτας ώστε να διασφαλίζεται η καθαρότητα της διαδικασίας. Στη συνέχεια οι προκύπτουσες μονοκαλλιέργειες τοποθετούνται στον θάλαμο καλλιέργειών προς επώαση, και η εξέλιξη αυτών (επιβίωση και αύξηση κυττάρων) παρακολουθείται για διάστημα περίπου ενός μηνός. Για τις πλέον επιτυχείς μονοκαλλιέργειες, επαναλαμβάνεται η διαδικασία της απομόνωσης ώστε να επιβεβαιωθεί και να διασφαλιστεί η καθαρότητα των μονοστελεχικών καλλιέργειών.

Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία απομόνωσης, οι καθαρές καλλιέργειες αναβαθμίζονται σε τελικό όγκο 50ml με την προσθήκη θρεπτικού υλικού και κατατίθενται στην Τράπεζα AthU-AI όπου και συντηρούνται. Οι καλλιέργειες που προκύπτουν από τη διαδικασία αυτή είναι μονοκαλλιέργειες, δηλαδή αποτελούνται από κύτταρα ενός μόνο στελέχους φυκών, αλλά δεν είναι αξενικές (δηλαδή ελεύθερες άλλων οργανισμών και συγκεκριμένα βακτηρίων). Η απομάκρυνση των βακτηρίων δεν κρίνεται σκόπιμη αλλά η παρουσία τους είναι μάλλον απαραίτητη αφού αποτελούν μια φυσική συνάθροιση (consortium), προερχόμενη από το φυσικό δείγμα, η οποία επιτρέπει τη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων του φύκου (conditioning).

2.4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

2.4.1. Μελετηθέντα Στελέχη της Τράπεζας AthU-AI

Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν στελέχη ήδη απομονωμένα και κατατεθειμένα στην Τράπεζα AthU-AI, καθώς και στελέχη τα οποία απομονώθηκαν και κατατέθηκαν στην Τράπεζα κατά την εκπόνηση της διατριβής. Συγκεκριμένα τα ήδη κατατεθειμένα στελέχη που μελετήθηκαν είναι τα: **Tetraselmis** AthU-AI R 9-2, R 9-3 (προέλευση: λιμνοθάλασσα Ροδιάς), Ath-U-AI V 2-2 (λιμνοθάλασσα Βατάτσας), AthU-AI Mes 5 και Mes 17 (λιμνοθάλασσα Μεσολογγίου) και **Dunaliella salina** AthU-AI Dun 2-8, AthU-AI Dun 21-32 (λιμνοθάλασσα Μεγάλου Εμβόλου), AthU-AI Dun 39 (Αλυκές Σάμου). Ο πλήρης κατάλογος των εν λόγω στελεχών παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Τα

μελετηθέντα στελέχη που απομονώθηκαν στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής είναι τα *Dunaliella* sp. AthU-AI Dun 37-38 και *Dunaliella salina* AthU-AI Dun 35-36 (λιμνοθάλασσα Μεσολογγίου) (βλ. Κεφάλαιο 3.3).

Πίνακας 1. Στελέχη κατατεθειμένα στην Τράπεζα AthU-AI, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη διατριβή.

Κωδικός στελέχους	Προέλευση	Γένος	Ενδιαίτημα
AthU-AI R 9-2	Ροδιά, Δ. Ελλάδα (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Tetraselmis</i>	Μεταβατικό, θαλάσσιο (40‰)
AthU-AI R 9-3	Ροδιά, Δ. Ελλάδα (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Tetraselmis</i>	Μεταβατικό, θαλάσσιο (40‰)
AthU-AI V 2-2	Βατάσα, Δ. Ελλάδα (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Tetraselmis</i>	Μεταβατικό, θαλάσσιο (40‰)
AthU-AI Mes 5	Μεσολόγγι, Δ. Ελλάδα (legit I. Tzovenis, 2007)	<i>Tetraselmis</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Mes 17	Μεσολόγγι, Δ. Ελλάδα (legit I. Tzovenis, 2007)	<i>Tetraselmis</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 2	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 3	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 4	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 5	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 6	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 7	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 8	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 21	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 22	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 23	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 24	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)

Πίνακας 1. Συνέχεια

Κωδικός στελέχους	Προέλευση	Γένος	Ενδιαίτημα
AthU-AI Dun 25	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 26	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 27	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 28	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 29	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 30	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 31	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 32	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 34	Μεγάλο Έμβολο, Μακεδονία (legit N. Dolapsakis, 2006)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 35	Μεσολόγγι, Δ. Ελλάδα (legit X. Chantzistroutsiou 2016)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 36	Μεσολόγγι, Δ. Ελλάδα (legit X. Chantzistroutsiou 2016)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 37	Μεσολόγγι, Δ. Ελλάδα (legit X. Chantzistroutsiou 2016)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 38	Μεσολόγγι, Δ. Ελλάδα (legit X. Chantzistroutsiou 2016)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 39	Σάμος, Β. Αιγαίο (legit P. Karlovasiti 2015)	<i>Dunaliella</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)

2.4.2. Παρασκευή μέσω καλλιέργειας

Τα στελέχη καλλιεργούνται και συντηρούνται σε τεχνητό θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με κατάλληλο θρεπτικό διάλυμα. Για την παρασκευή του τεχνητού θαλασσινού νερού χρησιμοποιείται καθαρό απιονισμένου νερό, προερχόμενο από επιτοίχια στήλη ιοντο-ανταλλακτικών ρητινών. Στο νερό αυτό προστίθεται μίγμα αλάτων Tropic Marine PRO-REEF (Tropic Marine, Switzerland) και Aquaforest Sea

Salt (Aquaforest, Poland) για να επιτευχθεί η κατάλληλη αλατότητα για την εκάστοτε καλλιέργεια. Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα πυκνού θρεπτικού διαλύματος Walne (Παράρτημα 1) και το μέσον καλλιέργειας αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο (θερμοκρασία 121°C, πίεση 1,3 atm). Το πυκνό διάλυμα Walne (stock) παρασκευάζεται ούτως ώστε η επιθυμητή τελική συγκέντρωση θρεπτικών αλάτων στο μέσον καλλιέργειας να επιτυγχάνεται με την προσθήκη 1mL από το διάλυμα αυτό σε 1L τεχνητού θαλασσινού νερού. Το πυκνό αυτό διάλυμα αποστειρώνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα (συνήθως σε μηνιαία βάση). Με τον ίδιο τρόπο παρασκευάζεται και το διάλυμα που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία απομόνωσης των στελεχών. Όταν το μέσον καλλιέργειας δεν χρησιμοποιείται, φυλάσσεται εντός ψυγείου μετά την αποστείρωση. Σε περίπτωση όπου το διάλυμα παραμείνει αχρησιμοποίητο για διάστημα πλέον των 5 ημερών, απαιτείται εκ νέου αποστείρωση.

Επιπλέον του θρεπτικού διαλύματος Walne παρασκευάζεται και το αντίστοιχο πυκνό διάλυμα (stock) των κατά περίπτωση απαραίτητων βιταμινών. Η συνταγή του διαλύματος βιταμινών φαίνεται επίσης στο Παράρτημα 1. Σε αντίθεση με το πυκνό διάλυμα Walne, το οποίο αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο πριν τη χρήση του, το διάλυμα βιταμινών δεν αποστειρώνεται με αυτόν τον τρόπο, αφού η έκθεση των ουσιών αυτών σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης διαταράσσει τη λειτουργικότητά τους. Ωστόσο, η καθαρότητα του διαλύματος εξασφαλίζεται με τη χρήση αποστειρωμένου απιονισμένου νερού υψηλής καθαρότητας για την παρασκευή του, τη χρήση φίλτρων αποστείρωσης (Millipore, 0,22μm) αμέσως μετά την παρασκευή του (η διαδικασία της διήθησης πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής υπό στείρες συνθήκες), και τη φύλαξή του σε συνθήκες κατάψυξης (-18°C). Το διάλυμα βιταμινών παρασκευάζεται ούτως ώστε η τελική συγκέντρωση στο μέσον καλλιέργειας να επιτυγχάνεται με την προσθήκη 0,1mL αυτού, ανά 1L εμπλουτισμένου τεχνητού θαλασσινού νερού, κατά τη διαδικασία του εμβολιασμού.

2.4.3. Ανακαλλιέργεια στελεχών

Οι μονοκαλλιέργειες που προκύπτουν από τη διαδικασία της απομόνωσης, αποτελούν ζωντανούς και αυξανόμενους πληθυσμούς, και συνεπώς η συντήρηση αυτών απαιτεί τακτική ανακαλλιέργεια (Εικόνα 17) ώστε το υλικό να διατηρείται σε καλή κατάσταση και διαθέσιμο προς μελέτη. Τα στελέχη συντηρούνται σε υγρές, στατικές (μη αεριζόμενες) καλλιέργειες μικρής κλίμακας (50mL) σε υάλινες κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 100mL, με τουλάχιστον 3 επαναλήψεις ανά πληθυσμό.



Εικόνα 17. Διαδικασία ανακαλλιέργειας στελεχών της Τράπεζας AthU-AI. α) θάλαμος νηματικής ροής (LFC), β) προσθήκη διαλύματος βιταμινών στο θρεπτικό διάλυμα, β) ανανέωση των καλλιεργειών σε στείρες συνθήκες, δ) επανατοποθέτηση καλλιεργειών στον θάλαμο συντήρησης (Εγκαταστάσεις Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ)
Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούντσιου, Ι. Τζοβενής

Οι κωνικές φιάλες προετοιμάζονται με τον ίδιο τρόπο όπως και οι δοκιμαστικοί σωλήνες κατά τη διαδικασία των απομονώσεων (βλ. Κεφάλαιο 2.3.2): σε καθαρές φιάλες προστίθεται το κατάλληλο (ανά περίπτωση) εμπλουτισμένο με θρεπτικό διάλυμα μέσον καλλιέργειας, και οι φιάλες πωματίζονται με υδρόφιλο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο ώστε να τοποθετηθούν στο αυτόκαυστο προς αποστείρωση. Είναι σημαντικό πριν από την αποστείρωση να αναγράφεται το είδος του θρεπτικού διαλύματος που περιέχεται σε κάθε φιάλη (με μολύβι στη λευκή ετικέτα της φιάλης) ώστε να αποφεύγονται τυχόν λάθη κατά τον εμβολιασμό. Μετά την αποστείρωση, οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται στον πάγκο εργασίας και αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου.

Η διαδικασία του εμβολιασμού πραγματοποιείται υπό στείρες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής (Laminar Flow Cabinet, Εικόνα 17α). Ο θάλαμος ενεργοποιείται 10-15 λεπτά νωρίτερα ώστε να αποστειρωθεί κατά το δυνατόν ο αέρας του δωματίου. Η επιφάνεια εργασίας αποστειρώνεται με οινόπνευμα συγκέντρωσης 70%. Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται στον πάγκο και σε κάθε μία αναγράφεται ο κωδικός του στελέχους που θα εμβολιαστεί καθώς και η ημερομηνία. Στη συνέχεια προστίθεται θρεπτικό διάλυμα βιταμινών με τη χρήση λύχνου Bunsen και αποστειρωμένης πλαστικής πιπέτας μίας χρήσεως (Εικόνα 17β).

Αφού προστεθούν βιταμίνες σε όλες τις φιάλες, το διάλυμα είναι έτοιμο για τον εμβολιασμό. Κατά τη διαδικασία αυτή, μικρή ποσότητα της αρχικής αποθεματικής καλλιέργειας (stock) μεταφέρεται είτε με αποστειρωμένη πιπέτα μίας χρήσεως είτε με προσεκτική απόχυση (decanting) στη νέα κωνική που περιέχει το αποστειρωμένο θρεπτικό μέσον.

Είναι σημαντικό καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην καθαριότητα των χρησιμοποιούμενων υλικών και στη διατήρηση των στείρων συνθηκών προς αποφυγή οποιουδήποτε είδους επιμολύνσεων. Ως εκ τούτου, το στόμιο της φιάλης αποστειρώνεται στη φλόγα του λύχνου για λίγα δευτερόλεπτα τόσο αφού αφαιρεθεί το πώμα όσο και πριν τοποθετηθεί εκ νέου (Εικόνα 17γ). Επίσης, δεδομένου ότι απαιτείται λεπτός χειρισμός και καλός έλεγχος των υλικών, η χρήση γαντιών αντικαθίσταται με τη συχνή αποστείρωση των χεριών του παρασκευαστή με οινόπνευμα. Επίσης είναι σημαντικό ο πάγκος εργασίας αλλά και τα χέρια του παρασκευαστή να αποστειρώνονται αμέσως σε περίπτωση τυχαίας διαφυγής οποιουδήποτε υγρού και κυρίως από ζωντανή καλλιέργεια.

Μετά την ολοκλήρωση του εμβολιασμού για όλα τα στελέχη, οι καλλιέργειες τοποθετούνται στον θάλαμο καλλιέργειών της τράπεζας AthU-AI (Εικόνα 17δ) όπου φυλάσσονται για περίπου 3-4 εβδομάδες (αναλόγως των αναγκών του κάθε στελέχους) μέχρι την επόμενη διαδικασία ανακαλλιέργειας, και αναδεύονται τακτικά.

2.4.4. Συντήρηση μονοστελεχικών καλλιέργειών

Οι καλλιέργειες συντηρούνται σε κλειστό κλιματιζόμενο θάλαμο καλλιέργειών σταθερών συνθηκών (Εικόνα 18), ο οποίος στεγάζεται στον Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ, και αποτελούν την πιστοποιημένη Τράπεζα Στελεχών Μικροφυκών AthU-AI (υπεύθυνη λειτουργίας: Α. Οικονόμου-Αμίλλη, ομότιμη Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ). Οι συνθήκες στον θάλαμο έχουν ως εξής:

- Θερμοκρασία: 21 - 23 °C
- Σχετική υγρασία αέρος: ~35%
- Ένταση φωτισμού: 25 - 42 $\mu\text{moles photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (λαμπτήρες φθορισμού Gro Lux)
- Φωτοπερίοδος: 12:12 ώρες (φως: σκοτάδι)



Εικόνα 18. Θάλαμος καλλιέργειών της Τράπεζας AthU-AI (Τομέας Οικολογίας και Ταξινομικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ).
Φωτογραφία: Α. Ντζουβάρας

Σημειώνεται ότι η χρήση των συγκεκριμένων λαμπτήρων ευνοεί τη φωτοσύνθεση των φυκών εξ αιτίας της εκπομπής φωτεινής ακτινοβολίας στο φάσμα των 400-650 nm. Η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή μέσω συνεχούς κλιματισμού του δωματίου. Η σχετική υγρασία και η ένταση του φωτισμού μετρήθηκαν με τη χρήση οργάνου LI-COR LI-1400 (LI-COR Inc. ΗΠΑ).

2.5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΛΑΣΙΚΗΣ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ

2.5.1. Φωτονική Μικροσκοπία

Οι μορφολογικές παρατηρήσεις ζωντανών και μονιμοποιημένων κυττάρων με σκοπό την ταυτοποίηση των οργανισμών, πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια μικροσκοπίου Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany), εξοπλισμένο με καταδυτικό φακό Planapo της Zeiss κατάλληλο για παρατηρήσεις σε μεγέθυνση x1000 καθώς και με ψηφιακό σύστημα απεικόνισης (βιντεοκάμερα) HyperHAD CCD (Sony, Japan), συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή (Εικόνα 19α). Η φωτογράφιση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εξειδικευμένου λογισμικού ψηφιακής απεικόνισης Ulead Media Studio Pro 7.0. Επίσης κύτταρα των στελεχών φωτογραφήθηκαν και με τη χρήση μικροσκοπίου εξοπλισμένου με ψηφιακή

φωτογραφική μηχανή Altra 20 της Olympus (Olympus Europa, Germany), επίσης συνδεδεμένου με ηλεκτρονικό υπολογιστή (Εικόνα 19γ).



Εικόνα 19. Μικροσκόπια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρατήρηση και φωτογράφιση των κυττάρων. α,γ: Τομέας Οικολογίας και Ταξινομικής.
β: Τομέας Βοτανικής.
Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούντσιου

Κύτταρα όλων των στελεχών παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν ζωντανά, απ' ευθείας από τις καλλιέργειες αλλά και μετά από προσθήκη διαλύματος Lugol, το οποίο επιτυγχάνει στερέωση των κυττάρων και χρώση των κοκκίων αμύλου που εντοπίζονται στο εσωτερικό των χλωροπλάστων. Η χρώση με διάλυμα Lugol επιτρέπει την παρατήρηση της ύπαρξης, της θέσης, και του μεγέθους του χλωροπλάστη και του πυρηνοειδούς (το οποίο περιβάλλεται από κοκκία αμύλου και εμφανίζει μεγαλύτερη πυκνότητα μετά τη χρώση), γνώρισμα που αποτελεί διαγνωστικό ταξινομικό στοιχείο για πολλές ομάδες μικροφυκών, μεταξύ των οποίων και των Χλωροδενδροφυκών (π.χ. γένος *Tetraselmis*), ενώ επίσης διευκολύνει και τις μετρήσεις των διαστάσεων των κυττάρων (βιομετρία). Η φωτογράφιση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε μεγεθύνσεις x400 και x1000, λόγω του μικρού μεγέθους των φυκών.

Επιπλέον της συμβατικής φωτονικής μικροσκοπίας, τα στελέχη του γένους *Tetraselmis* παρατηρήθηκαν και με τη χρήση μικροσκοπίου AxioPlan της Zeiss (Εικόνα 19β) εξοπλισμένο με σύστημα αντίθεσης φάσεων μέσω διαφορικής παρεμβολής (differential interference contrast), ή σύστημα Nomarski και με πηγή

υπεριώδους ακτινοβολίας και φίλτρα επιφθορισμού (κυανό, πράσινο και ερυθρό). Η φωτογράφιση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της ψηφιακής κάμερας AxioCam MRc5, με την οποία ήταν επίσης εξοπλισμένο το μικροσκόπιο και με λογισμικό ψηφιακής απεικόνισης και επεξεργασίας Axiovision της Zeiss. Το σύστημα Nomarski επιτρέπει την “ανάγλυφη” απεικόνιση των κυττάρων και κατ’ επέκταση τη σαφέστερη παρατήρηση του εσωτερικού τους. Επιπροσθέτως, η ιδιότητα των χλωροπλαστών να αυτοφθορίζουν επιτρέπει, με τη χρήση της μικροσκοπίας επιφθορισμού, την καλύτερη παρατήρηση του σχήματος, το οποίο επίσης αποτελεί ταξινομικό γνώρισμα ορισμένων ομάδων μικροφυκών.

2.5.2. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης

Για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση των στελεχών του γένους *Tetraselmis* κρίθηκε απαραίτητη επίσης η παρατήρηση της λεπτής δομής του εσωτερικού των κυττάρων με τη χρήση Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης (ΗΜΔ). Η προετοιμασία των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των LuongVan & Hayward (2007) όπως περιγράφεται και από την Χαντζηστρούντσιου (2014). Συγκεκριμένα, καθαρές καλλιέργειες ηλικίας περίπου 5-7 ημερών, αναμείχθηκαν με αποστειρωμένο διάλυμα 3% αλγινικού νατρίου ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$) αναλυτικής καθαρότητας σε αναλογία 1:1, και στη συνέχεια ποσότητα από το προκύπτον διάλυμα προστέθηκε στάγδην σε αποστειρωμένο διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου 0,03M (CaCl_2). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα οι σταγόνες να μετατραπούν σε συμπαγή σφαιρίδια αλγινικού οξέος, διαμέτρου 2,5 - 3μm, τα οποία περιείχαν παγιδευμένα, ζωντανά κύτταρα. Τα σφαιρίδια καλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένο τεχνητό θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με διάλυμα Walne, στις ίδιες ακριβώς συνθήκες με τις αρχικές υγρές καλλιέργειες (στον θάλαμο καλλιέργειών της Τράπεζας AthU-AI), για περίπου μία εβδομάδα.

Εντός των σφαιριδίων, τα κύτταρα του γένους *Tetraselmis* αυξάνονται και αναπαράγονται κανονικά, αποβάλλοντας τα μαστίγια και δημιουργώντας παλμελλοειδείς (palmelloid) μορφές που στερούνται της ικανότητας κίνησης. Με την επώαση, η κυτταρική πυκνότητα αυξάνεται εντός των σφαιριδίων με αποτέλεσμα αυτά να αποκτούν μια πράσινη απόχρωση σε διάστημα μερικών ημερών (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Σφαιρίδια αλγινικού οξέος εντός των οποίων περιέχονται ζώντα κύτταρα *Tetraselmis*, μετά από επώαση σε θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με θρεπτικό διάλυμα.

Φωτογραφία: Ξ. Χαντζηστρούντσιου

Μετά το πέρας μίας εβδομάδας, τα σφαιρίδια απομακρύνθηκαν από το μέσον καλλιέργειας και μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 3% γλουταραλδεΐδης ($C_5H_8O_2$) και 1% ταννικού οξέος ($C_{76}H_{52}O_{46}$) σε ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού νατρίου (100 mM σε θαλασσινό νερό). Ακολούθησε αφυδάτωση σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης και στη συνέχεια έγκλειση σε ρητίνη Spurr (Spurr 1969), με τη χρήση διαδοχικά αυξανόμενων συγκεντρώσεων ρητίνης διαλυμένης σε προπυλενοξειδίο (CH_3CHCH_2O). Το πρωτόκολλο της έγκλεισης και μονιμοποίησης των σφαιριδίων παρουσιάζεται στην Εικόνα 21.

Μετά από την παραμονή των σφαιριδίων σε 100% ρητίνη για 48 ώρες στους 60 °C, τα τμήματα συμπυκνωμένης ρητίνης (blocks) χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία ημί-λεπτών (semi-thin) τομών σε μικροτόμο LKB (LKB Vertriebs GmbH, Austria) με υάλινο μαχαίρι (Εικόνα 22). Οι τομές υποβλήθηκαν σε χρώση με κυανούν της τολουιδίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα 1% βορικού νατρίου ($Na_2B_4O_7$) και παρατήρηση στο φωτονικό μικροσκόπιο ώστε να ελεγχθεί η ποιότητα της έγκλεισης και να καθοριστεί η θέση των κυττάρων στο εσωτερικό των σφαιριδίων. Στη συνέχεια, σύμφωνα με τις παρατηρήσεις, τα τμήματα της ρητίνης τοποθετήθηκαν αναλόγως στη μικροτόμο και χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία λεπτών τομών (ultrathin sections). Πραγματοποιήθηκε χρώση των τομών με οξικό ουρανύλιο [$UO_2(CH_3COO)_2$] και κιτρικό μόλυβδο ($C_{24}H_{20}Mo_3O_{28}$), και στη συνέχεια παρατήρηση και φωτογράφιση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης Philips 300 (Philips, Netherlands). Οι

ηλεκτρονικές φωτογραφίες ψηφιοποιήθηκαν με σαρωτή και λογισμικό Epson (Seiko Epson Corp., Japan), ώστε να ακολουθήσει η εξέταση των λεπτοφυών μορφολογικών γνωρισμάτων των κυττάρων.

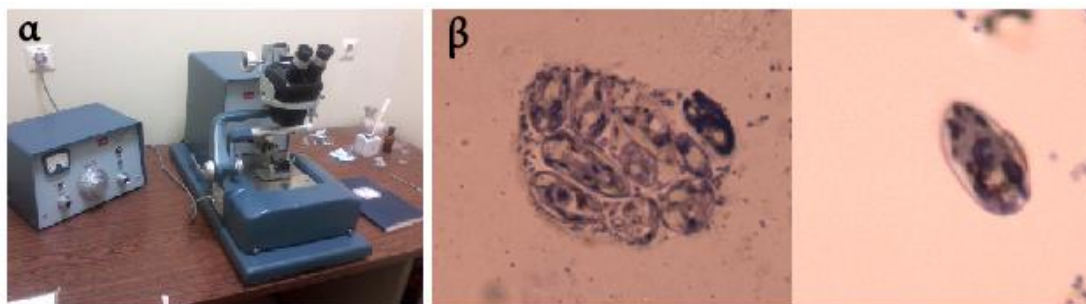
Fixation	3% glutaraldehyde + 1% tannic acid in 100mM Sodium Cacodylate buffer in sea water (1h)
	Wash 3 x 10 min 100 mM Sodium Cacodylate buffer
Post-fixation	1% (OsO ₄) in 100mM sodium Cacodylate buffer
	Wash 3 x 10 min 100 mM Sodium Cacodylate buffer
Dehydration	10% Ethanol 15 min 30% Ethanol 15 min 50% Ethanol 15 min 70% Ethanol 15 min 100% Ethanol 15 min 100% Ethanol 15 min
	100% Ethanol 15 min
Infiltration	2:1 Ethanol:Propylene oxide 15 min 1:1 Ethanol:Propylene oxide 15 min 1:2 Ethanol:Propylene oxide 15 min Propylene oxide 15 min Propylene oxide 15 min
	10% Spurr in Propylene oxide 1h 30% Spurr in Propylene oxide 1h 50% Spurr in Propylene oxide overnight 70% Spurr in Propylene oxide 1h 90% Spurr in Propylene oxide 1h 100% Spurr (shaker) 3h Embedding Polymerization 60°C 48h

Εικόνα 21. Πρωτόκολλο έγκλισης σφαιριδίων αλγινικού οξέος και κυττάρων σε ρητίνη.
(Π. Λιβανός, Ξ. Χαντζηστρούντσιου)

2.5.3. Μορφολογικές Κλείδες

Για την ταυτοποίηση όλων των στελεχών χρησιμοποιήθηκαν οι γενικευμένες μορφολογικές κλείδες μικροφυκών, οι οποίες περιλαμβάνονται στα βιβλία “Phycology” (Lee, 1989) και “Identifying Marine Phytoplankton” (Thomas, 1997), καθώς και εξειδικευμένες κλείδες για κάθε γένος. Συγκεκριμένα, για το γένος *Tetraselmis* χρησιμοποιήθηκαν οι κλείδες των Hori *et al.* (1982, 1983 & 1986), οι οποίες

αναφέρονται αποκλειστικά στα είδη του γένους και είναι οι πλέον ενδεδειγμένες μορφολογικές κλείδες που περιλαμβάνουν στοιχεία λεπτής δομής. Για το γένος *Dunaliella* χρησιμοποιήθηκε η κλείδα των Borowitzka & Siva (2007), η οποία εστιάζει συγκεκριμένα σε θαλάσσια και αλόφιλα είδη του γένους.



Εικόνα 22. α) Μικροτόμος LKB (Τομέας Βοτανικής), β) Ημι-λεπτές (semi-thin) τομές όπου φαίνεται η διατήρηση της μορφολογίας των μονιμοποιημένων κυττάρων εντός των σφαιριδίων.

(Φωτογραφίες: Π. Λιβανός, Ξ. Χαντζηστρούντσιου)

2.6. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.6.1. Μοριακοί δείκτες

Για τα στελέχη του γένους *Tetraselmis* πραγματοποιήθηκε επιπλέον ταυτοποίηση με τη χρήση μοριακών τεχνικών και συγκεκριμένα ανάγνωση και σύγκριση αλληλουχιών DNA. Οι χρησιμοποιηθέντες μοριακοί δείκτες ήταν το πλαστιδιακό γονίδιο *rbcL* και το ριβοσωμικό γονίδιο *18S rRNA*. Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες επελέγησαν με βάση τη βιβλιογραφία αλλά και τις διαθέσιμες προς σύγκριση αλληλουχίες στην GenBank (Chase *et al.* 1993, Soltis *et al.* 1998, Lee & Hur 2009, Arora *et al.* 2013).

Το γονίδιο *rbcL* εντοπίζεται στο γονιδίωμα του χλωροπλάστη όλων των ευκαρυωτικών φυτικών οργανισμών και κωδικοποιεί για τη μεγάλη υπομονάδα του φωτοσυνθετικού ενζύμου RuBisCO (καρβοξυλάση/οξυγενάση της διφωσφορικής ριβουλόζης). Το ένζυμο αυτό θεωρείται ένα από τα πλέον διαδεδομένα ένζυμα στη φύση (Cooper 2000) και, ως εκ τούτου, χρησίμευσε ως ένας από τους πρώτους γονιδιακούς τόπους σε γενετικές αναλύσεις, χρησιμοποιείται δε ακόμη εκτενώς έως και σήμερα σε φυλογενετικές μελέτες ανωτέρων φυτών (Qin *et al.* 1993, Gielly & Taberlet 1994, Manhart 1994, Soltis *et al.* 1998, Qiu *et al.* 2003, Bafeel *et al.* 2012, Hamed *et al.* 2018, Onefeli & Stanys 2019).

Το πυρηνικό γονίδιο 18S rRNA κωδικοποιεί για ένα τμήμα της μικρής υπομονάδος (small subunit, SSU RNA) των ευκαρυωτικών κυτταροπλασματικών ριβοσωμάτων. Το συγκεκριμένο γονίδιο χρησιμοποιείται εκτενώς σε μελέτες μοριακής φυλογένεσης εξ αιτίας όχι μόνο του μικρού του μεγέθους, αλλά και της ευρείας διάδοσής του σε συνδυασμό με τους χαμηλούς εξελικτικούς ρυθμούς που το χαρακτηρίζουν, με αποτέλεσμα να αποτελεί έναν αρκετά συντηρημένο γενετικό τόπο (Gutell *et al.* 1994, Friedl 1995, Van de Peer 1997, Booton *et al.* 1999, Smit *et al.* 2007). Επιπροσθέτως, το γονίδιο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν σε φυλογενετικές αναλύσεις του γένους *Tetraselmis* και συνεπώς υπάρχουν αλληλουχίες διαθέσιμες προς σύγκριση στη GenBank (Lee & Hur 2009).

2.6.2. Εξαγωγή Γενετικού Υλικού

Η εξαγωγή του γενετικού υλικού από τα κύτταρα έγινε με τη χρήση του πακέτου «Genomic DNA from Plant» της εταιρίας Macherey-Nagel, το οποίο βασίζεται στη μέθοδο CTAB (Doyle & Doyle 1987). Στη συνέχεια παρατίθενται τα βασικά στάδια του τροποποιημένου πρωτοκόλλου, το οποίο βασίστηκε σε εκείνο του κατασκευαστή (Macherey-Nagel, Germany):

1. **Ομογενοποίηση δείγματος:** Έγινε φυγοκέντρηση (φυγόκεντρος SORVAL) όγκου 250mL υγρής καλλιέργειας σε μετα-εκθετική (post-exponential) φάση, σε 17 °C και σε 6000 στροφές (rpm). Το υπερκείμενο απορρίφθηκε, και από το ίζημα (pellet) ένας όγκος περίπου 250μL τοποθετήθηκε σε σωλήνα 1,5mL Eppendorf και ομογενοποιήθηκε μηχανικά με τη χρήση ειδικής πλαστικής ράβδου («γουδοχέρι»).
2. **Λύση των κυττάρων με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος PL1:** Στο ομογενοποιημένο δείγμα έγινε προσθήκη 400μL ρυθμιστικού διαλύματος PL1 (του οποίου η αποτελεσματικότητα έχει ελεγχθεί για τα κύτταρα των χλωροφυκών) και μετά από καλή ανάδευση (Vortex) προσθήκη 10μL διαλύματος ενζύμου RNAase A. Το δείγμα αναδεύτηκε εκ νέου και επώαστηκε στους 65°C για 30'.
3. **Διήθηση του αδρού εκχυλίσματος:** Το εκχύλισμα τοποθετήθηκε στην ειδική στήλη Nucleospin® Filter (μωβ δακτύλιος) και φυγοκεντρήθηκε για 2' στα 11.000g, και στη συνέχεια το διαυγές διήθημα (flow-through) μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα Eppendorf του 1,5μL.
4. **Ρύθμιση των συνθηκών δέσμωσης του DNA:** Μετά την προσθήκη 450μL ρυθμιστικού διαλύματος PC, το διάλυμα αναδεύτηκε καλά με vortex ή πιπέτα.

5. **Δέσμευση του DNA:** 700mL από το προκύπτον διάλυμα μεταφέρθηκε στη στήλη NucleoSpin® Plant II Column (πράσινος δακτύλιος), φυγοκεντρήθηκε για 1' στα 11.000g και το διήθημα απομακρύνθηκε.
6. **Πλύση και ξήρανση της μεμβράνης πυριτίου:**
 - 1^η πλύση → Προσθήκη 400μL ρυθμιστικού διαλύματος PW1 στη στήλη, φυγοκέντρωση για 1' στα 11.000g και απόρριψη του διηθήματος.
 - 2^η πλύση → Προσθήκη 700μL ρυθμιστικού διαλύματος PW2 στη στήλη, φυγοκέντρωση για 1' στα 11.000g και απόρριψη του διηθήματος.
 - 3^η πλύση → Προσθήκη 200μL ρυθμιστικού διαλύματος PW2 στη στήλη, και φυγοκέντρωση για 1' στα 11.000g ώστε να καθαριστεί και να στεγνώσει πλήρως η μεμβράνη πυριτίου.
7. **Έκλυση του DNA:** Η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο αποστειρωμένο σωλήνα Eppendorf και μετά την προσθήκη 50μL ρυθμιστικού διαλύματος PE (το οποίο παρέμενε στους 65°C), έγινε επώαση για 20' στους 65°C. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 1' στα 11.000g ώστε να επιτευχθεί η έκλυση του DNA. Το στάδιο αυτό επαναλήφθηκε για μία ακόμη φορά με το ίδιο το διήθημα αντί νέας ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος.

Στη συνέχεια, 4μL από το προκύπτον διάλυμα DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης (2%) εμποτισμένο με χρωστική RedGel. Μετά από οριζόντια ηλεκτροφόρηση στα 80V για 1 περίπου ώρα, το πήκτωμα αγαρόζης εκτέθηκε σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας ώστε να ελεγχθεί η επιτυχής απομόνωση του DNA αλλά και η ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος.

2.6.3. Ενίσχυση της επιλεγμένης περιοχής

Η ενίσχυση της επιλεγμένης περιοχής με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) για τα επιλεγμένα τμήματα των γονιδίων *rbcL* και 18S πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εκκινητών (primers), οι οποίοι επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Για την ενίσχυση του γονιδίου *rbcL* χρησιμοποιήθηκαν: 1X ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης, 3mM MgCl₂, 0,25mM από κάθε δεσοξυριβονουκλεοτίδιο (dNTP's), 0,4μM από κάθε εκκινητή και 1U Taq DNA πολυμεράσης (Hyttest 7T1, Turku, Finland), σε τελικό όγκο αντίδρασης 25μL. Για την ενίσχυση του γονιδίου 18S rRNA, ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν ο ίδιος (25μL), ωστόσο η συγκέντρωση MgCl₂ μειώθηκε σε 1,5mM και έγινε προσθήκη 0,5mM από κάθε δεσοξυριβονουκλεοτίδιο και 1,5μM από κάθε εκκινητή. Οι αντιδράσεις ενίσχυσης βελτιστοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο. Η

PCR για την ενίσχυση του *rbcL* περιελάμβανε: ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης (denaturation) στους 94°C για 1 λεπτό, ακολουθούμενο από 25 κύκλους (ο καθένας από ένα βήμα στους 94°C για 45 δευτερόλεπτα, ένα βήμα στους 48°C για 1 λεπτό και ένα βήμα στους 72°C για 1,5 λεπτό), και ένα τελικό στάδιο επέκτασης (extension) των 10 λεπτών στους 72°C. Η PCR για την ενίσχυση του 18S rRNA περιελάμβανε: ένα στάδιο αρχικής αποδιάταξης στους 95°C για 1 λεπτό, ακολουθούμενο από 34 κύκλους (ο καθένας από ένα βήμα στους 94°C για 1 λεπτό, ένα βήμα στους 57°C για 1,5 λεπτό και ένα βήμα στους 72°C για 1,5 λεπτό), και ένα τελικό στάδιο επέκτασης των 10 λεπτών στους 72 °C.

Πίνακας 2. Κατάλογος χρησιμοποιηθέντων εκκινητών για την ενίσχυση των επιλεγμένων γονιδίων και την ανάγνωση των αλληλουχιών.

Γονίδια	Εκκινητές	Αλληλουχία 5' → 3'	Πηγή
rbcL	RH -1S ^F Ce1161R ^R	–ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT – –CAT GTG CAA TAC GTG AAT ACC –	Daugbjerg et al. 1994
18S	Euk328f ^F Euk329r ^R	– ACC TGG TTG ATC CTG CCA G – – TGA TCC TTC YGC AGG TTC AC –	Romari & Vaulot 2004

F: Forward (πρόσθιος εκκινητής)

R: Reverse (ανάστροφος εκκινητής)

Για να επιβεβαιωθεί η ενίσχυση των επιλεγμένων γονιδιακών τμημάτων και να γίνει η ποσοτικοποίηση του υλικού (ώστε να καθοριστεί η ποσότητα απομονωμένου DNA που πρέπει να προστεθεί στο τελικό μίγμα για τον προσδιορισμό των αλληλουχιών), το προϊόν της PCR παρατηρήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης (1%) με την προσθήκη χρωστικής βρωμιούχου αιθιδίου (C₂₁H₂₀BrN₃) μετά από οριζόντια ηλεκτροφόρηση, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.6.2. Τα πρωτόκολλα της PCR καθώς και τα προϊόντα των αντίστοιχων ηλεκτροφορήσεων παρατίθενται στο Παράρτημα 2.

2.6.4. Καθαρισμός του Προϊόντος της PCR

Ο καθαρισμός του τελικού προϊόντος που εστάλη για τον προσδιορισμό αλληλουχιών έγινε με τη μέθοδο εξαγωγής σε πήκτωμα αγαρόζης (gel purification) σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Αρχικά έγινε ηλεκτροφόρηση στα 80V, με όλο το προϊόν της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης (2%) εμποτισμένο με βρωμιούχο αιθίδιο.

2. Έγινε αποκοπή της ζώνης (band) του κατάλληλου τμήματος από το πήκτωμα, με ειδικό νυστέρι, σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, και κάθε δείγμα (ζώνη) μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα Eppendorf χωρητικότητας 1,5mL.
3. Έγινε προσθήκη 200μL ρυθμιστικού διαλύματος NTI για κάθε 100mg πηκτώματος αγαρόζης (συνολικά 400μL για κάθε δείγμα) και επώαση στους 50°C για 40', αναδεύοντας με vortex ανά 2'-3' μέχρι να διαλυθεί τελείως το πήκτωμα.
4. Δέσμευση του DNA: μετά την προσθήκη 700μL δείγματος στην ειδική στήλη NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στα 11.000g για 30" και απορρίφθηκε το διήθημα.
5. Πλύση της μεμβράνης πυριτίου: Μετά την προσθήκη 700μL ρυθμιστικού διαλύματος NT3 στη στήλη, έγινε φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30" και απορρίφθηκε το διήθημα.
6. Ξήρανση της μεμβράνης πυριτίου: Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 11.000g για 1' για την απομάκρυνση τυχόν καταλοίπων ρυθμιστικού διαλύματος και κυρίως της αιθανόλης.



Εικόνα 23. Το εργαστήριο Μοριακής Οικολογίας του Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής.
(Φωτογραφία. Ξ. Χαντζηστρούντσιου)

Έκλουση DNA: Μετά την προσθήκη 30μL ρυθμιστικού διαλύματος NE στη στήλη, τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1' και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα 11.000g για 1'. Το τελικό DNA για τον προσδιορισμό των αλληλουχιών ελήφθη από το προκύπτον διήθημα. Όλες οι μοριακές αναλύσεις

πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μοριακής Οικολογίας του Τομέα Οικολογίας και Ταξινόμικης του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ (Εικόνα 23).

2.6.5. Προσδιορισμός και Στοίχιση των Αλληλουχιών

Ο προσδιορισμός των αλληλουχιών των τελικών προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε σε αυτόματο μηχάνημα (automated sequencer) με τη χρήση της τεχνικής “Big-Dye Terminator Chemistry” από την εταιρεία Cemia SA (Larissa, Greece). Οι χρησιμοποιηθέντες εκκινητές για τις αντιδράσεις ήταν οι ίδιοι με εκείνους που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των επιλεγμένων περιοχών (Πίνακας 2).

Οι προκύπτουσες αλληλουχίες υπέστησαν επεξεργασία με τη χρήση του λογισμικού CodonCode Aligner v. 2.0.6 (CodonCode Corporation, Centerville, USA), και η ομολογία τους με τις διαθέσιμες αλληλουχίες των γονιδίων *rbcl* και 18S rRNA αντιπροσώπων του φύλου Chlorophyta αξιολογήθηκε με τη χρήση του εργαλείου BLAST, το οποίο είναι διαθέσιμο στη σχετική ιστοσελίδα της GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Benson *et al.* 2017).

Οι μορφολογικές παρατηρήσεις παρέπεμπαν στο γένος *Tetraselmis* και πιο συγκεκριμένα στην ταξινομική μονάδα *T. verrucosa* f. *rubens*, η οποία έχει περιγραφεί από τους Hori *et al.* (1983). Συνεπώς, διαμορφώθηκε ένα σύνολο δεδομένων (dataset), το οποίο περιελάμβανε, επιπλέον των αλληλουχιών που παρήχθησαν στα πλαίσια της διατριβής, και όλες τις κατατεθειμένες στην GenBank αλληλουχίες που αναφέρονται στο γένος *Tetraselmis*. Δεδομένης της έλλειψης κατατεθειμένων αλληλουχιών για το γονίδιο *rbcl* του προαναφερθέντος είδους (*T. verrucosa*) στην GenBank, στην ανάλυση συμπεριελήφθη και το αρχικό στέλεχος *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* (με κωδικό στελέχους CCAP 66/6). Το στέλεχος αυτό είναι κατατεθειμένο στη Συλλογή Καλλιεργειών CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, Scottish Association for Marine Science, Scotland) και είναι εκείνο που έχει περιγραφεί από τους Hori *et al.* (1983). Επιπροσθέτως, λαμβάνοντας υπ’όψιν τη γενικότερη αβεβαιότητα σχετικά με την ταξινομική θέση του γένους εντός των φυκών, στο σύνολο των δεδομένων συμπεριελήφθησαν και οι διαθέσιμες αλληλουχίες *rbcl* και 18S rRNA διαφόρων αντιπροσώπων των Πρασινοφυκών (Prasinophyceae, κλάση όπου παραδοσιακά είχε ενταχθεί το γένος) και των Χλωροφυκών (Chlorophyceae) βάσει τόσο των μοριακών όσο και των μορφολογικών συσχετίσεών τους με το υπό μελέτη γένος (Lealieart *et al.* 2012, αναζήτηση BLAST).

2.6.6. Φυλογενετικές αναλύσεις

Χρησιμοποιώντας το προαναφερθέν σύνολο δεδομένων, πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση ώστε να επιβεβαιωθούν οι σχέσεις μεταξύ των υπό μελέτη στελεχών, του αρχικού στελέχους *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* (CCAP 66/6) και των διαθέσιμων αλληλουχιών *Tetraselmis*, καθώς και η θέση των απομονωμένων στελεχών και του γένους *Tetraselmis* γενικότερα, εντός της κλάσης των Χλωροδενδροφυκών (Chlorodendrophyceae).

Η στοίχιση των αλληλουχιών που επελέγησαν για τη φυλογενετική ανάλυση έγινε με τη χρήση του λογισμικού CodonCode Aligner v. 2.0.6 και του αλγορίθμου Clustal X. Πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση στα πλαίσια της Μπεϋζιανής Συνεπαγωγής (Bayesian Inference) με τη χρήση του λογισμικού MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et al.* 2012). Για τις αναλύσεις αμφοτέρων των γονιδιακών τμημάτων χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο αντικατάστασης GTR+I+G. Κατά τις Μπεϋζιανές αναλύσεις, τα δεδομένα των αλληλουχιών διαχωρίστηκαν ανάλογα με το τμήμα του γονιδίου και όλες οι παράμετροι εκτιμήθηκαν ανεξάρτητα για τα δύο γονιδιακά τμήματα. Η επιλογή του μοντέλου και το πρότυπο διαχωρισμού εκτιμήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού PartitionFinder (Lanfear *et al.* 2012) και του Μπεϋζιανού Κριτηρίου (Bayesian Information Criterion, Schwarz 1978).

Στο λογισμικό MrBayes, πραγματοποιήθηκαν τέσσερις (4) ανεξάρτητες αναλύσεις (runs) ταυτοχρόνως. Το μήκος της αλυσίδας ρυθμίστηκε στο $20 \cdot 10^6$, οι παράμετροι ελήφθησαν δειγματοληπτικά κάθε 500 γενεές και χρησιμοποιήθηκε ένα τυχαίο εναρκτήριο δέντρο. Οι παράμετροι που έλαβαν τιμές για αποτελεσματικά μεγέθη δείγματος (effective sample sizes, ESS) άνω του 200, θεωρήθηκε ότι έχουν ληφθεί δειγματοληπτικά επαρκώς (Kuhner 2009). Τα αποτελέσματα των (4) τεσσάρων αναλύσεων συγκεντρώθηκαν και οι ανεξάρτητες αναλύσεις συνδυάστηκαν, μετά την απομάκρυνση του 25% των μη-χρησιμοποιήσιμων (burn-in). Τα μεταγενέστερα δέντρα (120,004) από τον συνδυασμό και των τεσσάρων αναλύσεων, συνοψίστηκαν ώστε να δημιουργηθεί ένα 50% πλειοψηφικό (majority-rule) συναινετικό δέντρο. Δεν χρησιμοποιήθηκαν είδη εξωτερικής ομάδας (out-group) ως “ρίζα” (root) του δέντρου. Για την εκτίμηση των γενετικών αποστάσεων ζευγών χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MEGA v.6 (Tamura *et al.* 2013) και το μοντέλο Kimura (1980).

2.7. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Επιπλέον των μορφολογικών μεθόδων, τα υπό μελέτη στελέχη υποβλήθηκαν και σε στοχευμένες βιοχημικές αναλύσεις βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας από άποψη τόσο χημειοταξνομική, όσο και βιομηχανικών εφαρμογών. Συγκεκριμένα, για τα στελέχη *Tetraselmis* πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις του περιεχομένου των κυττάρων σε λιπαρά οξέα (FAME profile). Για τα στελέχη *Dunaliella salina* πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις του περιεχομένου των κυττάρων σε β-καρωτένιο, βάσει των μετρήσεων που προέκυψαν από μια σειρά διερευνητικών πειραμάτων καταπόνησης λόγω αυξημένης αλατότητας, ο σχεδιασμός και η διάταξη των οποίων περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.7.2.

2.7.1. Προφίλ Λιπαρών Οξέων των Στελεχών *Tetraselmis*

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

1. 25 mL υγρής καλλιέργειας των στελεχών *Tetraselmis* διηθήθηκαν υπό κενό σε φίλτρα υάλινων ινών GF/C Whatman®, σε τρεις επαναλήψεις, με ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση της κυτταρικής πυκνότητας (κύτταρα·mL⁻¹). Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους -18°C μέχρι την πραγματοποίηση της ανάλυσης.
2. Κατά την ανάλυση, τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε υάλινους σωλήνες βρασμού (με πώμα) και μετά την προσθήκη α) του λιπαρού οξέος 19:0 (nonadecyclic acid) ως εσωτερικό δείγμα ελέγχου (internal standard) και β) μίγματος μεθανόλης/ τολουολίου 3:2 και ακετυλοχλωριδίου/ μεθανόλης 1:20 v/v (στάγδην), υπέστησαν βρασμό υπό συνθήκες εστεροποίησης για μία (1) ώρα. Πριν τον πωματισμό τα διαλύματα εμφυσήθηκαν με αέριο άζωτο προς αποφυγή οξειδωσης των λιπαρών οξέων.
3. Μετά από το πέρας μίας ώρας με ταυτόχρονη ανάδευση (vortex) των σωλήνων ανα 10', τα δείγματα αφέθηκαν να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Στη συνέχεια στα δείγματα προστέθηκε απιονισμένο H₂O, φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για 10' και συλλέχθηκε η λιπαρή φάση με πιπέττα (aspiration). Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε ακόμη δύο φορές με την προσθήκη εξανίου αντί ύδατος, ώστε να συλλεγεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα εστέρων.

5. Το εκχύλισμα των εστέρων των λιπαρών οξέων, διηθήθηκε σε υάλινο ηθμό με άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η υγρασία.

6. Η εξάτμιση του διαλύτη (εξάνιο) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση περιστροφικής συσκευής εξάτμισης Rotavapor (Büchi Labortechnik AG, Switzerland) και οι εστέρες των λιπαρών οξέων συλλέχθηκαν σε υάλινα φιαλίδια αέριου χρωματογράφου με τη χρήση οκτανίου.

7. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε αέριο χρωματογράφο (GLC Varian 3300, Sugar Land, TX, USA) με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (flame ionization detector, FID) και ποσοτικοποιήθηκαν βάσει του χρωματογραφήματος και με τη βοήθεια του εσωτερικού μάρτυρα (λιπαρό οξύ 19:0).

2.7.2. Πειράματα Παραγωγής β-καρωτενίου από Στελέχη *Dunaliella salina*

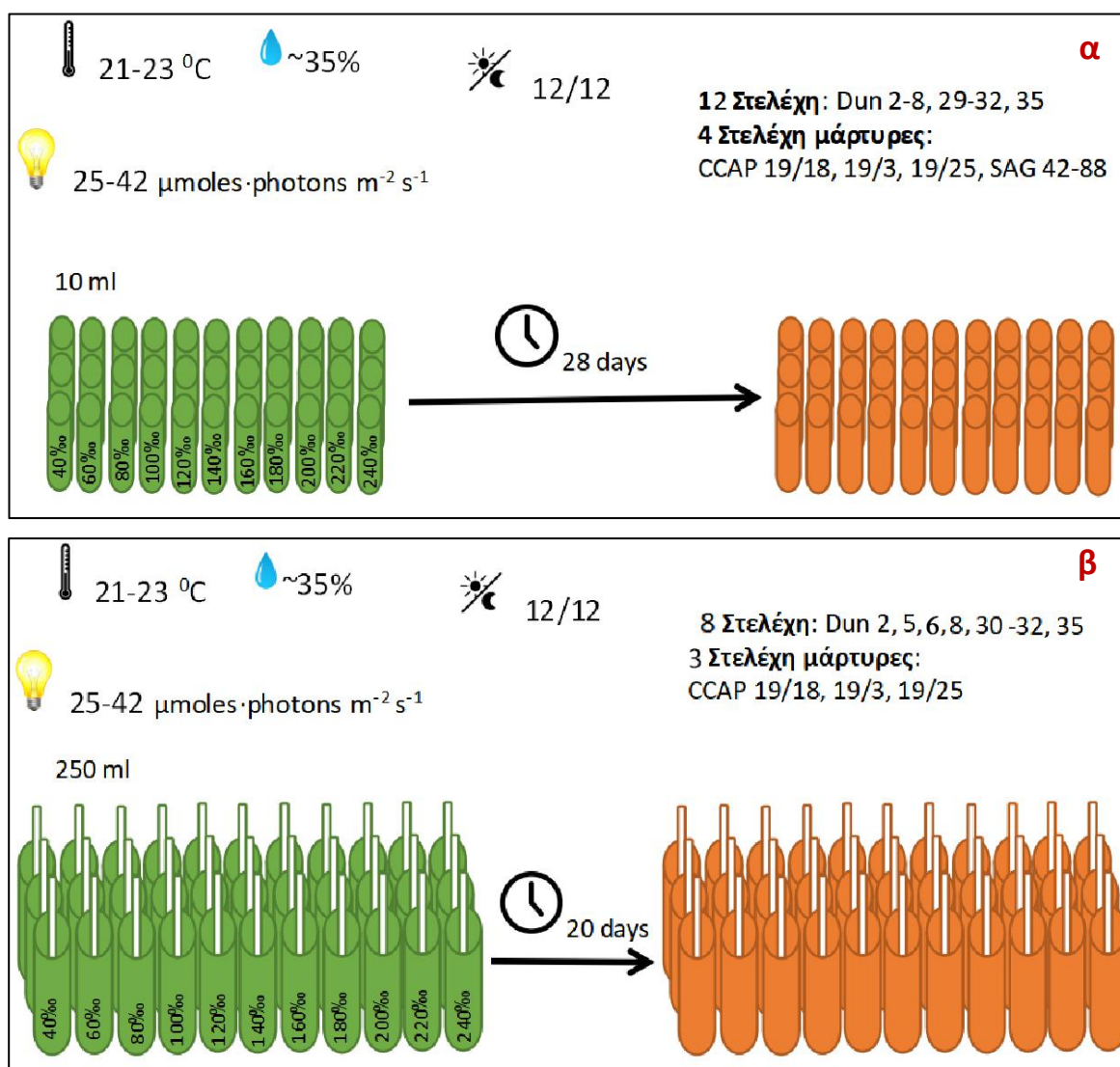
Για να διερευνηθεί η παραγωγικότητα των μελετηθέντων στελεχών *D. salina* σε β-καρωτένιο, η οποία συνεκτιμήθηκε στη μορφολογική τους ταυτοποίηση, και να αξιολογηθεί η δυνατότητα χρήσης τους στις βιομηχανίες τροφίμων και καλλυντικών, σχεδιάστηκε μια σειρά πειραμάτων ώστε να εκτιμηθεί η δυναμική των καλλιεργειών των στελεχών. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων βασίστηκε στην παρατήρηση ότι ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες επάγουν συνθήκες καταπόνησης (stress) στους πληθυσμούς *D. salina* πυροδοτώντας την αυξημένη παραγωγή καρωτενοειδών (βλ. Κεφάλαιο 1.11), και στη σχετική βιβλιογραφία (Borowitzka & Siva 2007). Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση του παράγοντα της αλατότητας (συγκέντρωση NaCl) στο μέσον καλλιέργειας, επί των στελεχών.

Οι πειραματικές παράμετροι επιλέχθηκαν με κριτήρια:

- τη σχετική βιβλιογραφία,
- την επιβίωση των κυττάρων,
- την παραγωγικότητα των στελεχών σε β-καρωτένιο,
- τη δυνατότητα καλλιέργειας σε μεγάλη κλίμακα,
- το χαμηλό κόστος και την ευκολία δημιουργίας εγκαταστάσεων και εφαρμογής των πειραματικών συνθηκών σε βιομηχανική κλίμακα.

Εκτός από την ταξινόμηση και τη μελέτη της συμπεριφοράς των στελεχών (καλλιέργειας και κυττάρων) σε διαφορετικές συνθήκες αλατότητας, στόχος των πειραμάτων ήταν η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου που θα συνδυάζει βέλτιστες

συνθήκες καλλιέργειας, παραγωγή προϊόντος υψηλής ποιότητας και καταλληλότητα για χρήση σε βιομηχανική κλίμακα. Ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα της υψηλής αλατότητας είναι η περιορισμένη πιθανότητα επιμόλυνσης της καλλιέργειας (από άλλα φύκη, μύκητες ή βακτήρια) χωρίς τη χρήση επιπλέον χημικών μεθόδων, οι οποίες μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση επί της καλλιέργειας ή να αυξήσουν το κόστος παραγωγής (Fon Sing & Borowitzka 2016).



Εικόνα 24. Συνοπτική απεικόνιση των πειραματικών διατάξεων για τα πειράματα αλατότητας σε στελέχη *D. salina*. Στους σωλήνες αναγράφεται η αλατότητα. α) Συνθήκες προκαταρκτικού πειράματος, β) συνθήκες κυρίως πειραματικής διαδικασίας.

Διεξήχθησαν δύο σειρές διερευνητικών πειραμάτων, μία σειρά προκαταρκτικών δοκιμών σε μικρή κλίμακα (10mL) και σειρά διερευνητικών πειραμάτων σε μέση κλίμακα (250mL). Η πειραματική διάταξη απεικονίζεται συνοπτικά στην Εικόνα 24. Στο προκαταρκτικό πείραμα μικρής κλίμακας χρησιμοποιήθηκαν δεκαέξι (16) στελέχη

D. salina, δηλ. τα στελέχη Dun 2 - 8, Dun 29 - 32 (προέλευση: Μεγάλο Έμβολο) και το στέλεχος Dun 35 (προέλευση: Μεσολόγγι) από την τράπεζα AthU-AI, καθώς και τέσσερα στελέχη μάρτυρες προερχόμενα από τράπεζες στελεχών μικροφυκών του εξωτερικού (19/3, 19/18 και 19/25 από τη συλλογή CCAP και 42-88 από τη συλλογή SAG), ενώ στο διερευνητικό πείραμα μέσης κλίμακας χρησιμοποιήθηκαν 11 στελέχη, δηλ. τα στελέχη Dun 2, 5, 6, 8, 30-32 και 35 από τη συλλογή AthU-AI και τα στελέχη 19/3, 19/18 και 19/25 από τη συλλογή CCAP. Για το προκαταρκτικό πείραμα επελέγησαν στελέχη για τα οποία η μακροσκοπική εικόνα των καλλιεργειών υποδείκνυε ανιχνεύσιμη παραγωγή β-καρωτενίου. Η επιλογή έγινε με επιπλέον κριτήριο τουλάχιστον 1 (ένα) στέλεχος από κάθε μορφότυπο να συμπεριληφθεί στην ανάλυση. Στόχοι του προκαταρκτικού πειράματος ήταν α) να ελεγχθεί η υπόθεση ότι η αλατότητα έχει επίδραση επί της παραγωγής β-καρωτενίου στα στελέχη, β) να καταμετρηθεί η ποσότητα καρωτενίου που συσσωρεύεται στο κύτταρο ($\mu\text{g}\cdot\text{cell}^{-1}$ και ως % του ξηρού βάρους κυττάρου) προς ταξινομική χρήση και γ) στη συνέχεια να επιλεγούν τα στελέχη στα οποία η επίδραση αυτή φαίνεται να είναι πιο έντονη όσον αφορά στην ποσότητα του β-καρωτενίου που παράγεται και στην παραγωγικότητα αυτού ανά ημέρα (σε $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$). Τα στελέχη που επελέγησαν από τη διαδικασία αυτή, συμπεριελήφθησαν στο διερευνητικό πείραμα, στόχος του οποίου ήταν η διερεύνηση (screening) της πιθανής χρήσης αυτών σε βιομηχανικές εφαρμογές αλλά και η κατά το δυνατόν ποσοτικοποίηση της επίδρασης της αλατότητας στην παραγωγικότητα της καλλιέργειας τόσο σε βιομάζα όσο και σε β-καρωτένιο.

Για το προκαταρκτικό πείραμα, προετοιμάστηκαν 3 επαναλήψεις των 11 δοκιμαστικών σωλήνων ανά στέλεχος (συνολικά $3\times 11\times 16 = 528$ σωλήνες). Οι σωλήνες περιείχαν 10mL θρεπτικού μέσου με 11 διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (40% - 240% με μεσοδιαστήματα των 20%) και αποστειρώθηκαν όπως αναφέρεται ανωτέρω (Κεφάλαιο 2.3.2.). Σε κάθε σωλήνα έγινε εμβολιασμός περίπου 1mL καλλιέργειας στην εκθετική φάση, και οι σωλήνες επωάστηκαν στον θάλαμο καλλιεργειών της Τράπεζας AthU-AI χωρίς αερισμό (στατικές καλλιέργειες) για 28 ημέρες, μετά το πέρας των οποίων πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις εκτίμησης της δυναμικής των καλλιεργειών. Το διερευνητικό (screening) πείραμα πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο με τη διαφορά ότι οι καλλιέργειες ήταν μέσης κλίμακας και αεριζόμενες. Για την εν λόγω διαδικασία, αντί υάλινων δοκιμαστικών σωλήνων χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα πλαστικά δοχεία των 500mL στα οποία προστέθηκαν 250mL θρεπτικού μέσου, εμβολιάστηκαν με 2,5mL καλλιέργειας σε εκθετική φάση και επωάστηκαν ως ανωτέρω για 20 ημέρες. Ο αερισμός επετεύχθη με τη χρήση αποστειρωμένων πιπετών των 2mL μίας χρήσης,

λεπτών σωλήνων αερισμού και αντλιών ενυδρείου. Η χρονική διάρκεια της επώασης καθορίστηκε με βάση την παρατηρούμενη εξέλιξη των καλλιεργειών τόσο μακροσκοπικά όσο και μικροσκοπικά. Οι αεριζόμενες καλλιέργειες αναπτύσσονται ταχύτερα και φθάνουν στην εκθετική φάση νωρίτερα από τις μη αεριζόμενες, λόγω της καλύτερης ανάδευσης των αερίων που έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη διαθεσιμότητα άνθρακα (CO₂) και κατ' επέκταση εντονότερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα (Suh & Lee 2003).

Η εκτίμηση της δυναμικής των καλλιεργειών έγινε με τη χρήση διαφόρων παραμέτρων. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε μέτρηση της κυτταρικής πυκνότητας των καλλιεργειών με τη χρήση αιμοκυτταρομέτρου Neubauer, τόσο της αρχικής καλλιέργειας από την οποία έγινε ο εμβολιασμός (πυκνότητα εμβολίου ή αρχική πυκνότητα) όσο και της τελικής καλλιέργειας μετά την επώαση (τελική πυκνότητα). Στην τελική καλλιέργεια έγιναν επίσης: μέτρηση της ξηρής βιομάζας σε $\mu\text{g}/\text{cell}$ για το κύτταρο και σε $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ για το σύνολο της καλλιέργειας, και μέτρηση της περιεκτικότητας β-καρωτενίου σε $\mu\text{g}\cdot\text{cell}^{-1}$ και % περιεκτικότητα επί του ξηρού βάρους (dw) του κυττάρου, για το κύτταρο και $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ για την καλλιέργεια, καθώς και μέτρηση της παραγωγικότητας β-καρωτενίου σε $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{ημέρα}^{-1}$. Η ανάλυση των χρωστικών, καθώς και η μεθοδολογία των μετρήσεων για την εκτίμηση της δυναμικής των καλλιεργειών, περιγράφονται παρακάτω.

2.7.3. Ανάλυση Χρωστικών

Για την εκτίμηση της περιεκτικότητας των καλλιεργειών *D. salina* σε β-καρωτενιο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της φασματοφωτομετρίας, καθώς και -συμπληρωματικά- η μέθοδος της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Ανάλυσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).

Η τροποποιημένη φασματοφωτομετρική μέθοδος βασίστηκε στις μεθόδους των Ben-Amotz & Avron (1983a), Çelekli & Dönmez (2006) και Nagata *et al.* (2007). Για κάθε δείγμα, συγκεκριμένη ποσότητα υγρής καλλιέργειας (10mL για τα πειράματα μικρής κλίμακας, και 25-100mL, αναλόγως της κυτταρικής πυκνότητας, για τα πειράματα μέσης κλίμακας) διηθήθηκε υπό κενό σε φίλτρα GF/C Whatman®. Τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε 5mL ακετόνης 80% σε υάλινους σωλήνες φυγοκέντρου με πώμα, και επωάστηκαν για 1-3 ημέρες στους 4°C ώστε να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση των χρωστικών που παράγονται εντός του κυττάρου, στο διάλυμα της ακετόνης. Το βήμα αυτό υποβοηθάται με τον θρυμματισμό του φίλτρου με υάλινη

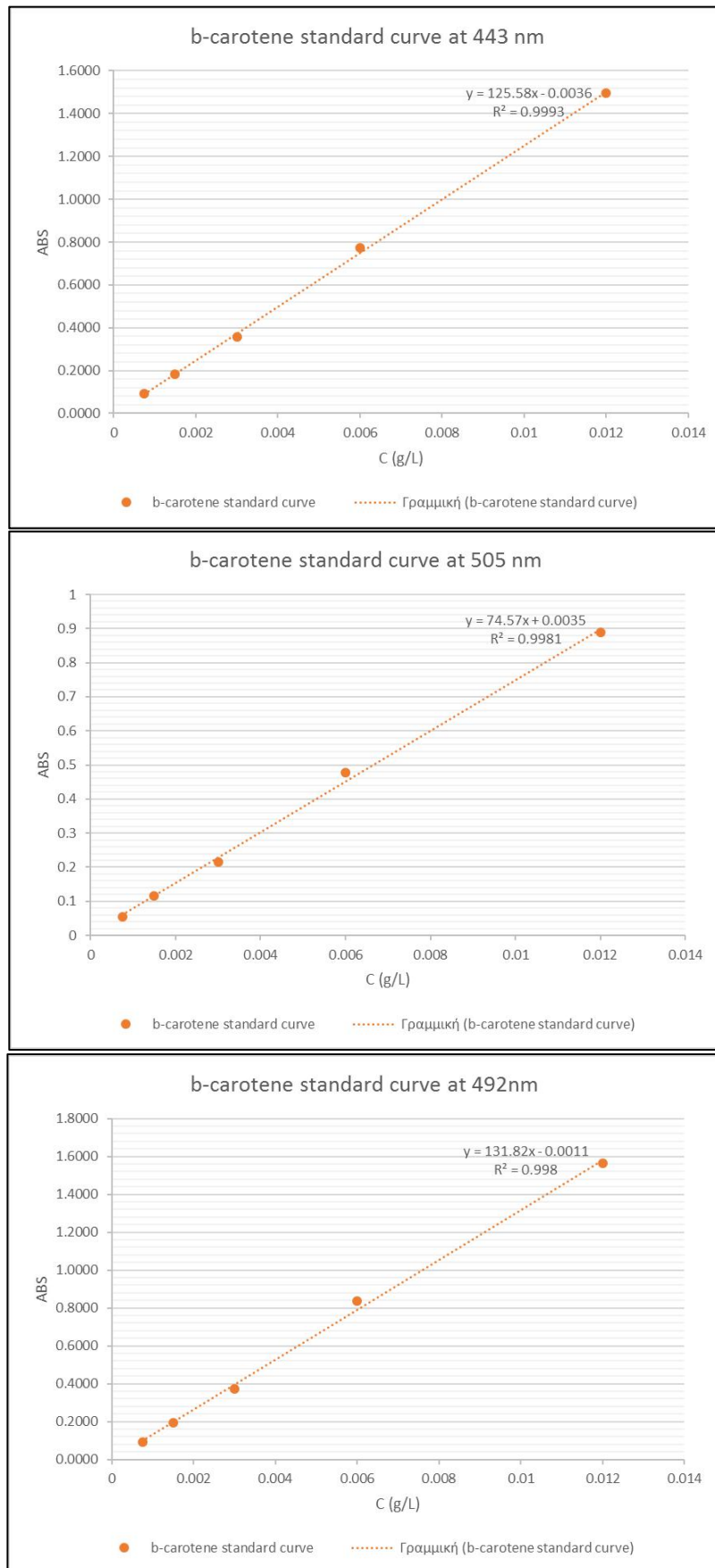
ράβδο. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και ελήφθη το υπερκείμενο, το οποίο και φωτομετρήθηκε σε τρία μήκη κύματος (443, 492 και 505 nm).

Η συγκέντρωση του β-καρωτενίου υπολογίστηκε με τη χρήση των διαφορετικών εξισώσεων που αναφέρονται στα προαναφερθέντα πρωτόκολλα, αλλά κρίθηκε απαραίτητη η διόρθωση της μεθόδου. Αυτό πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της HPLC στα δείγματα και την επίλυση συστήματος τριών αγνώστων με τη βοήθεια τριών πρότυπων καμπυλών (μία για κάθε μήκος κύματος) από γνωστές συγκεντρώσεις β-καρωτενίου αναλυτικής καθαρότητας (Εικόνα 25). Από τη διαδικασία προέκυψε μια νέα βελτιωμένη εξίσωση, η οποία επέτρεψε τον ακριβέστερο υπολογισμό του β-καρωτενίου για τα μελετηθέντα στελέχη (Chantzistroutsiou *et al.*, δεδομένα υπό δημοσίευση):

$$\beta\text{-carotene (g/L)} = 0,0017(OD_{443}) + 0,0054(OD_{492}) + 0,0031(OD_{505})$$

Η ποιοτική ανάλυση καρωτενοειδών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική HPLC-DAD (diode array detector, ανιχνευτής συστοιχίας διοδίων) (Shimadzu HP 1100, USA) και με τη χρήση στήλης YMC C30 (Germany), με διαλύτες μεθανόλη, t-βουτυλομεθυλαιθέρα και 1% υδατικό διάλυμα φωσφορικού οξέος. Η εκχύλιση των χρωστικών έγινε σε ακετόνη όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως, με ένα επιπλέον στάδιο το λουτρό υπερήχων (Clifton SW Series Industrial Ultrasonic Bath) στους 25°C για 5 λεπτά, με σκοπό την αποτελεσματικότερη λύση των κυττάρων και κατ'επέκταση την αποδοτικότερη εκχύλιση των χρωστικών.

Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στην απορρόφηση ενός εύρους προκαθορισμένων συγκεντρώσεων β-καρωτενίου αναλυτικής καθαρότητας στα μήκη κύματος 458 και 447 nm. Η ταυτοποίηση των ανιχνευθέντων καρωτενοειδών έγινε με τη δημιουργία φασμάτων απορρόφησης και τη σύγκριση των τιμών λ_{\max} με αντίστοιχες της βιβλιογραφίας (Choi *et al.* 2007, Hu *et al.* 2008; Kleinegriss *et al.* 2010a, Jing *et al.* 2012, Fu *et al.* 2013).



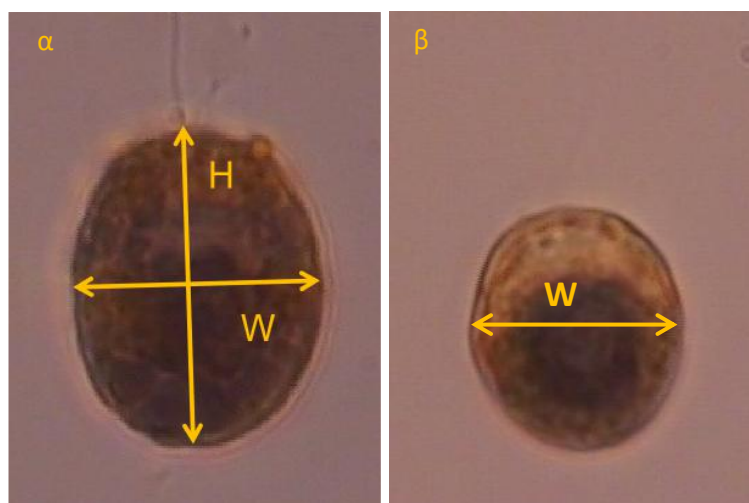
Εικόνα 25. Πρότυπες καμπύλες απορρόφησης β-καρωτενίου που χρησιμοποιήθηκαν για τη διόρθωση της μεθόδου.

2.8. ΒΙΟΜΕΤΡΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΚΙΝΗΤΙΚΗ

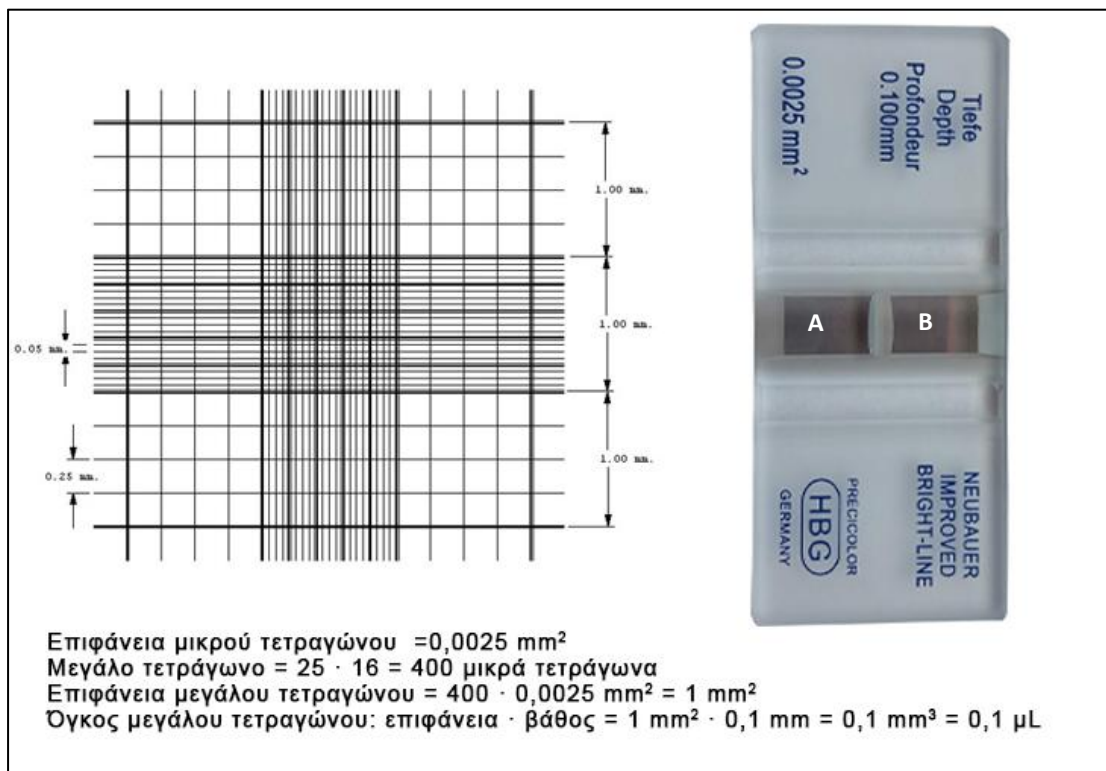
Η εκτίμηση των βιομετρικών γνωρισμάτων των στελεχών (μέγεθος και βιο-όγκος κυττάρων), έγινε με φωτογράφιση μεμονωμένων κυττάρων, τα οποία μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα Lugol, ώστε να γίνει ακινητοποίηση χωρίς αλλοίωση του σχήματος και του μεγέθους τους. Τα κύτταρα φωτογραφήθηκαν σε πλευρική θέση ώστε να είναι ακριβέστερη η μέτρηση των διαστάσεων ύψους (H) και πλάτους (W), όπως φαίνεται στην Εικόνα 26. Για τις μετρήσεις των διαστάσεων των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Photoshop CS6 (Adobe Systems, USA). Ο υπολογισμός του βιο-όγκου των κυττάρων έγινε με τη χρήση της εξίσωσης κατά Hillebrand *et al.* (1999):

$$V = W^2 \cdot H \cdot \pi / 6$$

Για την ελαχιστοποίηση των στατιστικών σφαλμάτων μετρήθηκαν κατ' ελάχιστον 30 κύτταρα ανά στέλεχος και ανά συνθήκη αλατότητας (για τα στελέχη *D. salina*). Όσον αφορά στη βιοκινητική των καλλιέργειών, η κυτταρική πυκνότητα (cells/mL) υπολογίστηκε με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου Neubauer μετά από μονιμοποίηση με διάλυμα Lugol (Εικόνα 27). Για τα στελέχη *Tetraselmis*, ο υπολογισμός της ξηρής βιομάζας των κυττάρων ($\mu\text{g} \cdot \text{cell}^{-1}$) και της ολόκληρης της καλλιέργειας ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) πραγματοποιήθηκε με διήθηση δειγμάτων (3 επαναλήψεις) σε φίλτρα GF/C υπό κενό, ξήρανση αυτών σε κλίβανο στους 200°C και ζύγιση σε ζυγό ακριβείας πέντε δεκαδικών. Για τα στελέχη *D. salina*, η εκτίμηση του ξηρού βάρους έγινε με αναγωγή του κυτταρικού βιο-όγκου.



Εικόνα 26. Κύτταρα *D. salina* μετά από χρώση με διάλυμα Lugol, όπου απεικονίζονται οι βασικές κυτταρικές διαστάσεις. α) Νωτιαία (dorsal) και β) Κοιλιακή (ventral) όψη. (Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούτσου)



Εικόνα 27. Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Αναγράφονται οι διαστάσεις των θαλαμίσκων και η αναγωγή σε όγκο καλλιέργειας. Για την εκτίμηση της κυτταρικής πυκνότητας μετρώνται και τα 9 μεγάλα τετράγωνα και στις δύο θέσεις (A και B) για τρεις επαναλήψεις ανά δείγμα και υπολογίζονται οι μέσοι όροι κάθε επανάληψης.

2.9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα μονιμοποιημένα περιβαλλοντικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της ποικιλότητας και αφθονίας των διαφόρων ομάδων του φυτοπλαγκτού (ως στιγμιότυπο της βιοκοινωνίας) στους σταθμούς δειγματοληψίας. Οι μετρήσεις αφθονίας πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου σε μεγεθύνσεις x100 και x200. Καταμετρήθηκαν οι ομάδες του φυτοπλαγκτού που εμφάνισαν τις μεγαλύτερες αφθονίες με έμφαση στους επιθυμητούς προς απομόνωση οργανισμούς, δεδομένου ότι μια πλήρης οικολογική ανάλυση της περιοχής δειγματοληψίας υπερβαίνει τους στόχους της διατριβής. Η καταμέτρηση έγινε με τη χρήση κυψελίδας όπου τοποθετήθηκαν 10 mL από το εκάστοτε δείγμα. Η κυψελίδα αφέθηκε στον πάγκο για διάστημα 24 ωρών, ώστε τα μονιμοποιημένα κύτταρα να επικαθήσουν στον πυθμένα και να καταμετρηθούν. Για κάθε δείγμα καταμετρήθηκαν 140 οπτικά πεδία σε 3 επαναλήψεις το καθένα (συνολικά 140x3x48 = 20160 πεδία), στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι για κάθε δείγμα και έγινε αναγωγή στην αρχική

ποσότητα του δείγματος (κύτταρα·L⁻¹). Για την εμφάνιση των οργανισμών ιδιαίτερου ενδιαφέροντος (βλ. Πίνακα 4), η εκτίμηση έγινε επί του συνόλου των δειγμάτων κάθε σταθμού.

2.10. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη χρήση τριών διαφορετικών στατιστικών προγραμμάτων. Η διευθέτηση των δεδομένων, οι μαθηματικοί υπολογισμοί, η ανάλυση διακύμανσης One-Way Anova και η γραφική απεικόνιση των μετρήσεων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του πακέτου Microsoft Office Excel 360 (Microsoft, USA) και του διαδικτυακού λογισμικού που είναι διαθέσιμο στην ιστοσελίδα: <https://astatsa.com> (Vasavada 2016). Η κανονικοποίηση και ο μετασχηματισμός των δεδομένων, η ανάλυση ομαδοποίησης κατά Bray-Curtis (Cluster Analysis) και ο υπολογισμός των δεικτών ποικιλότητας (Shannon, Pielou, Simpson, Berger-Parker) στα περιβαλλοντικά δείγματα πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Primer-6 (Clarke & Gorley 2006). Τέλος, η πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης Two-Way Anova και Multivariate ANOVA (MANOVA) καθώς και ο έλεγχος πραγματικής σημαντικότητας Tukey (Tukey-test, Tukey 1949), ώστε να ελεγχθεί η στατιστική σημαντικότητα και η διακύμανση των μετρήσεων, όπου αυτό ήταν απαραίτητο, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού TIBCO Statistica (TIBCO Software Inc., USA).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΣΤΑΘΜΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

3.1.1. Αβιοτικές παράμετροι

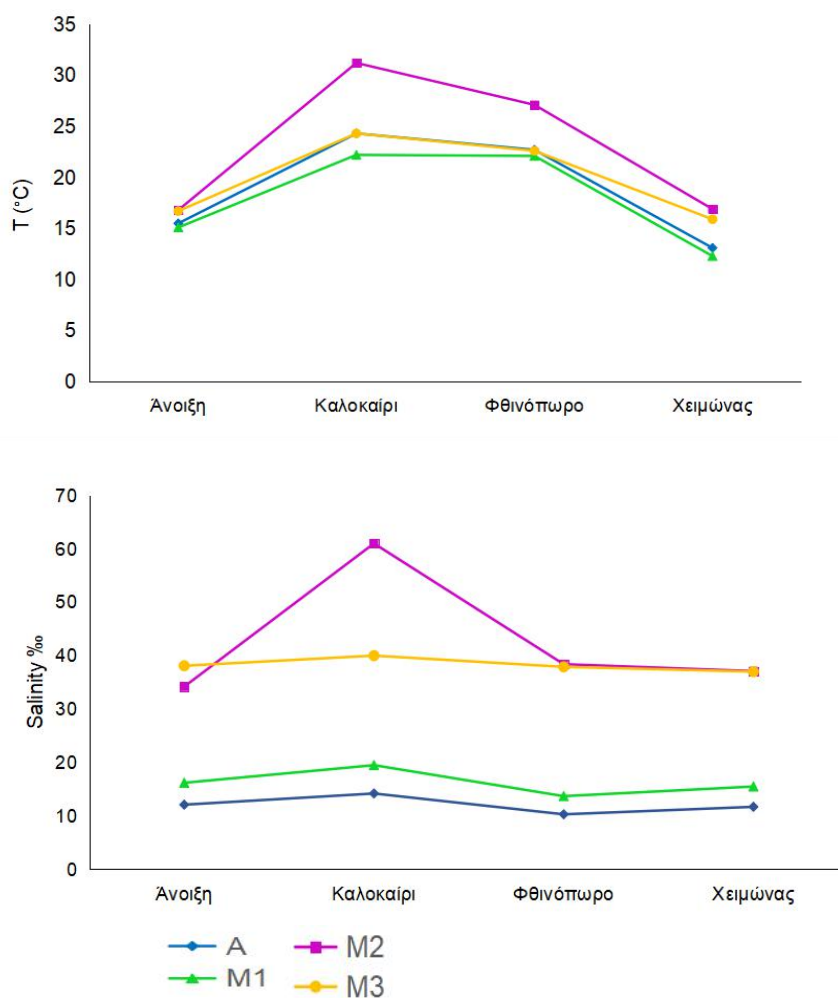
Η εποχική διακύμανση της θερμοκρασίας σε °C και της αλατότητας σε ‰, όπως προέκυψε από τις επί τόπου μετρήσεις στους σταθμούς δειγματοληψίας του Μεσολογίου-Αιτωλικού, παρουσιάζεται στην Εικόνα 28, ενώ στον Πίνακα 3 φαίνονται οι μέσες εποχικές τιμές pH για όλους τους σταθμούς. Τα αναλυτικά στοιχεία των δειγματοληψιών παρατίθενται στο Παράρτημα 3. Η θερμοκρασία παρουσίασε τις αναμενόμενες για κάθε εποχή τιμές. Ο σταθμός των αλυκών (M2) εμφάνισε γενικά υψηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με τους άλλους σταθμούς καθ' όλη τη διάρκεια του έτους φτάνοντας τους 33°C κατά τη θερινή δειγματοληψία. Ο σταθμός που παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές ήταν ο M1 (υφάλμυρος σταθμός), φτάνοντας στους 12 °C κατά τη χειμερινή δειγματοληψία, ενώ και ο σταθμός του Αιτωλικού παρουσίασε επίσης χαμηλές θερμοκρασίες φτάνοντας τους 13,1 °C κατά τη χειμερινή δειγματοληψία.

Πίνακας 3. Τιμές pH* στους σταθμούς δειγματοληψίας κατά τις δειγματοληπτικές περιόδους.

Σταθμός	Άνοιξη	Καλοκαίρι	Φθινόπωρο	Χειμώνας
A	7,8	7,9	7,8	7,7
M1	8,01	8,21	8,11	7,98
M2	7,28	7,1	7,85	7,52
M3	8,01	7,92	8	8,2

* Μέσος όρος τριών (3) μετρήσεων) ανά σταθμό, ανά εποχή.

Όσον αφορά στην αλατότητα, ο σταθμός του Αιτωλικού (A) και ο πλησιέστερος αυτού σταθμός του Μεσολογίου (M1), οι οποίοι γειτνιάζουν με απορροές γλυκών υδάτων, παρουσίασαν επίσης σημαντικά χαμηλότερες αλατότητες σε σχέση με τους υπόλοιπους σταθμούς καθ' όλη τη διάρκεια του έτους με τιμές που κυμάνθηκαν από 10,3 - 14,2‰ για τον σταθμό A και από 13,7 - 19,5‰ για τον σταθμό M1, ενώ η υψηλότερη αλατότητα παρατηρήθηκε και πάλι στον σταθμό της αλυκής (M2). Ωστόσο, η μέγιστη μετρηθείσα αλατότητα εκεί (63‰) ήταν αρκετά χαμηλότερη από το αναμενόμενο (στις προκαταρκτικές δειγματοληψίες οι αλατότητες έφτασαν μέχρι και το 220‰), κάτι το οποίο ενδεχομένως σχετίζεται με το γεγονός ότι στην περιοχή σημειώθηκαν βροχοπτώσεις την εβδομάδα που προηγήθηκε των δειγματοληψιών με συνέπεια την εισροή γλυκού νερού στις αλυκές. Η δειγματοληψία επαναλήφθηκε για



Εικόνα 28. Εποχική κατανομή των τιμών θερμοκρασίας και αλατότητας στους σταθμούς δειγματοληψίας στο λιμνοθαλάσσιο σύστημα Μεσολογίου-Αιτωλικού.

τον σταθμό αυτόν σε μεταγενέστερη χρονική στιγμή με σκοπό τη λήψη υπεράλμυρων δειγμάτων. Η μετρηθείσα αλατότητα σε αυτήν την περίπτωση ήταν 143‰, αλλά η τιμή αυτή δεν συμπεριελήφθη στην ανάλυση αφού η δειγματοληψία ήταν εκτός του αρχικού σχεδιασμού. Οι τιμές του pH ήταν χαμηλότερες στον σταθμό του Αιτωλικού (A) καθώς και στον σταθμό της αλυκής (M2), με τη χαμηλότερη τιμή να παρατηρείται κατά τη θερινή δειγματοληψία στον σταθμό M2 (7,1) -είναι και η χαμηλότερη μετρηθείσα τιμή pH- και κατά τη χειμερινή δειγματοληψία για τον σταθμό A (7,7). Το Αιτωλικό αποτελεί μια αρκετά υποξική λιμνοθάλασσα (Nicolaidou *et al.* 2005, Gianni *et al.* 2011, Koutsodendris *et al.* 2015, Chamalaki *et al.* 2014) και εμφανίζει αρκετά χαμηλή αλατότητα. Χαμηλές τιμές pH έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες περιπτώσεις παράκτιων “λιμνών” με παρόμοια χαρακτηριστικά (π.χ. Conides & Pargoua 1997). Στις αλυκές και γενικότερα στα υπεράλμυρα περιβάλλοντα, η αφθονία του φυτοπλαγκτού είναι σχετικά χαμηλή και η εξάτμιση και η αύξηση της θερμοκρασίας

φαίνεται να αποτελούν περιοριστικό παράγοντα για την αύξηση των πληθυσμών τους (Jelisson & Melack 1988, 1993, Tanner *et al.* 1999, Kirkwood & Henley 2006) γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη φωτοσυνθετική δραστηριότητα με παράλληλη αύξηση της βακτηριακής δραστηριότητας, η οποία με τη σειρά της μπορεί να προκαλεί πτώση των τιμών pH (Oppenheimer & Kornicker, 1958, Oppenheimer 1960, Kalinowska 2004, Mieczan & Tarkowska-Kukuryk 2013).

3.1.2. Σύνθεση φυκο-κοινωνιών

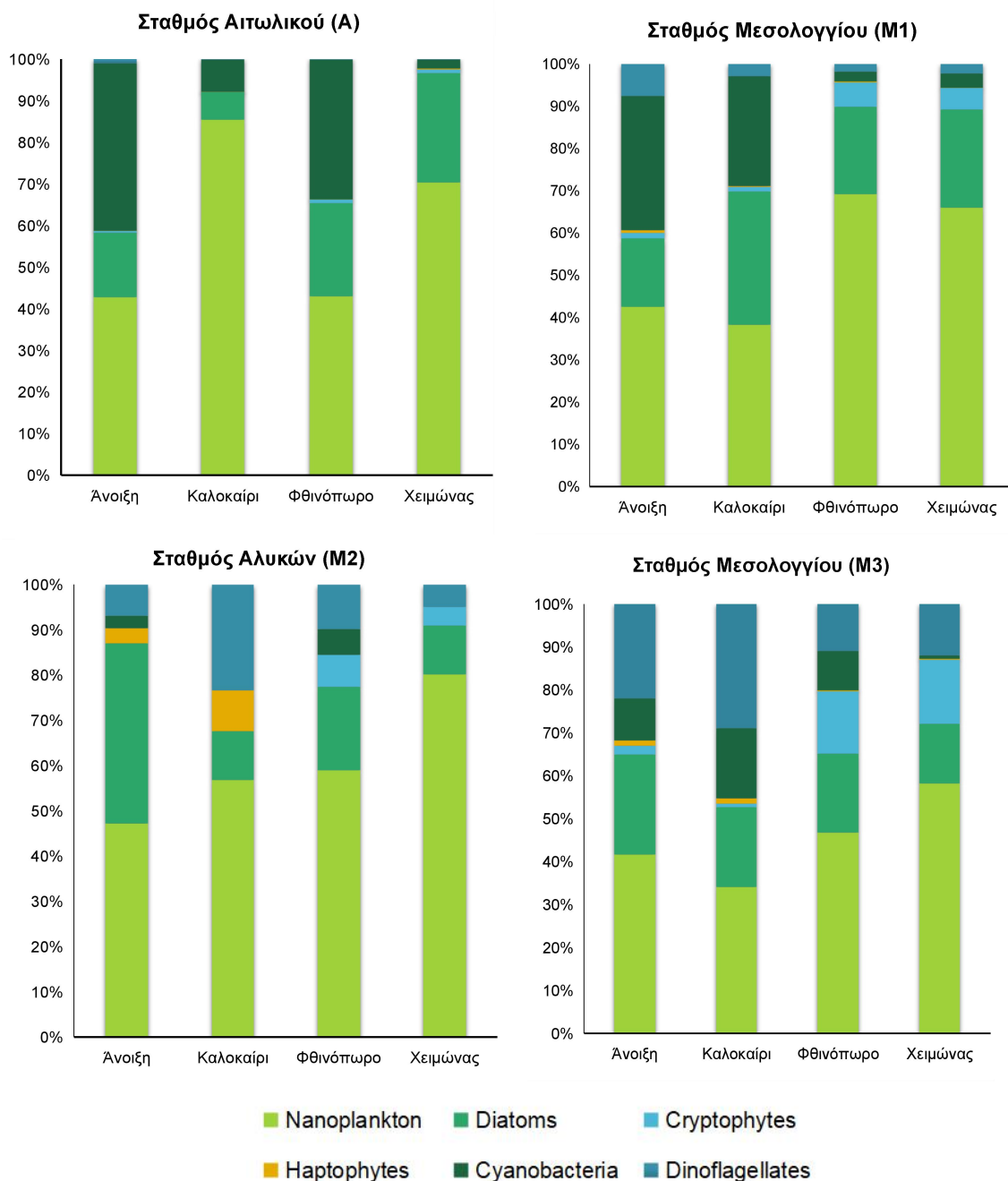
Η σύνθεση των φυκο-κοινωνιών στους σταθμούς Μεσολογγίου-Αιτωλικού παρουσιάζεται στην Εικόνα 29, ενώ στον Πίνακα 4 φαίνεται η παρουσία/απουσία οργανισμών-στόχων (δηλ. των επιθυμητών προς απομόνωση οργανισμών) και η σχετική τους αφθονία στο δείγμα. Οι ευρύτερες ομάδες που παρατηρήθηκαν ήταν τα Διάτομα, τα Δινομαστιγωτά, τα Κυανοβακτήρια, τα Κρυπτοφύκη, ενώ σε ορισμένους σταθμούς παρατηρήθηκαν και αντιπρόσωποι των Απποφυκών. Όλα τα παρατηρηθέντα χλωροφύκη ήταν μικρού μεγέθους (έως 20 -25 μm) και μαζί με το πικο-πλαγκτόν (κύτταρα μεγέθους 0,2 - 2 μm) καθώς και τα υπόλοιπα παρατηρηθέντα κύτταρα (ανήκοντα σε διάφορες ταξινομικές μονάδες) μεγέθους < 25 μm , εντάχθηκαν στην κατηγορία “νανοπλαγκτόν” (nanoplankton) για την ποσοστιαία εκτίμηση της αφθονίας στα δείγματα. Βάσει των διακριτών αυτών ομάδων έγινε και η εκτίμηση της ποικιλότητας στα δείγματα με τη χρήση διαφόρων δεικτών ποικιλότητας (Εικόνα 30).

Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα της Εικόνας 29, στην πλειονότητα των δειγμάτων το νανοπλαγκτόν, δηλαδή τα είδη που αποτελούνται από πολύ μικρού μεγέθους άτομα, εμφανίζουν σημαντική αφθονία με σχεδόν επικράτηση στο θερινό δείγμα του σταθμού του Αιτωλικού (A), και όπως είναι αναμενόμενο αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων σε όλα τα δείγματα. Σε όλα τα δείγματα παρατηρήθηκαν Διάτομα, τα οποία εμφάνισαν σημαντική αφθονία σε ορισμένα δείγματα και κυρίως την άνοιξη στις αλυκές και το καλοκαίρι στον σταθμό M1. Η παρουσία των Κυανοβακτηρίων ήταν έντονη στους σταθμούς χαμηλότερης αλατότητας, στα εαρινά και φθινοπωρινά δείγματα του σταθμού A και στο θερινό δείγμα του σταθμού M1. Σε όλους τους σταθμούς του Μεσολογγίου παρατηρήθηκαν Κρυπτοφύκη, με εντονότερη παρουσία στα φθινοπωρινά και χειμερινά δείγματα του σταθμού πλησίον της θάλασσας (M3). Η ομάδα των Δινομαστιγωτών είχε έντονη παρουσία στους “αλμυρούς” σταθμούς (M2, M3).

Όσον αφορά στα μικροφύκη -ιδιαίτερου ενδιαφέροντος για το θέμα της διατριβής-, σημαντική ήταν η παρουσία του γένους *Tetraselmis* σε όλα τα δείγματα του σταθμού M3 (θαλάσσια δίοδος) καθώς και στο φθινοπωρινό δείγμα του M1 (πλησίον γλυκών υδάτων). Η παρουσία του γένους *Dunaliella* (και ιδιαιτέρως του είδους *D. salina*) στον σταθμό M2 (αλυκή) ήταν σημαντική στα δείγματα του καλοκαιριού και του φθινοπώρου. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δύο αυτά γένη σε συνδυασμό με τους αντιπροσώπους του γένους *Arthrospira* Gomont 1892 (*Spirulina* Turpin ex Gomont 1892) ήταν τα μόνα που παρατηρήθηκαν σε όλους τους δειγματοληπτικούς σταθμούς. Η παρουσία των οργανισμών-στόχων εκτιμήθηκε στο σύνολο των δειγμάτων για κάθε σταθμό. Τα δεδομένα των μετρήσεων για όλα τα δείγματα (48 δείγματα) παρατίθενται στο Παράρτημα 3.

Αν και δεν εμφανίζεται κάποιο συγκεκριμένο εποχικό πρότυπο διαδοχής ή αφθονίας, υπάρχουν ορισμένες ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις όπως το γεγονός ότι τα Διάτομα εμφανίζουν σημαντική αφθονία στο θερινό δείγμα των αλυκών. Ακόμη, τα μεγάλοι μεγέθους άτομα (Διάτομα και Δινομαστιγωτά) εμφανίζουν υψηλές σχετικές αφθονίες στους σταθμούς υψηλότερης αλατότητας (M2, M3) και κάτι αντίστοιχο παρατηρείται στους σταθμούς χαμηλής αλατότητας (A, M1) για τα Κυανοβακτήρια, ιδιαιτέρως στα εαρινά δείγματα. Επίσης, τα Δινομαστιγωτά εμφάνισαν αξιοσημείωτες σχετικές αφθονίες σε όλα τα δείγματα του “θαλάσσιου” σταθμού M3 και το καλοκαίρι στις αλυκές (M2), αλλά ήταν σχεδόν απόντα ή εμφάνισαν πολύ μικρότερες αφθονίες στους σταθμούς χαμηλότερης αλατότητας. Επιπλέον αξίζει να αναφερθεί ότι στα ληφθέντα δείγματα δεν παρατηρήθηκε εποχικότητα στην αφθονία και την ποικιλότητα οργανισμών σε συσχέτιση με το βάθος, η οποία να υποδηλώνει ότι η κατακόρυφη ανάμιξη κατά τη χειμερινή περίοδο επηρεάζει τη σύνθεση των φυκοκοινωνιών στους σταθμούς δειγματοληψίας.

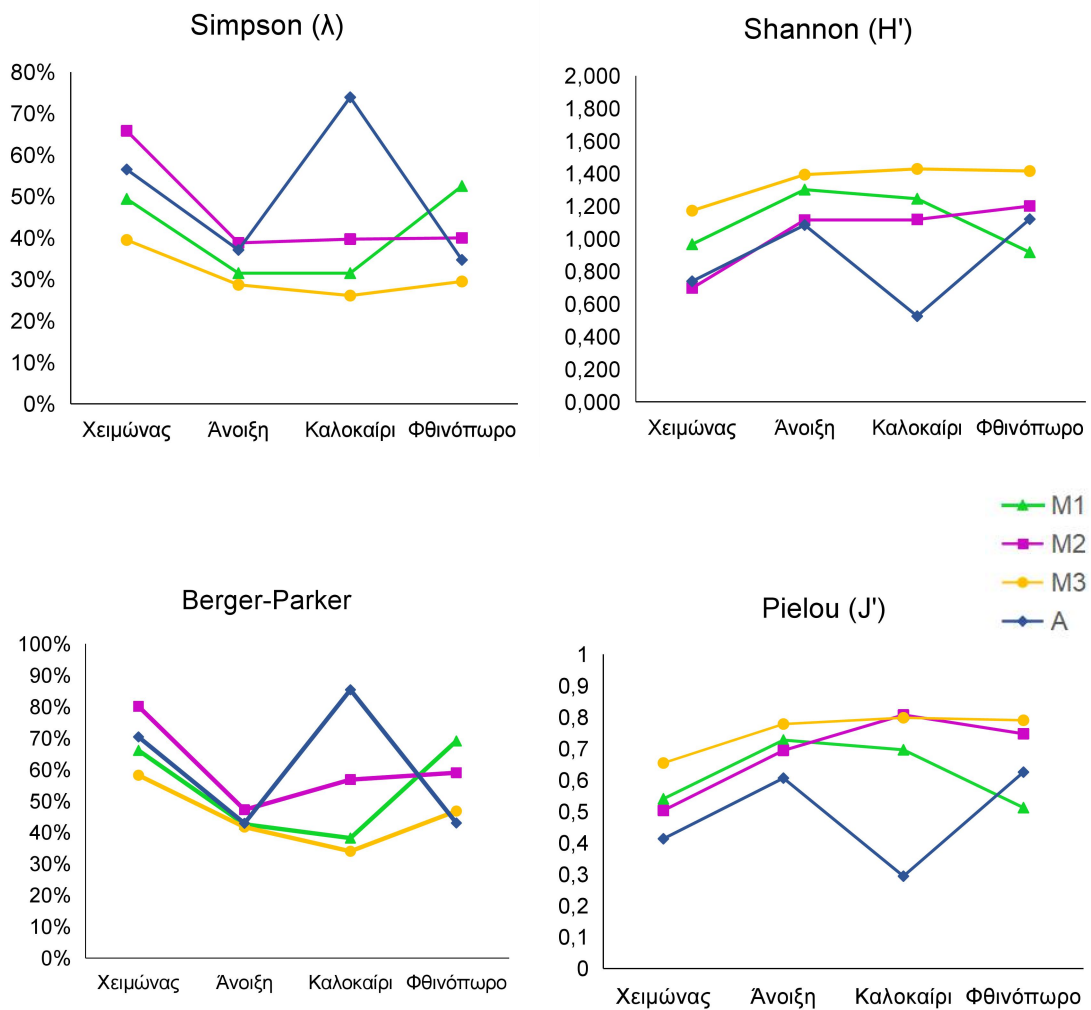
Παρά το γεγονός ότι η πληροφορία που λαμβάνουμε από τους δείκτες ποικιλότητας είναι περιορισμένη εξ αιτίας του μικρού αριθμού ταξινομικών μονάδων που συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση (όπως προαναφέρθηκε, μια πιο ενδελεχής ανάλυση υπερβαίνει τους στόχους της διατριβής), εν τούτοις διακρίνεται μια σαφής ελάττωση της ποικιλότητας για τον σταθμό του Αιτωλικού το καλοκαίρι, η οποία είναι προφανής βάσει και των τεσσάρων δεικτών. Στον σταθμό αυτό τα θερινά δείγματα κυριαρχούνται από πολύ μικρού μεγέθους ομάδες και από αρκετά χλωροφύκη. Αυτό υποδεικνύει ενδεχομένως κάποιο φαινόμενο ξαφνικής και έντονης εισροής θρεπτικών στην περιοχή. Ο σταθμός δειγματοληψίας εντοπίζεται πλησίον κατοικημένης περιοχής και εκτός από τις απορροές των γλυκών υδάτων που προαναφέρθηκαν (Κεφάλαιο 2.1.) το σημείο όπως και ολόκληρη η λιμνοθάλασσα δέχονται την έντονη



Εικόνα 29. Σύσταση των βιοκοινωνιών στους σταθμούς δειγματοληψίας στο σύστημα Μεσολογγίου-Αιτωλικού, ως ποσοστιαία αφθονία των διαφόρων ομάδων του φυτοπλαγκτού.

επίδραση της ανθρώπινης δραστηριότητας. Το καλοκαίρι, η εισροή επισκεπτών κυρίως για λόγους τουρισμού ασκούν επιπλέον καταπόνηση στο σύστημα και τα φαινόμενα ευτροφισμού είναι αρκετά συχνά στην περιοχή (Koutsodendrīs *et al.* 2015). Συνεπώς δεν αποκλείεται μια τέτοια εισροή θρεπτικών, η οποία θα επέτρεπε την ταχεία επικράτηση των μικρού μεγέθους ευκαιριακών ομάδων του φυτοπλαγκτού.

Επίσης, άξια αναφοράς είναι η ισοκατανομή (evenness) που φαίνεται να παρουσιάζει ο σταθμός των αλυκών (M2) στα διαγράμματα της Εικόνας 30, σε αντίθεση με το αναμενόμενο, δεδομένου ότι οι υπεράλμυρες συναθροίσεις συνήθως κυριαρχούνται



Εικόνα 30. Εποχική κατανομή δεικτών ποικιλότητας για τους σταθμούς δειγματοληψίας βάσει δεδομένων αφθονίας από τα μονιμοποιημένα περιβαλλοντικά δείγματα.

από ένα ή λίγα είδη (συνήθως το είδος *D. salina*). Η ισοκατανομή αυτή πιθανώς οφείλεται στον αρκετά μικρό αριθμό ατόμων στα δείγματα αυτά, ο οποίος εισάγει σφάλμα (bias) στην ανάλυση και μπορεί να οδηγήσει σε επισφαλή συμπεράσματα.

Στο Παράρτημα 4 παρατίθενται ενδεικτικά και τα αντίστοιχα διαγράμματα κατανομής των αβιοτικών παραμέτρων και της σύνθεσης των φυκο-κοινωνιών για τις δειγματοληψίες στις λιμνοθάλασσες της Ηπείρου, συμπεριλαμβανομένων και των λιμνοθαλασσών Ροδιά και Βατάτσα από τις οποίες προέρχονται ορισμένα εκ των μελετηθέντων στελεχών.

Πίνακας 4. Κατάλογος επιθυμητών προς απομόνωση ταξινομικών ομάδων (οργανισμοί-στόχοι) και η παρουσία τους στους σταθμούς δειγματοληψίας. (Παρατίθενται μόνο οι ομάδες που παρατηρήθηκαν έστω και σε ένα δείγμα.

Γένος /Είδος	Σταθμός δειγματοληψίας			
	A	M1	M2	M3
ΧΛΩΡΟΦΥΤΑ				
<i>Dunaliella</i> spp.	*	*	***	**
<i>Dunaliella salina</i>	-	*	****	*
<i>Tetraselmis</i> spp.	*	**	**	***
<i>Chlorella</i> sp./ <i>Nannochloropsis</i> sp. ¹	****	*	*	***
ΔΙΑΤΟΜΑ				
<i>Chaetoceros</i> sp.	-	-	-	*
ΔΙΝΟΜΑΣΤΙΓΩΤΑ				
<i>Amphidinium</i> sp.	-	-	-	**
<i>Prorocentrum</i> sp.	-	-	-	*
ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΑ				
<i>Arthrospira</i> spp./ <i>Spirulina</i> spp. ²	***	***	*	**

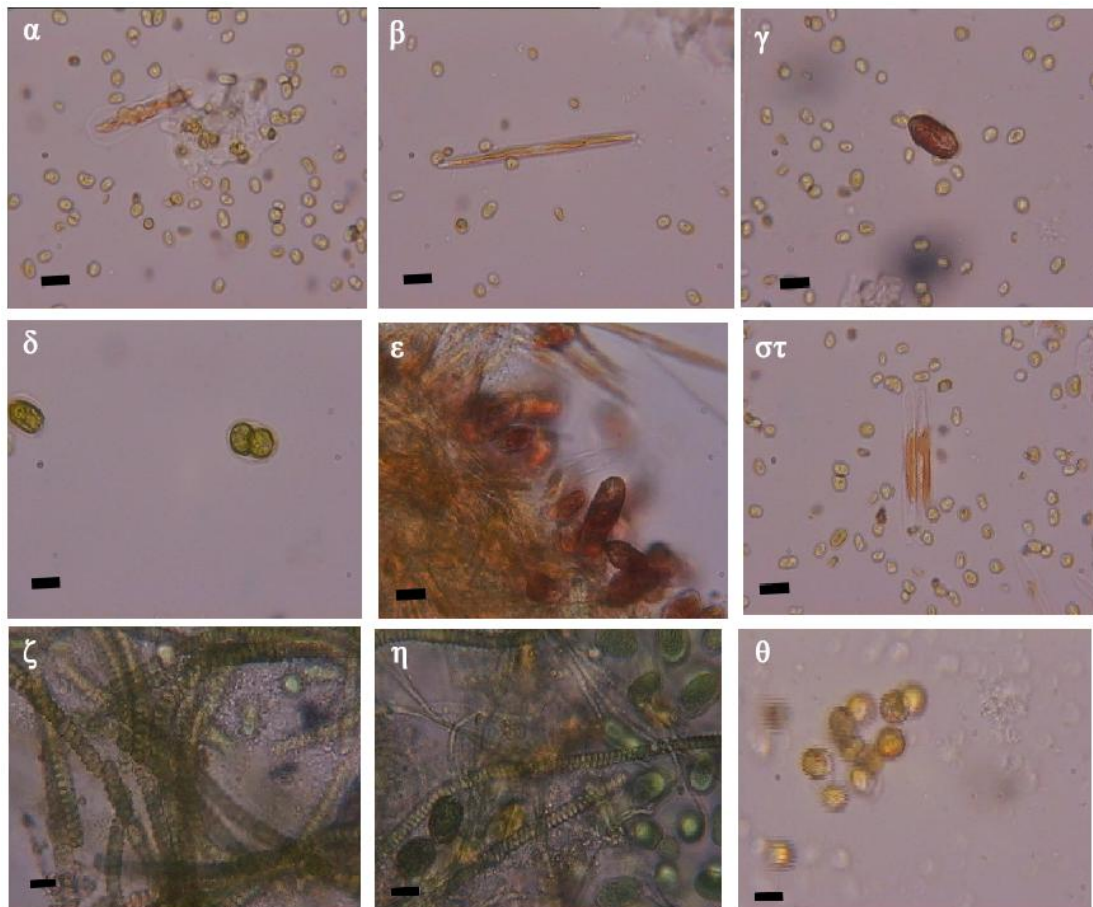
- απουσία, * χαμηλή αφθονία, ** μέτρια αφθονία, *** υψηλή αφθονία, **** επικράτηση

¹ Η διάκριση των δύο γενών δεν είναι δυνατή σε οπτικό μικροσκόπιο. Καταγράφονται ως "κοκκοειδή χλωροφύκη" (coccoid green algae)

² Η διάκριση μεταξύ των δύο ονομασιών είναι ασαφής, συνεπώς αναφερόμαστε σε αντιπροσώπους αμφοτέρων των γενών.

3.2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΑΝΘΙΣΕΩΝ

Στην Εικόνα 31 παρουσιάζονται μερικές από τις φυσικές ανθίσεις (Natural Algal Blooms, NAB) που προέκυψαν από την καλλιέργεια των δειγμάτων στο εργαστήριο. Όπως και στα φυσικά δείγματα, σε όλες τις ανθίσεις παρατηρήθηκαν εκπρόσωποι των Διατόμων, αλλά ορισμένα από αυτά εξαφανίστηκαν από την καλλιέργεια μετά από μερικές ημέρες. Ωστόσο, στις NAB που προήλθαν από δείγματα με χαμηλότερη αλατότητα, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα καλλιέργειας αναπτύχθηκαν ετερότροφοι οργανισμοί όπως ζωοπλαγκτικοί και μικρά μαστιγωτά (Εικόνα 32β). Οι οργανισμοί αυτοί ενδεχομένως διήλθαν παρά τη διήθηση με πλαγκτικό δίκτυο, εξ αιτίας



Εικόνα 31. Φυσικές ανθίσεις φυκών (Natural Algal Blooms, NAB), που προέκυψαν από την καλλιέργεια των φυσικών δειγμάτων, στο εργαστήριο.

α,β,γ,ε,στ (M3): Παρατηρούνται χλωροφύκη, διάτομα και κρυπτοφύκη,

δ, θ (M2, αλυκές): Παρατηρούνται χλωροφύκη και απτοφύκη.

ζ-η (A): Παρατηρούνται χλωροφύκη, κυανοβακτήρια και διάτομα.

Κλίμακα: 10 μm

(Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούντσιου)

του μικρού τους μεγέθους (τα ετερότροφα μαστιγωτά που τρέφονται με μικρά κοκκοειδή χλωροφύκη έχουν το μέγεθος ενός Κρυπτοφύκου, ~15-20 μm) ή λόγω του μικρού μεγέθους των αυγών τους (για το ζωοπλακτόν). Επιπλέον, τα δείγματα χαμηλής αλατότητας περιέχουν ζωικούς οργανισμούς σε μεγαλύτερη πυκνότητα διότι η υψηλή αλατότητα δεν ευνοεί την ανάπτυξη των περισσότερων ζωικών οργανισμών. Στις ανθίσεις αυτές (NAB), μετά από τη θήρευση της πλειονότητας των άλλων ομάδων, συνήθως επικρατούν τα Διάτομα (Εικόνα 32). Πολλές από τις ομάδες που εμφανίστηκαν στα φυσικά δείγματα δεν παρατηρήθηκαν στις NAB. Για παράδειγμα, τα Δινομαστιγωτά, τα οποία δεν αναπτύχθηκαν σε καμία άνθιση, σε αντίθεση με τα Κυανοβακτήρια, τα οποία αναπτύχθηκαν σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμη και σε καλλιέργειες προερχόμενες από δείγματα όπου δεν είχαν προηγουμένως παρατηρηθεί (Εικόνα 33α). Επίσης, σε ορισμένες καλλιέργειες παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη ανάπτυξη χρυσοφυκών, τα οποία δεν είχαν προηγουμένως παρατηρηθεί στα φυσικά δείγματα (Εικόνα 33β).



Εικόνα 32. α) Ανάπτυξη καλλιέργειας από δείγμα του σταθμού M1 (1η εβδομάδα), β) εμφάνιση ζωοπλακκτικών οργανισμών (2η εβδομάδα), γ) εικόνα της ίδιας καλλιέργειας μετά από 2 εβδομάδες (4η εβδομάδα), όπου έχουν επικρατήσει τα Διάτομα.

Κλίμακα: 10 μm

(Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρόντσιου)

Το γένος *Tetraselmis* παρατηρήθηκε σε ανθίσεις προερχόμενες από όλους τους σταθμούς με μεγαλύτερη σχετική αφθονία στους σταθμούς του Μεσολογγίου M2 (αλυκή) και M3 (πλησίον της θάλασσας). Σε ορισμένες περιπτώσεις το γένος αυτό επικράτησε στους εκεί πληθυσμούς, με αποτέλεσμα η απομόνωση των στελεχών του να είναι σχετικά εύκολη. Το γένος *Dunaliella* παρατηρήθηκε με σημαντική σχετική αφθονία στις εαρινές και θερινές δειγματοληψίες στον σταθμό της αλυκής (M2) καθώς και στον σταθμό M3 πλησίον της θάλασσας, ενώ δεν εμφανίστηκε στα δείγματα των “υφάλμυρων” σταθμών (A, M1). Κύτταρα που θεωρήθηκαν ως πιθανοί αντιπρόσωποι του είδους *D. salina* παρατηρήθηκαν κυρίως στα δείγματα της αλυκής, αλλά δεν επικράτησαν στους εκεί πληθυσμούς σε εργαστηριακές συνθήκες. Σε αρκετές

περιπτώσεις, η αυξημένη ανάπτυξη Κυανοβακτηρίων στις καλλιέργειες είχε ως αποτέλεσμα τη δραστική μείωση της αφθονίας των Χλωροφυκών σε αυτές.



Εικόνα 33. α) Ανάπτυξη κυανοβακτηρίων σε θερινό δείγμα του σταθμού M2 (αλυκή). β) Ανάπτυξη χρυσοφυκών σε εαρινό δείγμα του σταθμού M1 (υφάλμυρος).
Κλίμακα: 10 μm
(Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούντσιου)

3.3. ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

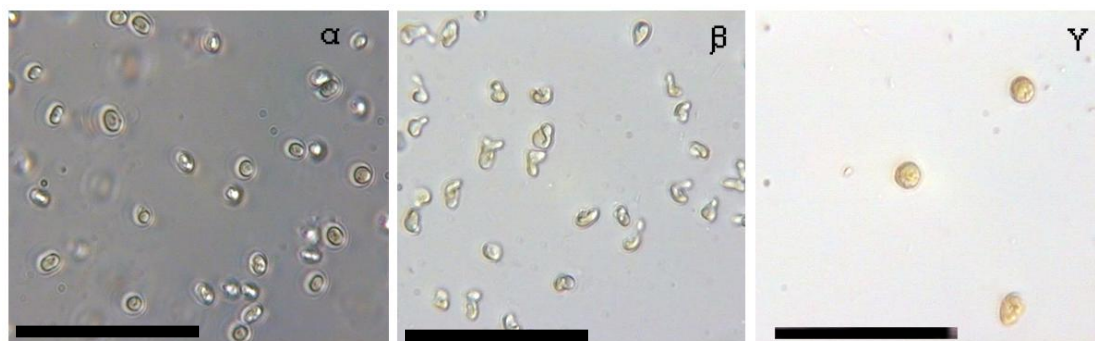
3.3.1. Επιλογή Στελεχών

Τα στελέχη που επελέγησαν προς απομόνωση ήταν τα ανήκοντα στα επιθυμητά γένη, όπως αυτά αναφέρονται στον Πίνακα 4. Ωστόσο μετά από καλλιέργεια στο εργαστήριο, αξιολογήθηκε επιπλέον η δυνατότητα ανάπτυξης αυτών σε συνθήκες εκτός του φυσικού περιβάλλοντος. Οι κύριοι στόχοι της διαδικασίας απομόνωσης λοιπόν, ήταν τα γένη *Dunaliella*, με έμφαση στο είδος *D. salina*, το γένος *Tetraselmis*, καθώς και τα κοκκοειδή πράσινα φύκη τα οποία πιθανώς ανήκουν σε κάποιο από τα γένη *Chlorella*, *Nannochloropsis* ή *Ellipsoidion* Pascher 1938 και δεν διακρίνονται μεταξύ τους στο οπτικό μικροσκόπιο. Διάτομα του γένους *Chaetoceros* δεν παρατηρήθηκαν σε καμία άνθιση. Επιπλέον, έγινε προσπάθεια απομόνωσης ενός Κρυπτοφύκου του γένους *Rhodomonas* G. Karsten 1898 [πιθανότητα του είδους *R. salina* (Wislouch) D.R.A.Hill & R.Wetherbee 1989] (Εικόνα 31γ) καθώς και ενός Κυανοβακτηρίου του γένους *Spirulina* (*Arthrospira*) που εμφάνισε έντονη ελίκωση των κυττάρων του (Εικόνα 31ζ-η), αλλά δυστυχώς η απομόνωση αυτών δεν ήταν επιτυχής. Το Κρυπτοφύκος εξαφανίστηκε από τις ανθίσεις μετά από μερικές εβδομάδες, ενώ οι

καλλιέργειες του Κυανοβακτηρίου επιμολύνθηκαν με άλλα φύκη έως ότου κατέρρευσαν.

Στα πλαίσια της Διατριβής αυτής απομονώθηκαν 9 νέα στελέχη από δείγματα του λιμνοθαλασσίου συστήματος Μεσολογίου-Αιτωλικού. Συγκεκριμένα, 4 (τέσσερα) στελέχη απομονώθηκαν από τα δείγματα του σταθμού του Αιτωλικού (Α), και 5 (πέντε) στελέχη απομονώθηκαν από τους σταθμούς του Μεσολογίου. Από τα τελευταία, 4 (τέσσερα) στελέχη απομονώθηκαν από δείγματα του σταθμού της αλυκής (Μ2) και ως εκ τούτου καλλιεργήθηκαν και σε αλατότητες υψηλότερες από τις μετρηθείσες στο πεδίο. Συγκεκριμένα καλλιεργήθηκαν σε αλατότητα 140‰, η οποία αποτελούσε τη μέση τιμή αλατότητας που μετρήθηκε στην περιοχή της αλυκής κατά την προκαταρκτική δειγματοληψία. Τα στελέχη αυτά επιβίωσαν σε υψηλή αλατότητα ακόμη και όταν δεν προήρχοντο από υπεράλμυρα δείγματα του σταθμού. Η προσπάθεια απομόνωσης κατέστη αρκετά δυσχερής εξ αιτίας της αυξημένης ανάπτυξης Κυανοβακτηρίων, όπως προαναφέρθηκε, ορισμένα εκ των οποίων επιβίωσαν και σε καλλιέργειες υψηλής αλατότητας. Ωστόσο, μετά από μερικές εβδομάδες καλλιέργειας στα 140‰, τα κύτταρα των στελεχών του γένους *Dunaliella* σχεδόν επικράτησαν στις καλλιέργειες, γεγονός που διευκόλυνε την προσπάθεια απομόνωσης αυτών.

Από στελέχη αυτά, δύο (2) ταξινομήθηκαν σε επίπεδο είδους και τέσσερα (4) σε επίπεδο γένους. Στη συνέχεια, τα απομονωθέντα στελέχη κατατέθηκαν στην Τράπεζα AthU-AI ώστε να είναι διαθέσιμα για περαιτέρω μελέτη (Πίνακας 5). Τα νεο-απομονωθέντα στελέχη που δεν έχουν ταξινομηθεί (AthU-AI Aet 1-3) απεικονίζονται στην Εικόνα 34. Ακολουθεί περιγραφή τεσσάρων νέων στελεχών (2 στελέχη *Tetraselmis* sp. και 2 στελέχη *Dunaliella* sp.), ενώ τα στελέχη *Dunaliella* cf. *salina* περιγράφονται στο Κεφάλαιο 3.5.2.



Εικόνα 34. Κοκκοειδή μικροφύκη που απομονώθηκαν από το σύστημα Μεσολογίου-Αιτωλικού και δεν έχουν ταυτοποιηθεί, α) Aet 1, β) Aet 2, γ) Aet 3. Κλίμακα: 10 μm (Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούντσιου)

Πίνακας 5. Στελέχη που απομονώθηκαν στα πλαίσια της διατριβής (δειγματοληπτική περίοδος 2015-2016) και κατατέθηκαν στην Τράπεζα AthU-AI

Κωδικός στελέχους	Προέλευση	Γένος	Ενδιαίτημα
AthU-AI Aet 1	Αιτωλικό, Δ. Ελλάδα (legit X. Chantzistrountsiou 2016)	Cocoid green algae sp1	Μεταβατικό, θαλάσσιο (25‰)
AthU-AI R Aet 2	Αιτωλικό, Δ. Ελλάδα (legit X. Chantzistrountsiou 2016)	Cocoid green algae sp2	Μεταβατικό, θαλάσσιο (40‰)
AthU-AI Aet 3	Αιτωλικό, Δ. Ελλάδα (legit X. Chantzistrountsiou 2016)	Cocoid green algae sp3	Μεταβατικό, θαλάσσιο (40‰)
AthU-AI Aet 4	Αιτωλικό, Δ. Ελλάδα (legit X. Chantzistrountsiou 2016)	<i>Tetraselmis</i> sp2	Μεταβατικό, θαλάσσιο (40‰)
AthU-AI Mes 4	Μεσολόγγι, Δ. Ελλάδα (legit X. Chantzistrountsiou 2016)	<i>Tetraselmis</i> sp1	Μεταβατικό, θαλάσσιο (40‰)
AthU-AI Dun 35	Μεσολόγγι, Δ. Ελλάδα (legit X. Chantzistrountsiou 2016)	<i>Dunaliella</i> cf. <i>salina</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 36	Μεσολόγγι, Δ. Ελλάδα (legit X. Chantzistrountsiou 2016)	<i>Dunaliella</i> cf. <i>salina</i>	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 37	Μεσολόγγι, Δ. Ελλάδα (legit X. Chantzistrountsiou 2016)	<i>Dunaliella</i> sp2	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)
AthU-AI Dun 38	Μεσολόγγι, Δ. Ελλάδα (legit X. Chantzistrountsiou 2016)	<i>Dunaliella</i> sp3	Υπεράλμυρο, αλυκές (>60‰)

3.3.2. Περιγραφή απομονωθέντων στελεχών

1. Κωδικός στελέχους: AthU-AI Mes 4 (Tetr Mes 4) (Εικόνα 35)

Ταξινόμηση: Φύλο Chlorophyta

Κλάση Chlorodendrophyceae

Τάξη Chlorodendrales

Οικογένειες Chlorodendraceae

Γένος *Tetraselmis*

Ενδιαίτημα/Προέλευση: Θαλάσσιο, λιμνοθάλασσα Μεσολογγίου

Έτος απομόνωσης: 2017

Απομονώθηκε από: Ξανθή Χαντζηστρούντσιου

Αλατότητα συντήρησης: 40‰

Μορφολογική περιγραφή: Σχήμα ωοειδές έως σφαιρικό, ελαφρώς συμπιεσμένο, κύτταρα ενίοτε επιμήκη (συνήθως μετά από διχοτόμηση). Μήκος κυττάρων 8-12μm, πλάτος 5-10μm (κατά μέσο όρο). Εμφανής πρόσθια αύλακα από την οποία φύονται τέσσερα ισομήκη μαστίγια μήκους περίπου ίδιου με αυτό του κυττάρου. Ένα εμφανές και ευμέγεθες πυρηνοειδές σχήματος πεταλοειδούς (U) όταν παρατηρείται στο οπτικό μικροσκόπιο. Το πυρηνοειδές εντοπίζεται εντός του χλωροπλάστη στο οπίσθιο τμήμα του κυττάρου. Οφθαλμική κηλίδα ευδιάκριτη, εντοπίζεται στην περιφέρεια του κυττάρου, πλευρικώς και στο οπόσθιο τμήμα του κυττάρου, πλησίον του πυρηνοειδούς. Επιμήκης αύλακα που διασχίζει το μεγαλύτερο τμήμα του κυττάρου εκτεινόμενη από τη μαστιγιακή αύλακα έως το πυρηνοειδές, εμφανής όταν τα κύτταρα παρατηρούνται σε νωτιαίο (dorsal) προσανατολισμό. Αναπαραγωγή με διχοτόμηση, συνήθως τα 2 (δύο) προκύπτοντα κύτταρα αναπτύσσονται εντός της ίδιας θήκης με όμοιο ή αντίστροφο προσανατολισμό. Τα μαστίγια των θυγατρικών κυττάρων αναπτύσσονται εντός της θήκης προτού αυτά διαχωριστούν. Σχηματισμός παλμελλοειδών κυττάρων (palmellae) δεν παρατηρήθηκε. Χρωματισμός κυττάρου και καλλιέργειας πράσινος έως κιτρινωπός.

2. Κωδικός στελέχους: AthU-AI Aet 4 (Tetr Aet 4) (Εικόνα 35)

Ταξινόμηση: Φύλο Chlorophyta

Κλάση Chlorodendrophyceae

Τάξη Chlorodendrales

Οικογένειες Chlorodendraceae

Γένος *Tetraselmis*

Ενδιαίτημα/Προέλευση: Θαλάσσιο, λιμνοθάλασσα Αιτωλικού

Έτος απομόνωσης: 2016

Απομονώθηκε από: Ξανθή Χαντζηστρούντσιου

Αλατότητα συντήρησης: 40‰

Μορφολογική περιγραφή: Σχήμα ελλειψοειδές έως ωοειδές, ελαφρώς συμπιεσμένο, ενίοτε καρδιόσχημο. Μήκος κυττάρων 12,5-17μm, πλάτος 8-15,5μm (κατά μέσο όρο). Εμφανής πρόσθια αύλακα από την οποία φύονται τέσσερα ισομήκη μαστίγια μήκους περίπου ίδιου με αυτό του κυττάρου. Ένα εμφανές και ευμέγεθες πυρηνοειδές σφαιρικού σχήματος όταν παρατηρείται στο οπτικό μικροσκόπιο. Το πυρηνοειδές εντοπίζεται εντός του χλωροπλάστη στο κεντρικό τμήμα του κυττάρου. Οφθαλμική κηλίδα μικρού μεγέθους αλλά ευδιάκριτη, εντοπιζόμενη στην περιφέρεια του κυττάρου, πλευρικός και στο κεντρικό τμήμα του κυττάρου, πλησίον του πυρηνοειδούς. Αναπαραγωγή με διχοτόμηση, συνήθως περισσότερα των 2 θυγατρικών κυττάρων (ενίοτε 4) υπο-αναπτύσσονται εντός της ίδιας θήκης με όμοιο ή αντίστροφο προσανατολισμό. Τα μαστίγια των θυγατρικών κυττάρων αναπτύσσονται εντός της θήκης προτού αυτά διαχωριστούν. Σχηματισμός παλμελλοειδών κυττάρων (palmellae) δεν παρατηρήθηκε, αλλά παρατηρήθηκε συσώρευση τοιχωματικού υλικού γύρω από τα κύτταρα σε ορισμένες περιπτώσεις. Χρωματισμός κυττάρου και καλλιέργειας έντονος πράσινος.

3. Κωδικός στελέχους: AthU-AI Mes 37 (Dun 37) (Εικόνα 36)

Ταξινόμηση: Φύλο Chlorophyta

Κλάση Chlorophyceae

Τάξη Chlamydomonadales

Οικογένεια Dunaliellaceae

Γένος *Dunaliella*

Ενδιαίτημα/Προέλευση: Αλόφιλο, λιμνοθάλασσα Μεσολογίου, περιοχή αλυκών

Έτος απομόνωσης: 2016

Απομονώθηκε από: Ξανθή Χαντζηστρούντσιου

Αλατότητα συντήρησης: 140‰

Μορφολογική περιγραφή: Σχήμα ελλειψοειδές έως ωοειδές, ενίοτε απιοειδές (pyriform). Μήκος κυττάρων 9,5-13μm, πλάτος 5-8μm (κατά μέσο όρο). Οπίσθιο άκρο αμβλύ, πρόσθιο άκρο συνήθως ελαφρώς οξύληκτο. Κύτταρα με αμφίπλευρη συμμετρία. Από το πρόσθιο άκρο φύονται δύο (2) ισομήκη ομοδύναμα μαστίγια, μήκους ελαφρώς μεγαλύτερου από αυτό του κυττάρου. Χλωροπλάστης ευμεγέθους που καταλαμβάνει περίπου το 1/3 του κυττάρου, συμπαγής στο οπίσθιο τμήμα, με 2 (δύο) λοβούς στο εμπρόσθιο τμήμα. Ένα ευμέγεθες, ευδιάκριτο πυρηνοειδές εντοπίζεται εντός του χλωροπλάστη σε κεντρική έως μετα-κεντρική θέση. Οφθαλμική κηλίδα ορατή, ενίοτε διάχυτη με τη μορφή λιπαρών σταγονιδίων, που εντοπίζεται στην περιφέρεια του κυττάρου, στο πρόσθιο έως κεντρικό τμήμα του χλωροπλάστη. Κύτταρα σε αναπαραγωγή και ακίνητες μορφές (παλμέλλες ή απλανοσπόρια) δεν έχουν παρατηρηθεί. Αυξημένη παραγωγή καρωτενοειδών δεν παρατηρείται ακόμη και σε υψηλές αλατότητες. Χρωματισμός κυττάρων και καλλιέργειας πράσινος. Αλόφιλο, ευδοκιμεί σε αλατότητες 120-140‰ αν και επιβιώνει και σε χαμηλότερη αλατότητα.

4. Κωδικός στελέχους: AthU-AI Mes 38 (Dun 38) (Εικόνα 36)

Ταξινόμηση: Φύλο Chlorophyta

Κλάση Chlorophyceae

Τάξη Chlamydomonadales

Οικογένεια Dunaliellaceae

Γένος *Dunaliella*

Ενδιαίτημα/Προέλευση: Αλόφιλο, λιμνοθάλασσα Μεσολογίου, περιοχή αλυκών

Έτος απομόνωσης: 2017

Απομονώθηκε από: Ξανθή Χαντζηστρούντσιου

Αλατότητα συντήρησης: 100‰

Μορφολογική περιγραφή: Σχήμα ωοειδές έως σφαιρικό. Μήκος κυττάρων 8-12,5μm, πλάτος 5-8μm (κατά μέσο όρο). Οπίσθιο άκρο αμβλύ, πρόσθιο άκρο συνήθως αμβλύ, ενίοτε ελαφρώς οξύληκτο. Κύτταρα με αμφίπλευρη συμμετρία. Από το πρόσθιο άκρο φύονται δύο (2) ισομήκη ομοδύναμα μαστίγια, μήκους ελαφρώς μεγαλύτερου από αυτό του κυττάρου. Χλωροπλάστης ευμεγέθης που καταλαμβάνει το μεγαλύτερο τμήμα του κυττάρου, συμπαγής, με 2 (δύο) καλά ανεπτυγμένους λοβούς στο εμπρόσθιο τμήμα. Το πυρηνοειδές εντοπίζεται εντός του χλωροπλάστη σε μετα-κεντρική θέση, και δεν είναι πάντοτε ευδιάκριτο. Οφθαλμική κηλίδα μάλλον διάχυτη και όχι ευδιάκριτη. Δεν έχουν παρατηρηθεί κύτταρα σε αναπαραγωγή και ακίνητες μορφές (παλμέλλες ή απλανοσπόρια). Αυξημένη παραγωγή καρωτενοειδών δεν παρατηρείται ακόμη και σε υψηλές αλατότητες. Χρωματισμός κυττάρων και καλλιέργειας έντονος πράσινος. Αλόφιλο, ευδοκιμεί σε αλατότητες 100-140‰ αν και επιβιώνει και σε χαμηλότερη αλατότητα.

MESSOLONGHI 4



ΑΙΤΩΛΙΚΟ 4



Εικόνα 35. Στελέχη του γένους *Tetraselmis* απομονωθέντα από δείγματα προερχόμενα από το λιμνοθαλάσσιο σύστημα Μεσολογγίου-Αιτωλικού. Τα βέλη δείχνουν τα βασικά γνωρίσματα του κυττάρου (μαστιγιακή αύλακα, πυρηνοειδές, οφθαλμική κηλίδα, θήκη, μαστίγια).

Κλίμακα: 5 μm

(Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούντσιου)

MESSOLONGHI 37



MESSOLONGHI 38



Εικόνα 36. Στελέχη του γένους *Dunaliella* απομονωθέντα από δείγματα προερχόμενα από το λιμνοθαλάσσιο σύστημα Μεσολογγίου-Αιτωλικού. Τα βέλη δείχνουν τα βασικά γνωρίσματα του κυττάρου (μαστίγια, πυρηνοειδές, οφθαλμική κηλίδα).

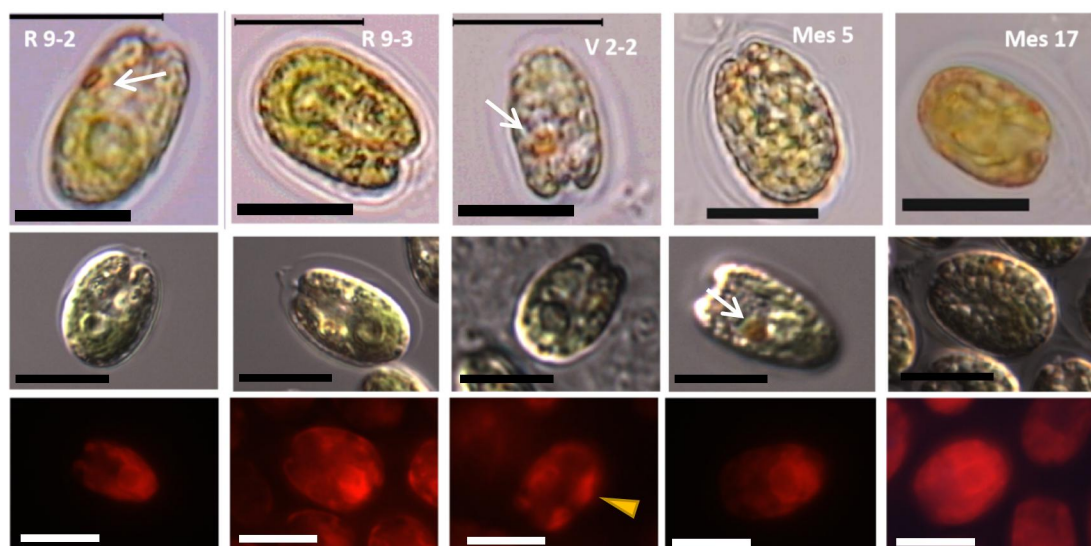
Κλίμακα: 10 μm

(Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούντσιου)

3.4. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens*

3.4.1. Μελετηθέντα Στελέχη

Πέντε (5) στελέχη του γένους *Tetraselmis*, κατατεθειμένα στην Τράπεζα AthU-AI, επελέγησαν ώστε να μελετηθούν με τη χρήση μιας πολυπαραγοντικής προσέγγισης, η οποία περιλαμβάνει κλασική ταξινόμηση, μοριακή φυλογενετική ανάλυση και βιοχημική ανάλυση λιπαρών οξέων. Τα επιλεγμένα στελέχη ήταν τα ακόλουθα: AthU-AI R 9-2, R 9-3 (Ροδιά), AthU-AI Mes 5, Mes 17 (Μεσολόγγι) και AthU-AI V 2-2 (Βατάτσα). Η επιλογή των στελεχών έγινε βάσει της ταξινομικής τους συγγένειας και των διαφοροποιήσεων που παρουσιάζουν σε ενδο-ειδικό επίπεδο.



Εικόνα 37. Τα κύτταρα των στελεχών AthU-AI *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* όπως παρατηρούνται στο φωτονικό μικροσκόπιο (επάνω σειρά), με τη χρήση συστήματος Nomarski (μεσαία σειρά) και με μικροσκοπία επιφθορισμού (κάτω σειρά). Λευκά βέλη: Οφθαλμική κηλίδα, Κεφαλή βέλους: λοβοί του χλωροπλάστη στο πρόσθιο τμήμα του κυττάρου.

Κλίμακα: 10 μ m

(Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούντσιου, Π. Λιβανός, Ν. Δολαψάκης)

3.4.2. Κλασική Ταξινόμηση

Βάσει παρατηρήσεων επί ζωντανών και μονιμοποιημένων κυττάρων σε διάφορες φάσεις της καλλιέργειας, με φωτονικό μικροσκόπιο, με σύστημα Nomarski, με μικροσκοπία επιφθορισμού (Εικόνες 37, 40 και 42) αλλά και με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Εικόνες 38-39), όλα τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *Tetraselmis verrucosa* Butcher 1959. Σύμφωνα με τη μακροσκοπική εικόνα των

καλλιιεργειών, τα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως αντιπρόσωποι της μορφής *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* (Butcher) Hori, Norris & Chihara 1983. Στις Εικόνες 38-39 απεικονίζεται η λεπτή δομή του κυττάρου. Η αναλυτική περιγραφή του κάθε στελέχους έχει προηγηθεί (Χαντζηστρουόντσιου 2014). Παρατίθεται εδώ η περιγραφή των κοινών τους γνωρισμάτων, η οποία οδήγησε στην ταξινομική τους ταυτοποίηση:

Όλα τα στελέχη εμφανίζουν τα τυπικά μορφολογικά γνωρίσματα του γένους *Tetraselmis*. Το σχήμα των κυττάρων είναι ωοειδές έως ελλειψοειδές, πεπλατυσμένο, ενίοτε ελαφρώς οξύληκτο στο οπίσθιο μέρος, ενίοτε καρδιόσχημο (cordiform). Τα κινητά κύτταρα έχουν μήκος 5–15 μm και πλάτος 3–10,5 μm, περιβάλλονται δε από κυτταρικό τοίχωμα το οποίο αποτελείται από δύο στιβάδες, ένα πολύ λεπτό εξωτερικό τοίχωμα (“θήκη”) και ένα πιο παχύ, ηλεκτρονιόπυκνο εσωτερικό στρώμα (Εικόνα 38a). Τέσσερα (4) ισομήκη και ελαφρώς βραχύτερα του μήκους του κυττάρου (περίπου 3/4) μαστίγια εκφύονται σταυροειδώς (cross-shaped) από τη βάση της χαρακτηριστικής για το γένος πρόσθιας κοιλότητας (Εικόνα 39a). Η πρόσθια κοιλότητα (“μαστιγιακή εγκόλπωση”) είναι παρούσα σε όλα τα στελέχη (Εικόνα 38b) και ορατή στο φωτονικό μικροσκόπιο. Τα μαστίγια φύονται από δύο παράλληλα -συνήθως- βασικά σωμάτια που συνδέονται τα καθένα με έναν ριζοπλάστη ο οποίος διασχίζει το κυτταρόπλασμα (Εικόνα 39c). Ο χλωροπλάστης είναι ευμεγέθης (συχνά καλύπτει το μεγαλύτερο τμήμα του κυττάρου) και συμπαγής στο οπίσθιο τμήμα, με 2 ή περισσότερους λοβούς στο πρόσθιο τμήμα (Εικόνα 37, φωτογραφίες επιφθορισμού), και περιέχει αρκετούς ευμεγέθεις αμυλοκόκκους (matrix starch grains), κυρτού ή/και αμφίκυρτου σχήματος (Εικόνα 38a). Η οφθαλμική κηλίδα δεν είναι πάντοτε ευδιάκριτη και τυπικά εντοπίζεται σε μετακεντρική θέση, πλησίον του πυρηνοειδούς και συχνά σε πλευρική θέση (Εικόνα 37, Εικόνα 39b). Τα κύτταρα φέρουν ένα ευμέγεθες, μετακεντρικό πυρηνοειδές σφαιρικού σχήματος (μπορεί να εμφανίζεται κυπελλοειδές -U- shaped- στο οπτικό μικροσκόπιο, Εικόνα 37), εντός του οποίου διεισδύει μια σωληνοειδής εγκόλπωση που περιέχει υλικό του πλαστιδίου και του πυρήνα (γνωρίσμα το οποίο αποτελεί διαγνωστικό κριτήριο για το είδος, Εικόνα 38c). Το πυρηνοειδές φέρει περίβλημα αμυλοκόκκων κυρτού σχήματος και διαχωρίζεται από το στρώμα του χλωροπλάστη μέσω ευδιάκριτης λωρίδας θυλακοειδών (Εικόνα 38a,c). Ο πυρήνας είναι ευμεγέθης και ακανόνιστου σχήματος και εντοπίζεται κάτω από τη μαστιγιακή συσκευή από την οποία και διαχωρίζεται μέσω δύο (2) δικτυοσωματίων (Εικόνα 38a) που εντοπίζονται εκατέρωθεν της μαστιγιακής συσκευής. Το εξωκυττάριο τμήμα της μαστιγιακής εγκόλπωσης είναι ουσιαστικά “γυμνό”, φέροντας ελάχιστες έως καθόλου μαστιγιακές τριχοειδείς απολήξεις (flagellar hairs) (Εικόνα 38b). Στα περισσότερα στελέχη εμφανίζεται έντονη κυστιδιακή δραστηριότητα κάτω από τη μαστιγιακή

συσσκευή (Εικόνα 39e) και γύρω από το βασικό σωματίο. Τα κυστίδια φαίνεται να σχετίζονται με έντονη δραστηριότητα του συμπλέγματος Golgi αφού συνδέονται άμεσα με τα δύο δικτυοσωμάτια (Εικόνα 39d) και πιθανώς μεταφέρουν τοιχωματικό υλικό (π.χ. οργανικές φολίδες) προς το εξωτερικό του κυττάρου (Εικόνα 39e). Σε ορισμένα στελέχη παρατηρήθηκε και η εμφάνιση αρκετά μεγάλου μεγέθους χυμοτοπίων (Εικόνα 39e), τα οποία ενδεχομένως σχετίζονται με έντονη μεταβολική δραστηριότητα.

Όλα τα στελέχη αναπαράγονται μονογονεϊκά (αγενώς) με διαμήκη διχοτόμηση (Εικόνα 40α). Τα θυγατρικά κύτταρα αναπτύσσονται εντός της μητρικής θήκης συνήθως με τον ίδιο προσανατολισμό (Εικόνα 40β-δ). Οι θυγατρικές θήκες σχηματίζονται επίσης εντός της μητρικής και εντός αυτών σχηματίζονται τα μαστίγια (Εικόνα 40δ). Τα κύτταρα μπορεί να παραμένουν με τα μαστίγια τους ανενεργά, ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Τελικά η θήκη αποβάλλεται και τα κύτταρα μετατρέπονται στις κινητές τους μορφές. Σε περίσσεια θρεπτικών, τα κύτταρα αποβάλλουν το παλιό τοιχωματικό υλικό καθώς αναπτύσσουν νέα θήκη. Το τοιχωματικό αυτό υλικό αποτίθεται ως “μίσχος” (stalk, Εικόνα 40ε-στ) και συχνά στις καλλιέργειες παρατηρείται συσσώρευση πολυσακχαρικού υλικού από τη διαδικασία αυτή (Εικόνα 40ζ). Όταν τα κύτταρα παραμένουν υπό κάποια μορφή καταπόνησης μπορεί να αποβάλουν τα μαστίγια, να δημιουργούν ένα σκληρό περίβλημα (το οποίο είναι διακριτό στο οπτικό μικροσκόπιο) και να καθίστανται σχεδόν σφαιρικά, με ταυτόχρονη αύξηση του μεγέθους τους, σχηματίζοντας έτσι παλμελλοειδή κύτταρα (palmellae, Εικόνα 40η-θ). Τα κύτταρα αυτά είναι αρκετά συνήθη σε γηραιότερες καλλιέργειες. Συχνά, πριν από τον σχηματισμό των παλμελλοειδών κυττάρων, τα κύτταρα αρχίζουν να συσσωρεύουν τοιχωματικό υλικό (παλαιότερες θήκες) συγκεντρικά (Εικόνα 40η) κάτι το οποίο χαρακτηρίζει το υπογένος *Prasinocladia* (Hori *et al.* 1983). Τα στελέχη της Ροδιάς (Athu-AI R 9-2, R 9-3) παρουσίασαν σημαντικά αυξημένη απόθεση τοιχωματικού υλικού τόσο σε μίσχους όσο και συγκεντρικά, κάτι που ενδεχομένως σχετίζεται με την έντονη κυστιδιακή δραστηριότητα όπως φαίνεται στις φωτογραφίες ΗΜΔ των στελεχών αυτών (Εικόνα 39e-f).

Τα στελέχη παρουσίασαν μια συσσώρευση ροδόχρωων-κιτρινέρυθρων κηλίδων, οι οποίες αναφέρονται ως “αιματόχρωμα” (συγκεντρώσεις σταγονιδίων καρωτενοειδών) στο εσωτερικό των κυττάρων τους (Εικόνα 41α). Επιπροσθέτως, το μέσον καλλιέργειας όλων των στελεχών παρουσίασε καστανέρυθρο έως ερυθρό χρωματισμό σε μακροσκοπική παρατήρηση (Εικόνα 41β-δ). Μετά από διήθηση της καλλιέργειας διαπιστώθηκε ότι ο χρωματισμός αυτός εν μέρει δεν οφείλεται στα ίδια τα κύτταρα (αφού τα κύτταρα που κατακρατήθηκαν στο φίλτρο είχαν πράσινο

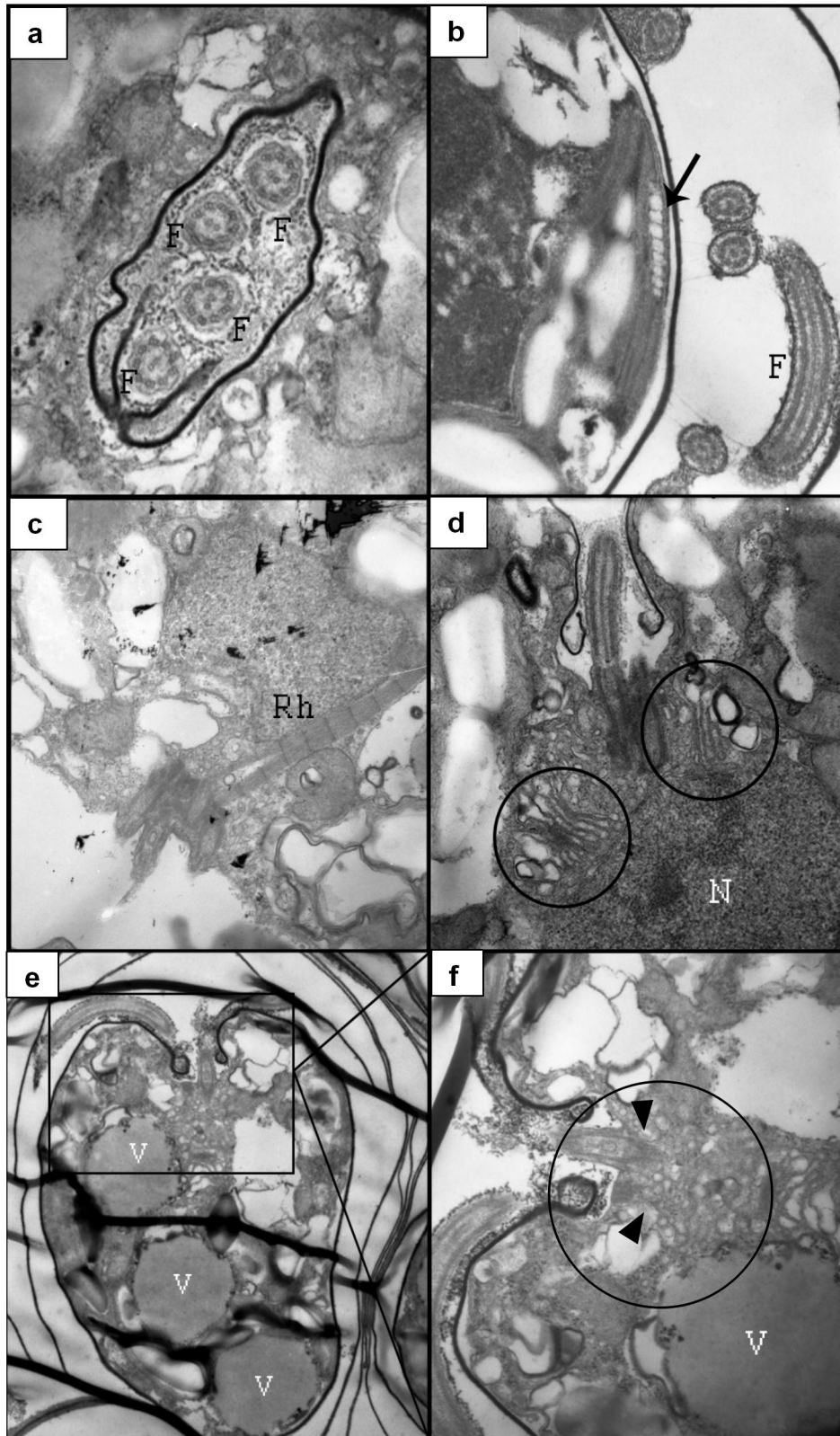
χρωματισμό) αλλά σε κάποιον μεταβολίτη (ή μεταβολίτες) που εκκρίνεται στο μέσον καλλιέργειας, αφού ο χρωματισμός παρέμενε στο διήθημα που ήταν ελεύθερο κυττάρων (Εικόνα 41στ). Τα στελέχη εμφάνισαν διαφορετικές αποχρώσεις στις καλλιέργειές τους. Τα στελέχη AthU-AI R 9-2 και R 9-3 παρουσίασαν σκούρο ερυθρό χρωματισμό, τα στελέχη AthU-AI Mes 5 και Mes 17 παρουσίασαν καστανό χρωματισμό και το στέλεχος AthU-AI V 2-2 ρόδινο χρωματισμό. Η μακροσκοπική εικόνα του τυπικού στελέχους (CCAP 66/6) ήταν πανομοιότυπη με την εικόνα των στελεχών της AthU-AI R 9-2 και R 9-3. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι καλλιέργειες των στελεχών *Tetraselmis* του Μεσολογγίου (Mes 5, Mes 17) αρχικά καλλιεργήθηκαν σε αλατότητα 60‰ (επειδή είχαν προέλθει από δείγματα των αλυκών Μεσολογγίου), ενώ στη συνέχεια εγκλιματίστηκαν σε αλατότητα 40‰, στην οποία καλλιεργούνται και όλα τα υπόλοιπα στελέχη *Tetraselmis* της Τράπεζας AthU-AI. Η αλλαγή του χρωματισμού στο μέσον καλλιέργειας από πράσινο σε καστανέρυθρο δεν παρατηρήθηκε εξ αρχής, παρά μόνον όταν τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε αλατότητα 40‰ (Εικόνα 41δ-ε).

Ορισμένα από τα κύτταρα του στελέχους Mes 5 έδειχναν να φέρουν περισσότερα του ενός πυρηνοειδή, όταν παρατηρήθηκαν με τη χρήση συστήματος Nomarski (Εικόνα 42), αλλά μετά από ενδελεχή παρατήρηση των λεπτών τομών των κυττάρων με ΗΜΔ, θεωρήθηκε ότι επρόκειτο για τεχνικό σφάλμα της μικροσκοπικής παρατήρησης (artifact).

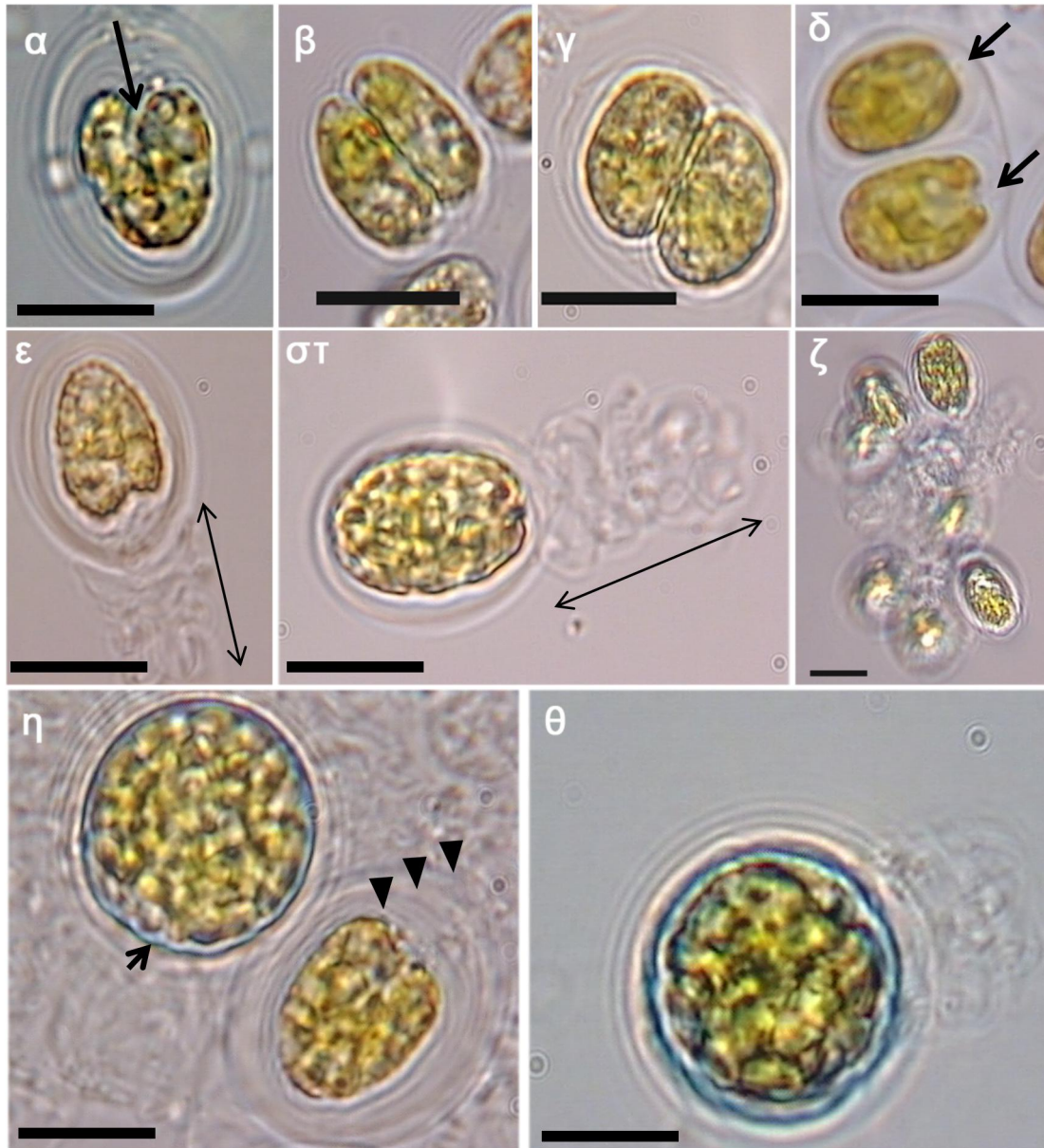
Τα βιομετρικά χαρακτηριστικά των κυττάρων των στελεχών εμφανίζονται στον Πίνακα 6 και αναλυτικά στο Παράρτημα 5. Σε όλες τις αντίστοιχες αναλύσεις ANOVA (Παράρτημα 5) υπολογίζεται $p < 0,01$. Συνεπώς η οποιαδήποτε διαφοροποίηση που προκύπτει μεταξύ των στελεχών είναι στατιστικώς σημαντική και αντικατοπτρίζει πραγματικές διαφορές. Όπως φαίνεται από τον έλεγχο πραγματικής σημαντικότητας (Tukey-test) όπου φαίνονται οι διαφορές των στελεχών ανά ζεύγη, σε όλες τις περιπτώσεις η διαφοροποίηση αφορά στο στέλεχος V 2-2, το οποίο εμφανίζει μικρότερες διαστάσεις από τα υπόλοιπα στελέχη. Επιπλέον, εμφανίζεται διαφοροποίηση όσον αφορά στο πλάτος ($p < 0,05$) και μεταξύ των στελεχών R 9-3 και Mes 5. Τα στελέχη της Ροδιάς (AthU-AI R 9-2, R 9-3) και του Μεσολογγίου (AthU-AI Mes 5, Mes 17) δεν φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους όσον αφορά στο μέγεθος πλην μιας διαφοράς μεταξύ των στελεχών AthU-AI R 9-3 και Mes 5 όσον αφορά στο πλάτος ($p < 0,05$). Ωστόσο το στέλεχος AthU-AI V 2-2 (Βατάτσα) διαφέρει στατιστικώς σημαντικά ($p < 0,01$) από τα υπόλοιπα και για τις τρεις διαστάσεις οι οποίες εκτιμήθηκαν (μήκος, πλάτος και βιο-όγκος κυττάρου) και οι μέσες τιμές των διαστάσεων αυτών είναι σαφώς μικρότερες σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη.



Εικόνα 38. Η λεπτή δομή του κυττάρου της μορφής *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* (Στέλεχος V 2-2), όπως παρατηρείται με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (ΗΜΔ). α) Ολόκληρο κύτταρο, β) λεπτομέρειες της μαστιγιακής εγκόλπωσης, γ) λεπτομέρεια του οπίσθιου τμήματος του κυττάρου και του πυρηνοειδούς. F: μαστίγια σε εγκάρσια και διαμήκη τομή, C: χλωροπλάστης, Py: πυρήνας, FP: μαστιγιακή εγκόλπωση, Th: Θυλακοειδές που παρεμβάλλεται μεταξύ χλωροπλάστη και πυρηνοειδούς, Cst: αμυλόκοκκος χλωροπλάστη, CW: ηλεκτρονιοπυκνο κυτταρικό τοίχωμα (θήκη). μαύρο βέλος: λεπτή εξωτερική "θήκη", Cst: αμυλόκοκκος. (Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρουγγίου, Χ. Κατσαρός)



Εικόνα 39. Στοιχεία της λεπτής δομής της μορφής *T. verrucosa* f. *rubens*. a) σταυροειδής διάταξη των 4 μαστιγίων σε εγκάρσια τομή όπου είναι εμφανής η διάταξη 9+2 των μικροσωληνίσκων, F: μαστίγιο b) Βέλος: οφθαλμική κηλίδα στην περιφέρεια του κυττάρου, c) πρόσθιο τμήμα του κυττάρου, Rh: ριζοπλάστης, d) κύκλοι: δικτυοσωμάτια (σύμπλεγμα Golgi), N: πυρήνας, e-f) ολόκληρο κύτταρο και λεπτομέρεια (στέλεχος R 9-3) όπου φαίνεται η έντονη κυστιδιακή δραστηριότητα (κυκλωμένη περιοχή, κεφαλές βελών), V: χυμοτόπιο. (Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούνη, Χ. Κατσαρός)



Εικόνα 40. Διάφορες φάσεις του κύκλου ζωής της μορφής *T. verrucosa f. rubens*. α) Αρχή διχοτόμησης, βέλος: προανατολισμός σχηματισμού φραγμοπλάστη, β-γ) διπλασιασμός μητρικού κυττάρου και σχηματικός θυγατρικών εντός της θήκης, δ) ανάπτυξη κυττάρων με ίδιο προανατολισμό και σχηματισμός θυγατρικών θηκών και μαστιγίων (βέλη) εντός της μητρικής θήκης, ε-στ) απόθεση τοιχωματικού υλικού με τη μορφή “μίσχου” (αμφίδρομα βέλη), ζ) συσσώρευση πολυσακχαριτικού υλικού προερχόμενου από απορριφθείσες θήκες, η) σύγκριση παλμελλοειδούς κυττάρου με παχύ τοίχωμα (βέλος) και φυσιολογικού κυττάρου το οποίο εμφανίζει συγκεντρική συσσώρευση παλαιών θηκών (κεφαλές βελών), θ) παλμελλοειδές κύτταρο που εμφανίζει κοκκιώδη (verrucose) υφή.

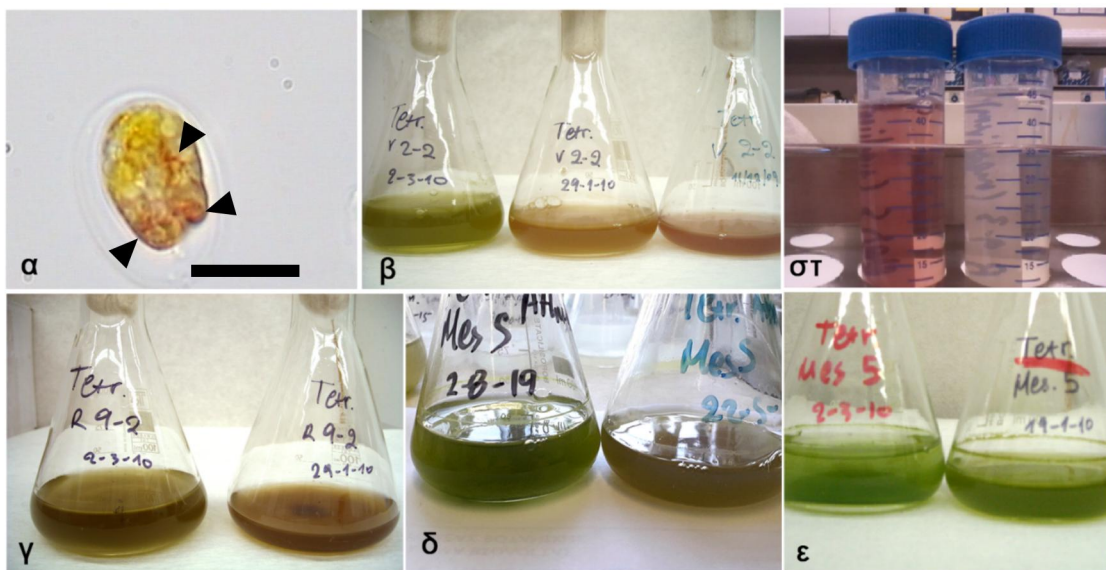
Κλίμακα: 10μm

(Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούντσιου)

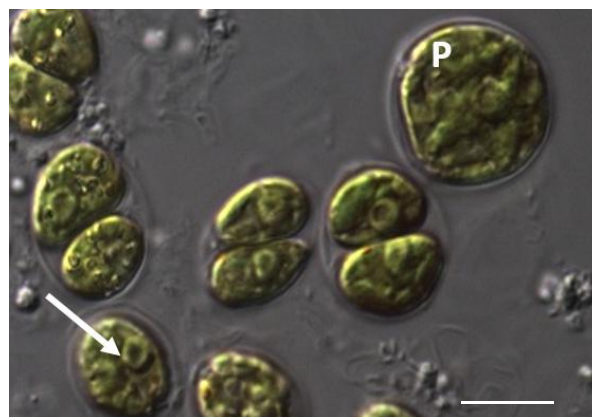
Πίνακας 6. Βιομετρικά γνωρίσματα των μελετηθέντων στελεχών. Παρατίθενται οι ακραίες (μέγιστα, ελάχιστα) και οι μέσες τιμές (με την τυπική απόκλιση) του μήκους (H) και του πλάτους (W) του κυττάρου, καθώς και ο λόγος αυτών ως ένδειξη του σχήματος του κυττάρου. Επίσης παρατίθεται ο μέσος όγκος του κυττάρου (βιο-όγκος).

Strain	H (μm)			W (μm)			L/2r	Biovolume (μm ³)
	max	min	mean	max	min	mean		
R 9-2	15,20	8,88	11,69 ± 1,47	11,38	5,50	8,84 ± 1,23	1,34	492,76
R 9-3	15,57	9,50	12,14 ± 1,29	12,57	7,25	9,22 ± 1,13 ^b	1,32	557,94
V 2-2	5,39	12,89	8,73 ± 1,84 ^a	10,79	3,66	6,88 ± 1,97 ^a	1,31	256,78 ^a
Mes 5	14,95	9,63	12,52 ± 1,33	10,51	6,63	8,29 ± 1,01 ^b	1,52	461,38
Mes 17	15,89	8,39	11,73 ± 1,84	12,89	5,76	8,98 ± 1,97	1,33	548,27

^{a,b} Τιμές που εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά βάσει της ανάλυσης ANOVA.



Εικόνα 41. α) Κύτταρο που παρουσιάζει συσσωρεύσεις “αιματοχρώματος” (κεφαλές βελών), β) καλλιέργειες AthU-AI V 2-2, γ) καλλιέργειες AthU-AI R 9-2 δ) καλλιέργειες AthU-AI Mes 5 (40%), ε) καλλιέργειες AthU-AI Mes 5 (60%), στ) διήθημα νεαρής (διαφανές) και γηραιότερης (ερυθρό) καλλιέργειας του στελέχους V 2-2.
Κλίμακα: 10μm



Εικόνα 42. Κύτταρα του στελέχους AthU-AI Mes 5 με ενδεχομένως περισσότερα του ενός πυρηνοειδή (βέλος). P: Παλμμελλοειδές κύτταρο.
Κλίμακα: 10μm
(Φωτογραφία: Ξ. Χαντζητρούντσιου)

3.4.3. Μοριακή Φυλογενετική Ανάλυση

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *rbcL* (Πίνακας 2) στοχεύουν στο σύνολο της αλληλουχίας του γονιδίου, μεγέθους περίπου 1161 bp (Daugbjerg *et al.* 1994). Αλληλουχία μήκους 1061 bp προέκυψε μόνο για το στελέχος V 2-2, ενώ για τρία από τα υπόλοιπα στελέχη (συμπεριλαμβανομένου και του στελέχους CCAP 66/6), τα τμήματα του γονιδίου που ενισχύθηκαν κυμάνθηκαν σε μήκος από 377 έως 407 bp. Τα υπόλοιπα τμήματα των αλληλουχιών δεν χρησιμοποιήθηκαν γιατί θεωρήθηκε ότι ήταν χαμηλής ποιότητας. Επιπλέον, για τα στελέχη R 9-2 και R 9-3 προέκυψαν μικρότερα τμήματα, μήκους 161 και 127 bp αντιστοίχως. Ωστόσο, όλες οι αλληλουχίες χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις. Το σύνολο δεδομένων (αλληλουχίες σε στοίχιση) που συνετάχθη για το γονίδιο *rbcL* - συμπεριλαμβανομένων των παραχθέντων από την ανάλυση αλληλουχιών και αυτών που ανακτήθηκαν από την GenBank - είχε μήκος 1428 bp και περιελάμβανε 722 μεταβλητές θέσεις (variable sites), από τις οποίες 658 ήταν πληροφοριακές ως προς τη μέθοδο της φειδωλότητας (parsimony informative). Για το γονίδιο 18S rRNA ενισχύθηκε αλληλουχία μήκους κατά μέσο όρο 1594 bp από τα 6 αναλυθέντα στελέχη (συμπεριλαμβανομένου του CCAP 66/6). Το σύνολο δεδομένων που συνετάχθη για το γονίδιο 18S rRNA - συμπεριλαμβανομένων των παραχθέντων από την ανάλυση αλληλουχιών και αυτών που ανακτήθηκαν από την GenBank - είχε μήκος 2287 bp και περιελάμβανε 1398 μεταβλητές θέσεις (variable sites) από τις οποίες 808 ήταν πληροφοριακές ως προς τη μέθοδο της φειδωλότητας (parsimony informative). Οι ευθυγραμμισμένες αλληλουχίες (consensus) που προέκυψαν για τα δύο γονίδια παρουσιάζονται στους Πίνακες 7-8. Οι αριθμοί καταχώρησης (accession numbers) όλων των αλληλουχιών (παραχθέντων και ανακτηθέντων από τη GenBank) που χρησιμοποιήθηκαν στις φυλογενετικές αναλύσεις παρουσιάζονται στο Παράρτημα 6.

Η μέση απόκλιση μεταξύ όλων των ζευγών αλληλουχιών για τα διακριτά και σαφώς καθορισμένα είδη, όπως εκτιμήθηκε με τη χρήση του λογισμικού MEGA v.6, ήταν 20.1% για το γονίδιο *rbcL* και 11.2% για το γονίδιο 18S rRNA. Οι τιμές απόκλισης μεταξύ των πέντε μελετηθέντων στελεχών της Τράπεζας AthU-AI ήταν 2.4% και 0.3% για τα τμήματα των γονιδίων *rbcL* και 18S rRNA αντιστοίχως. Η μέση απόσταση μεταξύ των μελετηθέντων στελεχών και της ταξινομικής μονάδας *T. verrucosa* f. *rubens* (στέλεχος CCAP 66/6) ήταν 3.2% για το γονίδιο *rbcL* και 0.3% για το 18S rRNA. Τέλος, η μέση απόκλιση μεταξύ της ομάδας "*Tetraselmis verrucosa* f. *rubens*" και των υπόλοιπων στελεχών του γένους *Tetraselmis* ήταν 7.5% για το *rbcL* και 1% για 18S rRNA (Πίνακες 9-10).

Πίνακας 7. Ευθυγραμμισμένες αλληλουχίες των στελεχών AthU-AI, οι οποίες προέκυψαν για το γονίδιο rbcL. Οι σκιασμένες περιοχές υποδεικνύουν θέσεις με διαφορετικές βάσεις μεταξύ των αλληλουχιών.

_Tetr_Mes_17	GAT	ATC	TTA	GCA	GCT	TTC	CGT	TGT	AAC	CCT	CAA	CCT	GGT	GTA	CCA	CCA
_Tetr_Mes_5	GAT	ATC	TTA	GCA	GCT	TTC	CGT	TGT	AAC	CCT	CAA	CCT	GGT	GTA	CCA	CCA
_Tetr_66_6	GAT	ATC	TnA	GCA	GCT	TTC	CGT	TGT	AAC	CCT	CAA	CCT	GGT	GTA	CCA	CCA
_Tetr_V_2_2	GAT	ATC	TTA	GCA	GCT	TTC	CGT	TGT	AAC	CCT	CAA	CCT	GGT	GTA	CCA	CCA
_Tetr_R_9_3	GAT	ATC	TTA	GCA	GCT	TTC	CGT	TGT	AAC	CCT	CAA	CCT	GGT	GTA	CCA	CCA
_Tetr_R_9_2	GAT	ATC	TTA	GCA	GCT	TTC	CGT	TGT	AAC	CCT	CAA	CCT	GGT	GTA	CCA	CCA
_Tetr_Mes_17	GAA	GAG	TGT	GGT	GCA	GCT	GTT	GCA	GCT	GAA	TCA	TCT	ACA	GGT	ACT	TGG
_Tetr_Mes_5	GAA	GAG	TGT	GGT	GCA	GCT	GTT	GCA	GCT	GAA	TCA	TCT	ACA	GGT	ACT	TGG
_Tetr_66_6	GAA	GAA	TGT	GGT	GCA	GCC	GTT	GCA	GCT	GAA	TCA	TCT	ACA	GGT	ACT	TGG
_Tetr_V_2_2	GAA	GAA	TGT	GGT	GCA	GCC	GTT	GCA	GCT	GAA	TCA	TCT	ACA	GGT	ACT	TGG
_Tetr_R_9_3	GAA	GAA	TGT	GGT	GCA	GCC	GTT	GCA	GCT	GAA	TCN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
_Tetr_R_9_2	GAA	GAA	TGT	GGT	GCA	GCC	GTT	GCA	GCT	GAA	TCA	TCT	ACA	GGT	ACT	TGG
_Tetr_Mes_17	ACA	ACT	GTA	TGG	ACT	GAT	GGT	TTA	ACA	AGT	TTA	GAT	CGT	TAC	AAA	GGC
_Tetr_Mes_5	ACA	ACT	GTA	TGG	ACT	GAT	GGT	TTA	ACA	AGT	TTA	GAT	CGT	TAC	AAA	GGC
_Tetr_66_6	ACA	ACT	GTA	TGG	ACT	GAT	GGT	TTA	ACA	AGT	TTA	GAC	CGT	TAC	AAA	GGT
_Tetr_V_2_2	ACA	ACT	GTA	TGG	ACT	GAT	GGT	TTA	ACA	AGT	TTA	GAC	CGT	TAC	AAA	GGT
_Tetr_R_9_3	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
_Tetr_R_9_2	ACA	ACT	GTA	TGG	ACT	GAT	GNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
_Tetr_Mes_17	CGT	TGT	TAT	GAT	ATT	GAA	CCA	GTA	GCT	GGG	GAA	GAA	AAC	CAA	TAC	ATT
_Tetr_Mes_5	CGT	TGT	TAT	GAT	ATT	GAA	CCA	GTA	GCT	GGG	GAA	GAA	AAC	CAA	TAC	ATT
_Tetr_66_6	CGT	TGT	TAT	GAT	ATT	GAA	CCG	GTA	GCT	GGT	GAA	GAA	AAC	CAA	TAC	ATT
_Tetr_V_2_2	CGT	TGT	TAT	GAT	ATT	GAA	CCA	GTA	GCT	GGT	GAA	GAA	AAC	CAA	TAC	ATT
_Tetr_R_9_3	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
_Tetr_R_9_2	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
_Tetr_Mes_17	TTC	TAC	ATT	GCT	TAT	CCT	ATT	GAT	TTA	TTT	GAA	GAA	GGT	TCA	GTA	ACT
_Tetr_Mes_5	TTC	TAC	ATT	GCT	TAT	CCT	ATT	GAT	TTA	TTT	GAA	GAA	GGT	TCA	GTA	ACT
_Tetr_66_6	TTC	TAC	ATT	GCT	TAC	CCT	ATC	GAC	CTA	TTC	GAA	GAA	GGT	TCA	GTA	ACT
_Tetr_V_2_2	TTC	TAC	ATC	GCG	TAC	CCG	ATC	GAT	CTA	TTC	GAA	GAA	GGT	TCA	GTA	ACT
_Tetr_R_9_3	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNA	TTC	GAA	GAA	GGT	TCA	GTA	ACT
_Tetr_R_9_2	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
_Tetr_Mes_17	AAC	CTG	TTT	ACT	TCA	ATT	GTA	GGG	AAC	GTT	TTT	GGT	TTT	AAA	GCA	TTA
_Tetr_Mes_5	AAC	CTG	TTT	ACT	TCA	ATT	GTA	GGG	AAC	GTT	TTT	GGT	TTT	AAA	GCA	TTA
_Tetr_66_6	AAC	CTA	TTT	ACC	TCA	ATT	GTA	GGG	AAC	GTT	TTT	GGT	TTC	AAA	GCA	TTA
_Tetr_V_2_2	AAC	CTA	TTT	ACG	TCA	ATT	GTA	GGG	AAC	GTT	TTT	GGT	TTC	AAA	GCA	TTA
_Tetr_R_9_3	AAC	CTA	TTT	ACC	TCA	ATT	GTA	GGG	AAC	GTT	TTT	GGT	TTC	AAA	GCA	TTA
_Tetr_R_9_2	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
_Tetr_Mes_17	CGT	GCT	CTT	CGT	CTA	GAA	GAT	TTA	CGT	ATT	CCA	GTA	GCA	TAT	TGT	AAA
_Tetr_Mes_5	CGT	GCT	CTT	CGT	CTA	GAA	GAT	TTA	CGT	ATT	CCA	GTA	GCA	TAT	TGT	AAA
_Tetr_66_6	CGT	GCT	CTT	CGT	TTA	GAA	GAT	TTA	CGT	ATT	CCA	GTA	GCA	TAC	TGT	AAA
_Tetr_V_2_2	CGT	GCT	CTT	CGT	TTA	GAA	GAT	TTA	CGT	ATT	CCA	GTA	GCA	TAC	TGT	AAA
_Tetr_R_9_3	CGT	GCT	CTT	CGT	TTA	GAA	GAT	TTA	CGT	ATT	CCA	GTA	GCA	TAC	TGT	AAA
_Tetr_R_9_2	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN
_Tetr_Mes_17	ACA	TTC	CAA	GGT	GCT	CCA	CAT	GGT	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_5	ACA	TTC	CAA	GGT	GCT	CCA	CAT	GGT	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_66_6	ACA	TTC	CAA	GGT	GCC	CCG	CAC	GGT	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_V_2_2	ACA	TTC	CAA	GGT	GCT	CCG	CAC	GGT	ATC	CAA	GTT	GAA	CGT	GAT	AAA	CTA
_Tetr_R_9_3	ACA	TTC	CAA	GGT	GCT	CCG	CAC	GGT	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_2	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	NNN	---	---	---	---	---	---	---	---

Πίνακας 7. Συνέχεια.

_Tetr_Mes_17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_66_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_V_2_2	AAC	AAA	TAT	GGT	CGT	GGT	CTA	TTA	GGT	TGT	ACT	ATT	AAA	CCA	AAA	CTA
_Tetr_R_9_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_66_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_V_2_2	GGT	CTA	TCA	GCT	AAA	AAC	TAC	GGG	CGT	GCT	TGT	TAC	GAA	TGT	CTA	CGT
_Tetr_R_9_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_66_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_V_2_2	GGT	GGT	CTA	GAT	TTC	ACA	AAA	GAT	GAT	GAA	AAC	GTA	AAC	TCA	CAA	GCA
_Tetr_R_9_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_66_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_V_2_2	TTC	ATG	CGT	TGG	AGA	GAC	CGT	TTC	TTA	TTT	GTA	TCA	GAA	GCG	ATT	TAC
_Tetr_R_9_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_66_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_V_2_2	AAA	TCA	CAA	GCT	GAA	ACT	GGT	GAA	ATT	AAA	GGT	CAC	TAC	CTA	AAT	GCA
_Tetr_R_9_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_66_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_V_2_2	ACT	GCA	GGT	ACA	TGT	GAA	GAA	ATG	ATG	AAA	CGT	GCT	GAA	TGT	GCA	GCA
_Tetr_R_9_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_66_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_V_2_2	GGT	TTT	GGT	GTT	CCA	ATT	ATC	ATG	CAC	GAT	TAC	TTA	ACA	GGT	GGT	TTC
_Tetr_R_9_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_66_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_V_2_2	ACT	TCA	AAC	ACT	TCA	TTA	TCT	ATC	TAC	TGT	CGT	GAC	CAT	GGT	CTT	CTT
_Tetr_R_9_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Πίνακας 7. ΣΥΝΕΧΕΙΑ.

_Tetr_Mes_17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_66_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_V_2_2	TTA	CAC	ATT	CAC	CGT	GCT	ATG	CAC	GCT	GTT	ATT	GAC	CGT	CAA	AGA	AAC
_Tetr_R_9_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_66_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_V_2_2	CAC	GGT	ATG	CAC	TTC	CGT	GTT	TTA	GCA	AAA	GCT	CTA	CGT	ATG	TCT	GGT
_Tetr_R_9_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_66_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_V_2_2	GGT	GAC	CAC	TTA	CAC	TCT	GGT	ACT	GTT	GTA	GGT	AAA	CTA	GAA	GGT	GAA
_Tetr_R_9_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_66_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_V_2_2	CGT	GAA	GTT	ACT	TTA	GGT	TTC	GTA	GAT	TTA	ATG	CGT	GAT	GCT	TAC	GTT
_Tetr_R_9_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_66_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_V_2_2	GAG	AAA	GAT	CGT	TCG	CGT	GGT	ATT	TAC	TTC	ACT	CAA	GAT	TGG	GGT	GGT
_Tetr_R_9_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_17	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_Mes_5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_66_6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_V_2_2	TAC	CA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
_Tetr_R_9_2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Πίνακας 8. Ευθυγραμμισμένες αλληλουχίες των στελεχών AthU-AI, οι οποίες προέκυψαν για το γονίδιο 18S rRNA. Οι σκιασμένες περιοχές υποδεικνύουν θέσεις με διαφορετικές βάσεις μεταξύ των αλληλουχιών.

Tetr_Mes_5	GGC	TCA	TTA	AAT	CAG	TTA	TAG	TTT	ATT	TGA	TGG	TAC	CTA	CTA	CTC	GGA
Tetr_Mes_17	GGc	TCA	TTA	AAT	CAG	TTA	TAG	TTT	ATT	TGA	TGG	TAC	CTA	CTA	CTC	GGA
Tetr_66_6	GGC	TCA	TTA	AAT	CAG	TTA	TAG	TTT	ATT	TGA	TGG	TAC	CTA	CTA	CTC	GGA
Tetr_V_2_2	---	---	---	--T	CAG	TTA	TAG	TTT	ATT	TGA	TGG	TAC	CTA	CTA	CTC	GGA
Tetr_R_9_2	---	---	---	--T	CAG	TTA	TAG	TTT	ATT	TGA	TGG	TAC	CTA	CTA	CTC	GGA
Tetr_R_9_3	---	---	---	---	--G	TTA	TAG	TTT	ATT	TGA	TGG	TAC	CTA	CTA	CTC	GGA
Tetr_Mes_5	TAA	CCG	TAG	TAA	TTC	TAG	AGC	TAA	TAC	GTG	CGT	AAA	TCC	CGA	CTT	CTG
Tetr_Mes_17	TAA	CCG	TAG	TAA	TTC	TAG	AGC	TAA	TAC	GTG	CGT	AAA	TCC	CGA	CTT	CTG
Tetr_66_6	TAA	CCG	TAG	TAA	TTC	TAG	AGC	TAA	TAC	GTG	CGT	AAA	TCC	CGA	CTT	CTG
Tetr_V_2_2	TAA	CCG	TAG	TAA	TTC	TAG	AGC	TAA	TAC	GTG	CGT	AAA	TCC	CGA	CTC	CTG
Tetr_R_9_2	TAA	CCG	TAG	TAA	TTC	TAG	AGC	TAA	TAC	GTG	CGT	AAA	TCC	CGA	CTT	CTG
Tetr_R_9_3	TAA	CCG	TAG	TAA	TTC	TAG	AGC	TAA	TAC	GTG	CGT	AAA	TCC	CGA	CTT	CTG
Tetr_Mes_5	GAA	GGG	ACG	TAT	TTA	TTA	GAT	TTA	AGG	CCA	ACC	GAG	CTC	TGC	TCG	TCT
Tetr_Mes_17	GAA	GGG	ACG	TAT	TTA	TTA	GAT	TTA	AGG	CCA	ACC	GAG	CTC	TGC	TCG	TCT
Tetr_66_6	GAA	GGG	ACG	TAT	TTA	TTA	GAT	TTA	AGG	CCA	ACC	GAG	CTC	TGC	TCG	TCT
Tetr_V_2_2	GAA	GGG	ACG	TAT	TTA	TTA	GAT	TTA	AGG	CCA	ACC	GAG	CTC	TGC	TCG	TCT
Tetr_R_9_2	GAA	GGG	ACG	TAT	TTA	TTA	GAT	TTA	AGG	CCA	ACC	GAG	CTC	TGC	TCG	TCT
Tetr_R_9_3	GAA	GGG	ACG	TAT	TTA	TTA	GAT	TTA	AGG	CCA	ACC	GAG	CTC	TGC	TCG	TCT
Tetr_Mes_5	CTT	GGT	GAA	TCA	TGA	TAA	CTT	CAC	GAA	TCG	CAT	GGC	CCC	TGC	GCC	GGC
Tetr_Mes_17	CTT	GGT	GAA	TCA	TGA	TAA	CTT	CAC	GAA	TCG	CAT	GGC	CCC	TGC	GCC	GGC
Tetr_66_6	CTT	GGT	GAA	TCA	TGA	TAA	CTT	CAC	GAA	TCG	CAT	GGC	CTC	TGC	GCC	GGC
Tetr_V_2_2	CTT	GGT	GAA	TCA	TGA	TAA	CTT	CAC	GAA	TCG	CAT	GGC	CTC	CGC	GCC	GGC
Tetr_R_9_2	CTT	GGT	GAA	TCA	TGA	TAA	CTT	CAC	GAA	TCG	CAT	GGC	CTC	CGC	GCC	GGC
Tetr_R_9_3	CTT	GGT	GAA	TCA	TGA	TAA	CTT	CAC	GAA	TCG	CAT	GGC	CTC	CGC	GCC	GGC
Tetr_Mes_5	GAT	GTT	TCA	TTC	AAA	TTT	CTG	CCC	TAT	CAA	TTG	GCG	ATG	GTA	GGA	TAG
Tetr_Mes_17	GAT	GTT	TCA	TTC	AAA	TTT	CTG	CCC	TAT	CAA	TTG	GCG	ATG	GTA	GGA	TAG
Tetr_66_6	GAT	GTT	TCA	TTC	AAA	TTT	CTG	CCC	TAT	CAA	TTG	GCG	ATG	GTA	GGA	TAG
Tetr_V_2_2	GAT	GTT	TCA	TTC	AAA	TTT	CTG	CCC	TAT	CAA	TTG	GCG	ATG	GTA	GGA	TAG
Tetr_R_9_2	GAT	GTT	TCA	TTC	AAA	TTT	CTG	CCC	TAT	CAA	TTG	GCG	ATG	GTA	GGA	TAG
Tetr_R_9_3	GAT	GTT	TCA	TTC	AAA	TTT	CTG	CCC	TAT	CAA	TTG	GCG	ATG	GTA	GGA	TAG
Tetr_Mes_5	AGG	CCT	ACC	ATG	GTG	TTA	ACG	GGT	GAC	GGA	GGA	TTA	GGG	TTC	GAT	TCC
Tetr_Mes_17	AGG	CCT	ACC	ATG	GTG	TTA	ACG	GGT	GAC	GGA	GGA	TTA	GGG	TTC	GAT	TCC
Tetr_66_6	AGG	CCT	ACC	ATG	GTG	TTA	ACG	GGT	GAC	GGA	GGA	TTA	GGG	TTC	GAT	TCC
Tetr_V_2_2	AGG	CCT	ACC	ATG	GTG	TTA	ACG	GGT	GAC	GGA	GGA	TTA	GGG	TTC	GAT	TCC
Tetr_R_9_2	AGG	CCT	ACC	ATG	GTG	TTA	ACG	GGT	GAC	GGA	GGA	TTA	GGG	TTC	GAT	TCC
Tetr_R_9_3	AGG	CCT	ACC	ATG	GTG	TTA	ACG	GGT	GAC	GGA	GGA	TTA	GGG	TTC	GAT	TCC
Tetr_Mes_5	GGA	GAG	GGA	GCC	TGA	GAA	ACG	GCT	ACC	ACA	TCC	AAG	GAA	GGC	AGC	AGG
Tetr_Mes_17	GGA	GAG	GGA	GCC	TGA	GAA	ACG	GCT	ACC	ACA	TCC	AAG	GAA	GGC	AGC	AGG
Tetr_66_6	GGA	GAG	GGA	GCC	TGA	GAA	ATG	GCT	ACC	ACA	TCC	AAG	GAA	GGC	AGC	AGG
Tetr_V_2_2	GGA	GAG	GGA	GCC	TGA	GAA	ATG	GCT	ACC	ACA	TCC	AAG	GAA	GGC	AGC	AGG
Tetr_R_9_2	GGA	GAG	GGA	GCC	TGA	GAA	ANG	GCT	ACC	ACA	TCC	AAG	GAA	GGC	AGC	AGG
Tetr_R_9_3	GGA	GAG	GGA	GCC	TGA	GAA	ATG	GCT	ACC	ACA	TCC	AAG	GAA	GGC	AGC	AGG
Tetr_Mes_5	CGC	GCA	AAT	TAC	CCA	ATC	CTG	ATA	CAG	GGA	GGT	AGT	GAC	AAT	AAA	TAA
Tetr_Mes_17	CGC	GCA	AAT	TAC	CCA	ATC	CTG	ATA	CAG	GGA	GGT	AGT	GAC	AAT	AAA	TAA
Tetr_66_6	CGC	GCA	AAT	TAC	CCA	ATC	CTG	ATA	CAG	GGA	GGT	AGT	GAC	AAT	AAA	TAA
Tetr_V_2_2	CGC	GCA	AAT	TAC	CCA	ATC	CTG	ATA	CAG	GGA	GGT	AGT	GAC	AAT	AAA	TAA
Tetr_R_9_2	CGC	GCA	AAT	TAC	CCA	ATC	CTG	ATA	CAG	GGA	GGT	AGT	GAC	AAT	AAA	TAA
Tetr_R_9_3	CGC	GCA	AAT	TAC	CCA	ATC	CTG	ATA	CAG	GGA	GGT	AGT	GAC	AAT	AAA	TAA

Πίνακας 8. Συνέχεια.

Tetr_Mes_5	CAA	TAC	CGG	GCT	TTT	CAA	GTC	TGG	TAA	TTG	GAA	TGA	GTA	CAA	TCT	AAA
Tetr_Mes_17	CAA	TAC	CGG	GCT	TTT	CAA	GTC	TGG	TAA	TTG	GAA	TGA	GTA	CAA	TCT	AAA
Tetr_66_6	CAA	TAC	CGG	GCT	TTT	CAA	GTC	TGG	TAA	TTG	GAA	TGA	GTA	CAA	TCT	AAA
Tetr_V_2_2	CAA	TAC	CGG	GCT	TTT	CAA	GTC	TGG	TAA	TTG	GAA	TGA	GTA	CAA	TCT	AAA
Tetr_R_9_2	CAA	TAC	CGG	GCT	TTT	CAA	GTC	TGG	TAA	TTG	GAA	TGA	GTA	CAA	TCT	AAA
Tetr_R_9_3	CAA	TAC	CGG	GCT	TTT	CAA	GTC	TGG	TAA	TTG	GAA	TGA	GTA	CAA	TCT	AAA
Tetr_Mes_5	TCC	CTT	AAC	GAG	GAT	CCA	TTG	GAG	GGC	AAG	TCT	GGT	GCC	AGC	AGC	CGC
Tetr_Mes_17	TCC	CTT	AAC	GAG	GAT	CCA	TTG	GAG	GGC	AAG	TCT	GGT	GCC	AGC	AGC	CGC
Tetr_66_6	TCC	CTT	AAC	GAG	GAT	CCA	TTG	GAG	GGC	AAG	TCT	GGT	GCC	AGC	AGC	CGC
Tetr_V_2_2	TCC	CTT	AAC	GAG	GAT	CCA	TTG	GAG	GGC	AAG	TCT	GGT	GCC	AGC	AGC	CGC
Tetr_R_9_2	TCC	CTT	AAC	GAG	GAT	CCA	TTG	GAG	GGC	AAG	TCT	GGT	GCC	AGC	AGC	CGC
Tetr_R_9_3	TCC	CTT	AAC	GAG	GAT	CCA	TTG	GAG	GGC	AAG	TCT	GGT	GCC	AGC	AGC	CGC
Tetr_Mes_5	GGT	AAT	TCC	AGC	TCC	AAT	AGC	GTA	TAT	TTA	AGT	TGT	TGC	AGT	TAA	AAA
Tetr_Mes_17	GGT	AAT	TCC	AGC	TCC	AAT	AGC	GTA	TAT	TTA	AGT	TGT	TGC	AGT	TAA	AAA
Tetr_66_6	GGT	AAT	TCC	AGC	TCC	AAT	AGC	GTA	TAT	TTA	AGT	TGT	TGC	AGT	TAA	AAA
Tetr_V_2_2	GGT	AAT	TCC	AGC	TCC	AAT	AGC	GTA	TAT	TTA	AGT	TGT	TGC	AGT	TAA	AAA
Tetr_R_9_2	GGT	AAT	TCC	AGC	TCC	AAT	AGC	GTA	TAT	TTA	AGT	TGT	TGC	AGT	TAA	AAA
Tetr_R_9_3	GGT	AAT	TCC	AGC	TCC	AAT	AGC	GTA	TAT	TTA	AGT	TGT	TGC	AGT	TAA	AAA
Tetr_Mes_5	GCT	CGT	AGT	TGG	ATT	TCG	GAT	GGG	ACT	TGC	CGG	TCC	GTC	GTT	GCG	ATG
Tetr_Mes_17	GCT	CGT	AGT	TGG	ATT	TCG	GAT	GGG	ACT	TGC	CGG	TCC	GTC	GTT	GCG	ATG
Tetr_66_6	GCT	CGT	AGT	TGG	ATT	TCG	GAT	GGG	ACT	TGC	CGG	TCC	GTC	GTT	GCG	ATG
Tetr_V_2_2	GCT	CGT	AGT	TGG	ATT	TCG	GAT	GGG	ACT	TGC	CGG	TCC	GTC	GTT	GCG	ATG
Tetr_R_9_2	GCT	CGT	AGT	TGG	ATT	TCG	GAT	GGG	ACT	TGC	CGG	TCC	GTC	GTT	GCG	ATG
Tetr_R_9_3	GCT	CGT	AGT	TGG	ATT	TCG	GAT	GGG	ACT	TGC	CGG	TCC	GTC	GTT	GCG	ATG
Tetr_Mes_5	TGC	ACT	GGC	CAG	TCC	TAT	CTT	GTT	GTC	GGG	GAC	TAG	CTC	TTG	GAC	TTA
Tetr_Mes_17	TGC	ACT	GGC	CAG	TCC	TAT	CTT	GTT	GTC	GGG	GAC	TAG	CTC	TTG	GAC	TTA
Tetr_66_6	TGC	ACT	GGC	CAG	TCC	TAT	CTT	GTT	GTC	GGG	GAC	TAG	CTC	CTG	GGC	TTC
Tetr_V_2_2	TGC	ACT	GGC	CAG	TCC	CAT	CTT	GTT	GTC	GGG	GAC	TAG	CTC	CTG	GGC	TTC
Tetr_R_9_2	TGC	ACT	GGC	CAG	TCC	TAT	CTT	GTT	GTC	GGG	GAC	TAG	CTC	CTG	GGC	TTC
Tetr_R_9_3	TGC	ACT	GGC	CAG	TCC	TAT	CTT	GTT	GTC	GGG	GAC	TAG	CTC	CTG	GGC	TTC
Tetr_Mes_5	ACT	GCC	CGG	GAC	TAG	GAG	CTG	ACG	AGG	TTA	CTT	TGA	GTA	AAT	TAG	AGT
Tetr_Mes_17	ACT	GCC	CGG	GAC	TAG	GAG	CTG	ACG	AGG	TTA	CTT	TGA	GTA	AAT	TAG	AGT
Tetr_66_6	ACT	GTC	CGG	GAC	TAG	GAG	CTG	ACG	AGG	TTA	CTT	TGA	GTA	AAT	TAG	AGT
Tetr_V_2_2	ACT	GTC	CGG	GAC	TAG	GAG	CTG	ACG	AGG	TTA	CTT	TGA	GTA	AAT	TAG	AGT
Tetr_R_9_2	ACT	GTC	CGG	GAC	TAG	GAG	CTG	ACG	AGG	TTA	CTT	TGA	GTA	AAT	TAG	AGT
Tetr_R_9_3	ACT	GTC	CGG	GAC	TAG	GAG	CTG	ACG	AGG	TTA	CTT	TGA	GTA	AAT	TAG	AGT
Tetr_Mes_5	GTT	CAA	AGC	AAG	CCT	ACG	CTC	TGA	ATA	CAT	TAG	CAT	GGA	ATA	ACA	CGA
Tetr_Mes_17	GTT	CAA	AGC	AAG	CCT	ACG	CTC	TGA	ATA	CAT	TAG	CAT	GGA	ATA	ACA	CGA
Tetr_66_6	GTT	CAA	AGC	AAG	CCT	ACG	CTC	TGA	ATA	CAT	TAG	CAT	GGA	ATA	ACA	CGA
Tetr_V_2_2	GTT	CAA	AGC	AAG	CCT	ACG	CTC	TGA	ATA	CAT	TAG	CAT	GGA	ATA	ACA	CGA
Tetr_R_9_2	GTT	CAA	AGC	AAG	CCT	ACG	CTC	TGA	ATA	CAT	TAG	CAT	GGA	ATA	ACA	CGA
Tetr_R_9_3	GTT	CAA	AGC	AAG	CCT	ACG	CTC	TGA	ATA	CAT	TAG	CAT	GGA	ATA	ACA	CGA
Tetr_Mes_5	TAG	GAC	TCT	GGC	TTA	TCC	TGT	TGG	TCT	GTG	AGA	CCA	GAG	TAA	TGA	TTA
Tetr_Mes_17	TAG	GAC	TCT	GGC	TTA	TCC	TGT	TGG	TCT	GTG	AGA	CCA	GAG	TAA	TGA	TTA
Tetr_66_6	TAG	GAC	TCT	GGC	TTA	TCC	TGT	TGG	TCT	GTG	AGA	CCA	GAG	TAA	TGA	TTA
Tetr_V_2_2	TAG	GAC	TCT	GGC	TTA	TCC	TGT	TGG	TCT	GTG	AGA	CCA	GAG	TAA	TGA	TTA
Tetr_R_9_2	TAG	GAC	TCT	GGC	TTA	TCC	TGT	TGG	TCT	GTG	AGA	CCA	GAG	TAA	TGA	TTA
Tetr_R_9_3	TAG	GAC	TCT	GGC	TTA	TCC	TGT	TGG	TCT	GTG	AGA	CCA	GAG	TAA	TGA	TTA

Πίνακας 8. Συνέχεια.

Tetr_Mes_5	AGA GGG ACA GTC GGG GAC ATT CGT ATT TCA TTG TCA GAG GTG AAA TTC
Tetr_Mes_17	AGA GGG ACA GTC GGG GAC ATT CGT ATT TCA TTG TCA GAG GTG AAA TTC
Tetr_66_6	AGA GGG ACA GTC GGG GAC ATT CGT ATT TCA TTG TCA GAG GTG AAA TTC
Tetr_V_2_2	AGA GGG ACA GTC GGG GAC ATT CGT ATT TCA TTG TCA GAG GTG AAA TTC
Tetr_R_9_2	AGA GGG ACA GTC GGG GAC ATT CGT ATT TCA TTG TCA GAG GTG AAA TTC
Tetr_R_9_3	AGA GGG ACA GTC GGG GAC ATT CGT ATT TCA TTG TCA GAG GTG AAA TTC
Tetr_Mes_5	TTG GAT TTA TGA AAG ACG AAC TTC TGC GAA AGC ATT TGT CAA GGA TGT
Tetr_Mes_17	TTG GAT TTA TGA AAG ACG AAC TTC TGC GAA AGC ATT TGT CAA GGA TGT
Tetr_66_6	TTG GAT TTA TGA AAG ACG AAC TTC TGC GAA AGC ATT TGT CAA GGA TGT
Tetr_V_2_2	TTG GAT TTA TGA AAG ACG AAC TTC TGC GAA AGC ATT TGT CAA GGA TGT
Tetr_R_9_2	TTG GAT TTA TGA AAG ACG AAC TTC TGC GAA AGC ATT TGT CAA GGA TGT
Tetr_R_9_3	TTG GAT TTA TGA AAG ACG AAC TTC TGC GAA AGC ATT TGT CAA GGA TGT
Tetr_Mes_5	TTT CAT TAA TCA AGA ACG AAA GTT GGG GGC TCG AAG ACG ATT AGA TAC
Tetr_Mes_17	TTT CAT TAA TCA AGA ACG AAA GTT GGG GGC TCG AAG ACG ATT AGA TAC
Tetr_66_6	TTT CAT TAA TCA AGA ACG AAA GTT GGG GGC TCG AAG ACG ATT AGA TAC
Tetr_V_2_2	TTT CAT TAA TCA AGA ACG AAA GTT GGG GGC TCG AAG ACG ATT AGA TAC
Tetr_R_9_2	TTT CAT TAA TCA AGA ACG AAA GTT GGG GGC TCG AAG ACG ATT AGA TAC
Tetr_R_9_3	TTT CAT TAA TCA AGA ACG AAA GTT GGG GGC TCG AAG ACG ATT AGA TAC
Tetr_Mes_5	CGT CCT AGT CTC AAC CAT AAA CGA TGC CGA CTA GGG ATT GGC AGA CGT
Tetr_Mes_17	CGT CCT AGT CTC AAC CAT AAA CGA TGC CGA CTA GGG ATT GGC AGA CGT
Tetr_66_6	CGT CCT AGT CTC AAC CAT AAA CGA TGC CGA CTA GGG ATT GGC AGA CGT
Tetr_V_2_2	CGT CCT AGT CTC AAC CAT AAA CGA TGC CGA CTA GGG ATT GGC AGA CGT
Tetr_R_9_2	CGT CCT AGT CTC AAC CAT AAA CGA TGC CGA CTA GGG ATT GGC AGA CGT
Tetr_R_9_3	CGT CCT AGT CTC AAC CAT AAA CGA TGC CGA CTA GGG ATT GGC AGA CGT
Tetr_Mes_5	TTT TTT GAT GAC TCT GCC AGC ACC TTA TGA GAA ATC AAA GTT TTT GGG
Tetr_Mes_17	TTT TTT GAT GAC TCT GCC AGC ACC TTA TGA GAA ATC AAA GTT TTT GGG
Tetr_66_6	TTT TTT GAT GAC TCT GCC AGC ACC TTA TGA GAA ATC AAA GTT TTT GGG
Tetr_V_2_2	TTT TTT GAT GAC TCT GCC AGC ACC TTA TGA GAA ATC AAA GTT TTT GGG
Tetr_R_9_2	TTT TTT GAT GAC TCT GCC AGC ACC TTA TGA GAA ATC AAA GTT TTT GGG
Tetr_R_9_3	TTT TTT GAT GAC TCT GCC AGC ACC TTA TGA GAA ATC AAA GTT TTT GGG
Tetr_Mes_5	TTC CGG GGG GAG TAT GG- --- --T CGC AAG GCT GAA ACT TAA AGG --A
Tetr_Mes_17	TTC CGG GGG GAG TAT GG- --- --T CGC AAG GCT GAA ACT TAA AGG --A
Tetr_66_6	TTC CGG GGG GAG TAT GG- --- --T CGC AAG GCT GAA ACT TAA AGG --A
Tetr_V_2_2	TTC CGG GGG GAG TAT GG- --- --T CGC AAG GCT GAA ACT TAA AGG --A
Tetr_R_9_2	TTC CGG GGG GAG TAT GG- --- --T CGC AAG GCT GAA ACT TAA AGG --A
Tetr_R_9_3	TTC CGG GGG GAG TAT GG- --- --T CGC AAG GCT GAA ACT TAA AGG --A
Tetr_Mes_5	ATT GAC GGA A-- --G GGC AC- -CA CCA GG- CGT GG- --- --A GCC TGC
Tetr_Mes_17	ATT GAC GGA A-- --G GGC AC- -CA CCA GG- CGT GG- --- --A GCC TGC
Tetr_66_6	ATT GAC GGA A-- --G GGC AC- -CA CCA GG- CGT GG- --- --A GCC TGC
Tetr_V_2_2	ATT GAC GGA A-- --G GGC AC- -CA CCA GG- CGT GG- --- --A GCC TGC
Tetr_R_9_2	ATT GAC GGA A-- --G GGC AC- -CA CCA GG- CGT GG- --- --A GCC TGC
Tetr_R_9_3	ATT GAC GGA A-- --G GGC AC- -CA CCA GG- CGT GG- --- --A GCC TGC
Tetr_Mes_5	GG- --C TTA A-- -TT TGA CTC A-- ACA CGG GAA AAC TTA -CC AGG TCC
Tetr_Mes_17	GG- --C TTA A-- -TT TGA CTC A-- ACA CGG GAA AAC TTA -CC AGG TCC
Tetr_66_6	GG- --C TTA A-- -TT TGA CTC A-- ACA CGG GAA AAC TTA -CC AGG TCC
Tetr_V_2_2	GG- --C TTA A-- -TT TGA CTC A-- ACA CGG GAA AAC TTA -CC AGG TCC
Tetr_R_9_2	GG- --C TTA A-- -TT TGA CTC A-- ACA CGG GAA AAC TTA -CC AGG TCC
Tetr_R_9_3	GG- --C TTA A-- -TT TGA CTC A-- ACA CGG GAA AAC TTA -CC AGG TCC

Πίνακας 8. Συνέχεια.

Tetr_Mes_5	AGA	CAT	AGT	G--	AGG	A--	--T	TGA	CAG	ATT	GAG	AGC	TCT	TTC	TT-	---
Tetr_Mes_17	AGA	CAT	AGT	G--	AGG	A--	--T	TGA	CAG	ATT	GAG	AGC	TCT	TTC	TT-	---
Tetr_66_6	AGA	CAT	AGT	G--	AGG	A--	--T	TGA	CAG	ATT	GAG	AGC	TCT	TTC	TT-	---
Tetr_V_2_2	AGA	CAT	AGT	G--	AGG	A--	--T	TGA	CAG	ATT	GAG	AGC	TCT	TTC	TT-	---
Tetr_R_9_2	AGA	CAT	AGT	G--	AGG	A--	--T	TGA	CAG	ATT	GAG	AGC	TCT	TTC	TT-	---
Tetr_R_9_3	AGA	CAT	AGT	G--	AGG	A--	--T	TGA	CAG	ATT	GAG	AGC	TCT	TTC	TT-	---
Tetr_Mes_5	GAT	TCT	ATG	GG-	-TG	GTG	GTG	CAT	GGC	CGT	-TC	TTA	GTT	GGT	GGG	TT-
Tetr_Mes_17	GAT	TCT	ATG	GG-	-TG	GTG	GTG	CAT	GGC	CGT	-TC	TTA	GTT	GGT	GGG	TT-
Tetr_66_6	GAT	TCT	ATG	GG-	-TG	GTG	GTG	CAT	GGC	CGT	-TC	TTA	GTT	GGT	GGG	TT-
Tetr_V_2_2	GAT	TCT	ATG	GG-	-TG	GTG	GTG	CAT	GGC	CGT	-TC	TTA	GTT	GGT	GGG	TT-
Tetr_R_9_2	GAT	TCT	ATG	GG-	-TG	GTG	GTG	CAT	GGC	CGT	-TC	TTA	GTT	GGT	GGG	TT-
Tetr_R_9_3	GAT	TCT	ATG	GG-	-TG	GTG	GTG	CAT	GGC	CGT	-TC	TTA	GTT	GGT	GGG	TT-
Tetr_Mes_5	-GC	CTT	GTC	AGG	TT-	---	---	GAT	T-C	CGG	TAA	CGA	ACG	AGA	CCT	CAG
Tetr_Mes_17	-GC	CTT	GTC	AGG	TT-	---	---	GAT	T-C	CGG	TAA	CGA	ACG	AGA	CCT	CAG
Tetr_66_6	-GC	CTT	GTC	AGG	TT-	---	---	GAT	T-C	CGG	TAA	CGA	ACG	AGA	CCT	CAG
Tetr_V_2_2	-GC	CTT	GTC	AGG	TT-	---	---	GAT	T-C	CGG	TAA	CGA	ACG	AGA	CCT	CAG
Tetr_R_9_2	-GC	CTT	GTC	AGG	TT-	---	---	GAT	T-C	CGG	TAA	CGA	ACG	AGA	CCT	CAG
Tetr_R_9_3	-GC	CTT	GTC	AGG	TT-	---	---	GAT	T-C	CGG	TAA	CGA	ACG	AGA	CCT	CAG
Tetr_Mes_5	CCT	GCT	AAA	---	--T	AGT	TAC	TCC	TAC	---	TTT	GGT	---	-AG	GAG	GC-
Tetr_Mes_17	CCT	GCT	AAA	---	--T	AGT	TAC	TCC	TAC	---	TTT	GGT	---	-AG	GAG	GC-
Tetr_66_6	CCT	GCT	AAA	---	--T	AGT	TAC	TCC	TAC	---	CTT	GGT	---	-AG	GAG	GC-
Tetr_V_2_2	CCT	GCT	AAA	---	--T	AGT	TAC	TCC	TAC	---	TTT	GGT	---	-AG	GAG	GC-
Tetr_R_9_2	CCT	GCT	AAA	---	--T	AGT	TAC	TCC	TAC	---	TTT	GGT	---	-AG	GAG	GC-
Tetr_R_9_3	CCT	GCT	AAA	---	--T	AGT	TAC	TCC	TAC	---	TTT	GGT	---	-AG	GAG	GC-
Tetr_Mes_5	GAA	CTT	CTT	AGA	GGG	ACT	-AT	TGG	CGT	T--	-TA	GCC	AAT	-GG	AAG	TGT
Tetr_Mes_17	GAA	CTT	CTT	AGA	GGG	ACT	-AT	TGG	CGT	T--	-TA	GCC	AAT	-GG	AAG	TGT
Tetr_66_6	GAA	CTT	CTT	AGA	GGG	ACT	-AT	TGG	CGT	T--	-TA	GCC	AAT	-GG	AAG	TGT
Tetr_V_2_2	GAA	CTT	CTT	AGA	GGG	ACT	-AT	TGG	CGT	T--	-TA	GCC	AAT	-GG	AAG	TGT
Tetr_R_9_2	GAA	CTT	CTT	AGA	GGG	ACT	-AT	TGG	CGT	T--	-TA	GCC	AAT	-GG	AAG	TGT
Tetr_R_9_3	GAA	CTT	CTT	AGA	GGG	ACT	-AT	TGG	CGT	T--	-TA	GCC	AAT	-GG	AAG	TGT
Tetr_Mes_5	GAG	GCA	ATA	ACA	GGT	--C	TGT	GAT	---	-GC	CCT	TAG	ATG	TTC	TGG	GCC
Tetr_Mes_17	GAG	GCA	ATA	ACA	GGT	--C	TGT	GAT	---	-GC	CCT	TAG	ATG	TTC	TGG	GCC
Tetr_66_6	GAG	GCA	ATA	ACA	GGT	--C	TGT	GAT	---	-GC	CCT	TAG	ATG	TTC	TGG	GCC
Tetr_V_2_2	GAG	GCA	ATA	ACA	GGT	--C	TGT	GAT	---	-GC	CCT	TAG	ATG	TTC	TGG	GCC
Tetr_R_9_2	GAG	GCA	ATA	ACA	GGT	--C	TGT	GAT	---	-GC	CCT	TAG	ATG	TTC	TGG	GCC
Tetr_R_9_3	GAG	GCA	ATA	ACA	GGT	--C	TGT	GAT	---	-GC	CCT	TAG	ATG	TTC	TGG	GCC
Tetr_Mes_5	GCA	CG-	CGC	GCT	ACA	CTG	ATG	CAT	TCA	ACG	AGC	CTA	G--	CCT	TGA	C-C
Tetr_Mes_17	GCA	CG-	CGC	GCT	ACA	CTG	ATG	CAT	TCA	ACG	AGC	CTA	G--	CCT	TGA	C-C
Tetr_66_6	GCA	CG-	CGC	GCT	ACA	CTG	ATG	CAT	TCA	ACG	AGC	CTA	G--	CCT	TGA	C-C
Tetr_V_2_2	GCA	CG-	CGC	GCT	ACA	CTG	ATG	CAT	TCA	ACG	AGC	CTA	G--	CCT	TGA	C-C
Tetr_R_9_2	GCA	CG-	CGC	GCT	ACA	CTG	ATG	CAT	TCA	ACG	AGC	CTA	G--	CCT	TGA	C-C
Tetr_R_9_3	GCA	CG-	CGC	GCT	ACA	CTG	ATG	CAT	TCA	ACG	AGC	CTA	G--	CCT	TGA	C-C
Tetr_Mes_5	GAG	AGG	TCC	-GG	GTA	ATC	TT-	TGA	AAC	TGC	ATC	GTG	ATG	GGG	CTA	GAT
Tetr_Mes_17	GAG	AGG	TCC	-GG	GTA	ATC	TT-	TGA	AAC	TGC	ATC	GTG	ATG	GGG	CTA	GAT
Tetr_66_6	GAG	AGG	TCC	-GG	GTA	ATC	TT-	TGA	AAC	TGC	ATC	GTG	ATG	GGG	CTA	GAT
Tetr_V_2_2	GAG	AGG	TCC	-GG	GTA	ATC	TT-	TGA	AAC	TGC	ATC	GTG	ATG	GGG	CTA	GAT
Tetr_R_9_2	GAG	AGG	TCC	-GG	GTA	ATC	TT-	TGA	AAC	TGC	ATC	GTG	ATG	GGG	CTA	GAT
Tetr_R_9_3	GAG	AGG	TCC	-GG	GTA	ATC	TT-	TGA	AAC	TGC	ATC	GTG	ATG	GGG	CTA	GAT

Πίνακας 8. Συνέχεια.

Tetr_Mes_5	TAT TGC A-- ATT ATT AAT CTT CAA CGA GGA ATG CCT AGT AAG CGT GAT
Tetr_Mes_17	TAT TGC A-- ATT ATT AAT CTT CAA CGA GGA ATG CCT AGT AAG CGT GAT
Tetr_66_6	TAT TGC A-- ATT ATT AAT CTT CAA CGA GGA ATG CCT AGT AAG CGT GAT
Tetr_V_2_2	TAT TGC A-- ATT ATT AAT CTT CAA CGA GGA ATG CCT AGT AAG CGT GAT
Tetr_R_9_2	TAT TGC A-- ATT ATT AAT CTT CAA CGA GGA ATG CCT AGT AAG CGT GAT
Tetr_R_9_3	TAT TGC A-- ATT ATT AAT CTT CAA CGA GGA ATG CCT AGT AAG CGT GAT
Tetr_Mes_5	TCA TCA AAT CGC GTT GAT TAC GTC CCT -GC CCT TTG TAC ACA CCG CCC
Tetr_Mes_17	TCA TCA AAT CGC GTT GAT TAC GTC CCT -GC CCT TTG TAC ACA CCG CCC
Tetr_66_6	TCA TCA AAT CGC GTT GAT TAC GTC CCT -GC CCT TTG TAC ACA CCG CCC
Tetr_V_2_2	TCA TCA AAT CGC GTT GAT TAC GTC CCT -GC CCT TTG TAC ACA CCG CCC
Tetr_R_9_2	TCA TCA AAT CGC GTT GAT TAC GTC CCT -GC CCT TTG TAC ACA CCG CCC
Tetr_R_9_3	TCA TCA AAT CGC GTT GAT TAC GTC CCT -GC CCT TTG TAC ACA CCG CCC
Tetr_Mes_5	GT- -CG CTC CTA CCG ATT GAG TGT GTT GGT GAG GAG TTC GGA TTG ACT
Tetr_Mes_17	GT- -CG CTC CTA CCG ATT GAG TGT GTT GGT GAG GAG TTC GGA TTG ACT
Tetr_66_6	GT- -CG CTC CTA CCG ATT GAG TGT GTT GGT GAG GAG TTC GGA TTG GCT
Tetr_V_2_2	GT- -CG CTC CTA CCG ATT GAG TGT GTT GGT GAG GAG TTC GGA TTG GCT
Tetr_R_9_2	GT- -CG CTC CTA CCG ATT GAG TGT GTT GGT GAG GAG TTC GGA TTG GCT
Tetr_R_9_3	GT- -CG CTC CTA CCG ATT GAG TGT GTT GGT GAG GAG TTC GGA TTG GCT
Tetr_Mes_5	CTT AGT GGT GG
Tetr_Mes_17	CTT AGT GG- --
Tetr_66_6	CTT AGT GGT GG
Tetr_V_2_2	CTT AG- --- --
Tetr_R_9_2	CTT A-- --- --
Tetr_R_9_3	CTT AGT GGT --

Το μη-ριζωμένο (unrooted) Μπεϋζιανό δέντρο που προέκυψε από τη φυλογενετική ανάλυση, παρουσιάζεται στην Εικόνα 43. Οι αναγραφόμενες τιμές αντιπροσωπεύουν την “εκ των υστέρων πιθανότητα” (posterior probability) και αποτελούν ένδειξη της δομικής ακεραιότητας της τοπολογίας των κλάδων ως % ποσοστό. Τιμές <0,5 παραλείπονται. Το δέντρο δεν είναι πλήρως επιλυμένο κυρίως όσον αφορά στην τοπολογία των κλάδων των διαφόρων ομάδων των χλωροφυκών (κλαδος UTC). Ωστόσο, αρκετοί από τους κλάδους του εμφανίζουν ισχυρή στατιστική υποστήριξη (>80%). Συγκεκριμένα, ο κλάδος των πρασινοφυκών (subphylum Prasinophytina), ο οποίος περιλαμβάνει τα “γνήσια πρασινοφύκη” που προηγουμένως ανήκαν στην παραφυλετική κλάση Prasinophyceae, διαχωρίζεται από τον κλάδο των Χλωροδενδροφυκών (Τάξη Chlorodendrophyceae) με ισχυρή υποστήριξη (100%) (Εικόνα 43). Επιπλέον, οι κλάδοι που συνδέουν όλες τις αλληλουχίες *Tetraselmis* καθώς και οι κλάδοι που συνδέουν τα στελέχη AthU-AI μεταξύ τους εμφανίζουν ισχυρή υποστήριξη (98-100%). Η μόνη χαμηλή τιμή εμφανίζεται στην τοπολογία του κλάδου που συνδέει το στέλεχος CCAP 66/6 με τα στελέχη AthU-AI V 2-2 και R 9-3 (73%). Ωστόσο, η ανάλυση υποδεικνύει την ισχυρή ομαδοποίηση (100%) των πέντε μελετηθέντων στελεχών μεταξύ τους και με το είδος *T. verrucosa* f. *rubens* σε έναν μονοφυλετικό κλάδο εντός του κλάδου των Χλωροδενδροφυκών (Εικόνα 43).

Πίνακας 9. Γενετικές αποστάσεις των συμπεριληφθέντων στην φυλογενετική ανάλυση αλληλουχιών του γονιδίου rbcL (Kimura 2-Parameter).

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)	(30)	(31)	(32)	(33)	(34)	(35)	(36)	(37)	(38)	(39)	(40)												
(1) Acet_acetabulum																																																				
(2) Ank_stip_	0,12																																																			
(3) Asco_mul	0,22	0,21																																																		
(4) Aster_phycob	0,19	0,18	0,18																																																	
(5) Aux_prot_SAG	0,20	0,20	0,19	0,00																																																
(6) Aux_prot_UTEX	0,21	0,21	0,22	0,22	0,22																																															
(7) Botr_brau	0,11	0,12	0,19	0,15	0,16	0,20																																														
(8) Bract_sp	0,21	0,18	0,24	0,19	0,20	0,30	0,22																																													
(9) Bryo_plum	0,21	0,20	0,22	0,19	0,20	0,19	0,17	0,22																																												
(10) Bulb_sp	0,14	0,14	0,20	0,14	0,16	0,22	0,13	0,19	0,19																																											
(11) Cart_cruc	0,27	0,26	0,26	0,22	0,23	0,30	0,23	0,24	0,27	0,24																																										
(12) Ceph_vir	0,26	0,23	0,35	0,30	0,30	0,35	0,27	0,37	0,31	0,27	0,37																																									
(13) Chara_sas	0,13	0,11	0,20	0,15	0,17	0,21	0,12	0,21	0,17	0,12	0,26	0,26																																								
(14) Chlam_rein	0,12	0,11	0,20	0,21	0,22	0,19	0,13	0,27	0,17	0,15	0,26	0,28	0,09																																							
(15) Chlor_vul_NIES	0,17	0,16	0,19	0,12	0,13	0,20	0,14	0,17	0,19	0,15	0,23	0,30	0,15	0,18																																						
(16) Chlor_vul_SAG	0,17	0,16	0,20	0,12	0,13	0,20	0,14	0,17	0,18	0,15	0,22	0,30	0,15	0,18	0,00																																					
(17) Chloro_lem	0,10	0,11	0,20	0,18	0,18	0,21	0,10	0,22	0,16	0,14	0,26	0,25	0,11	0,11	0,17	0,16																																				
(18) Chloro_ret	0,17	0,17	0,20	0,18	0,19	0,23	0,16	0,23	0,22	0,16	0,23	0,30	0,15	0,16	0,19	0,19	0,17																																			
(19) Chlorog_eu	0,13	0,12	0,21	0,19	0,20	0,23	0,15	0,26	0,19	0,17	0,29	0,29	0,12	0,12	0,20	0,20	0,14	0,19																																		
(20) Chlorosrc_ere	0,11	0,08	0,20	0,17	0,18	0,21	0,11	0,23	0,17	0,14	0,23	0,26	0,09	0,09	0,17	0,17	0,10	0,16	0,11																																	
(21) Chlorot_inc	0,11	0,12	0,19	0,18	0,18	0,18	0,11	0,21	0,17	0,14	0,26	0,28	0,12	0,12	0,16	0,16	0,09	0,17	0,13	0,09																																
(22) Chori_min	0,17	0,17	0,23	0,22	0,23	0,24	0,16	0,24	0,20	0,19	0,29	0,31	0,18	0,17	0,17	0,17	0,16	0,19	0,19	0,17	0,17																															
(23) Cocco_sub	0,23	0,23	0,19	0,23	0,23	0,23	0,21	0,32	0,25	0,23	0,31	0,35	0,23	0,19	0,24	0,24	0,23	0,22	0,23	0,22	0,22	0,21																														
(24) Cod_plat	0,22	0,25	0,28	0,22	0,21	0,29	0,23	?	0,25	0,22	0,17	0,28	0,25	0,27	0,24	0,24	0,23	0,26	0,28	0,25	0,24	0,25	0,34																													
(25) Crust_stig	0,29	0,28	0,34	0,34	0,35	0,29	0,30	0,41	0,33	0,33	0,39	0,36	0,28	0,26	0,33	0,33	0,31	0,31	0,29	0,28	0,30	0,24	0,27	0,42																												
(26) Desm_serr	0,15	0,12	0,20	0,17	0,17	0,20	0,13	0,23	0,18	0,14	0,28	0,29	0,12	0,13	0,16	0,16	0,12	0,19	0,14	0,12	0,10	0,21	0,27	0,23	0,35																											
(27) Dict_sple_CAUP	0,32	0,32	0,28	0,31	0,31	0,26	0,28	0,55	0,28	0,29	0,37	0,38	0,32	0,28	0,28	0,28	0,31	0,31	0,31	0,31	0,30	0,30	0,26	0,37	0,35	0,31																										
(28) Dict_sple_SAG	0,21	0,24	0,26	0,26	0,26	0,25	0,22	0,27	0,24	0,21	0,24	0,30	0,25	0,24	0,25	0,25	0,24	0,27	0,25	0,23	0,23	0,26	0,26	0,24	0,39	0,21	0,29																									
(29) Dun_sal	0,13	0,12	0,21	0,16	0,17	0,23	0,14	0,21	0,18	0,12	0,25	0,27	0,12	0,13	0,17	0,17	0,12	0,15	0,13	0,11	0,12	0,17	0,23	0,24	0,31	0,12	0,33	0,24																								
(30) Eud_ele	0,12	0,11	0,19	0,18	0,20	0,19	0,12	0,22	0,17	0,14	0,25	0,28	0,10	0,08	0,16	0,16	0,13	0,16	0,12	0,10	0,10	0,17	0,19	0,26	0,28	0,13	0,29	0,23	0,12																							
(31) Gem_min	0,18	0,19	0,19	0,15	0,15	0,22	0,17	0,18	0,20	0,15	0,17	0,30	0,18	0,21	0,14	0,14	0,20	0,19	0,21	0,18	0,18	0,22	0,27	0,17	0,39	0,17	0,32	0,22	0,20	0,18																						
(32) Gloe_planc_SAG	0,20	0,21	0,23	0,20	0,21	0,27	0,22	0,21	0,24	0,19	0,27	0,28	0,21	0,21	0,18	0,18	0,22	0,22	0,23	0,23	0,19	0,22	0,30	0,26	0,34	0,21	0,37	0,26	0,20	0,21	0,23																					
(33) Haf_laev	0,16	0,15	0,26	0,23	0,22	0,24	0,16	0,26	0,21	0,19	0,29	0,29	0,16	0,16	0,21	0,22	0,16	0,20	0,16	0,15	0,17	0,20	0,26	0,28	0,31	0,13	0,33	0,26	0,18	0,16	0,22	0,25																				
(34) Hamakko_caudatus	0,11	0,08	0,20	0,17	0,17	0,20	0,11	0,22	0,17	0,14	0,28	0,26	0,09	0,10	0,15	0,15	0,11	0,17	0,10	0,08	0,10	0,18	0,23	0,24	0,30	0,11	0,31	0,24	0,10	0,11	0,18	0,20	0,16																			
(35) Hydr_ret	0,14	0,14	0,21	0,19	0,20	0,22	0,14	0,20	0,19	0,17	0,23	0,30	0,16	0,15	0,17	0,17	0,14	0,19	0,15	0,12	0,10	0,19	0,22	0,26	0,32	0,11	0,2																									

Πίνακας 9. Συνέχεια

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)	(30)	(31)	(32)	(33)	(34)	(35)	(36)	(37)	(38)	(39)	(40)
(42) Oedog_car	0,20	0,20	0,21	0,19	0,20	0,21	0,16	0,21	0,03	0,19	0,27	0,30	0,17	0,16	0,17	0,18	0,16	0,22	0,19	0,17	0,17	0,21	0,25	0,23	0,31	0,18	0,28	0,24	0,20	0,16	0,20	0,23	0,20	0,17	0,19	0,25	0,18	0,16	0,16	0,19
(43) Oltman_vir	0,15	0,14	0,20	0,19	0,20	0,22	0,14	0,23	0,20	0,15	0,28	0,29	0,14	0,14	0,16	0,16	0,12	0,20	0,15	0,13	0,13	0,16	0,23	0,26	0,30	0,15	0,32	0,28	0,15	0,14	0,19	0,21	0,15	0,14	0,17	0,25	0,13	0,17	0,12	0,18
(44) Ouro_multi	0,07	0,12	0,20	0,18	0,19	0,20	0,12	0,25	0,19	0,14	0,26	0,26	0,11	0,11	0,16	0,16	0,09	0,16	0,12	0,09	0,09	0,17	0,22	0,23	0,30	0,13	0,30	0,23	0,12	0,11	0,17	0,20	0,15	0,10	0,13	0,27	0,08	0,15	0,11	0,17
(45) Pabia_sig	0,19	0,21	0,19	0,15	0,16	0,23	0,16	0,19	0,20	0,17	0,21	0,30	0,18	0,20	0,15	0,15	0,20	0,18	0,20	0,18	0,17	0,21	0,25	0,24	0,33	0,17	0,32	0,25	0,16	0,18	0,15	0,21	0,24	0,17	0,18	0,30	0,19	0,16	0,21	0,16
(46) Ped_dup	0,14	0,14	0,19	0,19	0,19	0,21	0,13	0,20	0,18	0,17	0,23	0,29	0,16	0,14	0,17	0,17	0,11	0,19	0,15	0,11	0,09	0,17	0,21	0,25	0,31	0,11	0,29	0,22	0,13	0,14	0,18	0,21	0,18	0,12	0,03	0,26	0,13	0,14	0,13	0,18
(47) Pedi_min	0,14	0,15	0,20	0,19	0,20	0,20	0,13	0,24	0,20	0,17	0,27	0,27	0,14	0,13	0,15	0,15	0,13	0,19	0,16	0,12	0,13	0,16	0,21	0,26	0,28	0,15	0,28	0,23	0,14	0,14	0,19	0,22	0,17	0,13	0,17	0,25	0,13	0,15	0,14	0,16
(48) Pico_ocul	0,16	0,18	0,19	0,12	0,13	0,21	0,14	0,17	0,16	0,15	0,24	0,29	0,15	0,17	0,12	0,12	0,14	0,20	0,17	0,17	0,16	0,17	0,22	0,24	0,31	0,17	0,29	0,23	0,15	0,16	0,16	0,22	0,20	0,14	0,18	0,29	0,15	0,12	0,17	0,17
(49) Pras_cri_GAL	0,20	0,22	0,21	0,17	0,17	0,24	0,17	0,19	0,20	0,19	0,23	0,31	0,20	0,21	0,18	0,18	0,21	0,19	0,21	0,20	0,19	0,22	0,26	0,20	0,36	0,24	0,32	0,25	0,20	0,20	0,17	0,22	0,25	0,20	0,21	0,30	0,22	0,20	0,21	0,19
(50) Pras_cri_SAG	0,20	0,21	0,21	0,16	0,16	0,24	0,17	0,18	0,19	0,18	0,23	0,30	0,19	0,21	0,17	0,17	0,20	0,19	0,20	0,19	0,18	0,22	0,26	0,19	0,35	0,24	0,32	0,24	0,19	0,17	0,22	0,25	0,20	0,21	0,30	0,21	0,20	0,20	0,19	
(51) Prasino_sp	0,24	0,20	0,22	0,21	0,22	0,27	0,19	0,21	0,23	0,21	0,27	0,30	0,20	0,20	0,21	0,20	0,20	0,23	0,23	0,18	0,19	0,22	0,28	0,29	0,30	0,21	0,31	0,28	0,21	0,21	0,23	0,25	0,22	0,20	0,23	0,24	0,23	0,17	0,18	0,21
(52) Prot_botr_FRT	0,11	0,07	0,21	0,17	0,19	0,22	0,12	0,23	0,19	0,15	0,27	0,27	0,09	0,11	0,16	0,16	0,10	0,18	0,10	0,09	0,11	0,17	0,23	0,27	0,28	0,11	0,31	0,25	0,11	0,10	0,19	0,21	0,14	0,07	0,13	0,26	0,09	0,15	0,12	0,19
(53) Prot_botr_UTEX	0,11	0,07	0,21	0,17	0,19	0,22	0,12	0,23	0,18	0,14	0,27	0,26	0,10	0,11	0,17	0,17	0,10	0,18	0,10	0,09	0,10	0,17	0,23	0,26	0,29	0,11	0,30	0,24	0,11	0,10	0,19	0,21	0,13	0,07	0,13	0,26	0,09	0,14	0,12	0,19
(54) Pseudos_anti	0,11	0,13	0,21	0,19	0,20	0,21	0,11	0,24	0,19	0,15	0,24	0,28	0,13	0,12	0,17	0,17	0,11	0,16	0,15	0,11	0,11	0,17	0,24	0,27	0,30	0,14	0,31	0,25	0,13	0,14	0,19	0,22	0,18	0,13	0,14	0,24	0,12	0,14	0,12	0,18
(55) Pseudosc_mar	0,26	0,24	0,27	0,29	0,30	0,23	0,23	0,37	0,28	0,27	0,36	0,37	0,24	0,22	0,27	0,27	0,23	0,29	0,26	0,24	0,25	0,25	0,24	0,39	0,23	0,28	0,29	0,32	0,27	0,25	0,31	0,35	0,28	0,24	0,28	0,19	0,25	0,26	0,26	0,27
(56) Pycn_prov	0,26	0,24	0,27	0,27	0,28	0,23	0,22	0,32	0,28	0,26	0,36	0,37	0,23	0,21	0,26	0,26	0,23	0,28	0,25	0,23	0,25	0,25	0,24	0,38	0,23	0,27	0,29	0,32	0,27	0,24	0,30	0,32	0,26	0,24	0,28	0,19	0,24	0,25	0,24	0,26
(57) Pyr_tetr	0,22	0,22	0,24	0,21	0,21	0,24	0,21	0,25	0,24	0,20	0,27	0,31	0,21	0,20	0,19	0,19	0,22	0,20	0,23	0,23	0,22	0,22	0,29	0,25	0,33	0,25	0,37	0,28	0,22	0,20	0,24	0,26	0,21	0,24	0,32	0,24	0,22	0,26	0,22	
(58) Ros_pol	0,22	0,23	0,21	0,17	0,18	0,24	0,19	0,18	0,21	0,20	0,23	0,32	0,21	0,22	0,18	0,18	0,22	0,22	0,22	0,21	0,19	0,24	0,27	0,20	0,35	0,21	0,33	0,26	0,21	0,22	0,17	0,22	0,26	0,21	0,21	0,32	0,21	0,22	0,22	0,20
(59) Scen_des	0,11	0,13	0,21	0,17	0,17	0,20	0,12	0,21	0,16	0,13	0,23	0,28	0,12	0,13	0,15	0,15	0,12	0,16	0,13	0,10	0,09	0,17	0,23	0,23	0,32	0,10	0,29	0,22	0,12	0,12	0,16	0,19	0,15	0,10	0,12	0,27	0,11	0,15	0,11	0,16
(60) Scherf_dub	0,18	0,20	0,21	0,19	0,19	0,22	0,18	0,20	0,21	0,20	0,24	0,33	0,18	0,19	0,16	0,16	0,21	0,20	0,21	0,19	0,17	0,20	0,27	0,26	0,30	0,21	0,36	0,26	0,20	0,18	0,19	0,22	0,25	0,20	0,19	0,30	0,21	0,17	0,20	0,20
(61) Selenastrum_sp	0,08	0,10	0,18	0,19	0,19	0,23	0,11	0,22	0,16	0,12	0,25	0,26	0,09	0,11	0,16	0,16	0,09	0,15	0,12	0,09	0,10	0,13	0,23	0,20	0,30	0,10	0,33	0,23	0,12	0,11	0,18	0,19	0,14	0,09	0,13	0,26	0,04	0,13	0,11	0,17
(62) Sphaerop_sp	0,12	0,13	0,20	0,16	0,16	0,20	0,10	0,24	0,19	0,14	0,25	0,27	0,12	0,13	0,16	0,16	0,11	0,16	0,15	0,12	0,11	0,16	0,20	0,24	0,31	0,13	0,28	0,22	0,14	0,13	0,18	0,22	0,18	0,13	0,12	0,26	0,12	0,14	0,12	0,16
(63) Staur_tet	0,11	0,11	0,20	0,19	0,18	0,21	0,10	0,19	0,19	0,13	0,25	0,30	0,12	0,11	0,16	0,16	0,11	0,15	0,14	0,10	0,08	0,17	0,23	0,22	0,32	0,11	0,36	0,26	0,10	0,11	0,17	0,18	0,17	0,08	0,07	0,29	0,12	0,13	0,13	0,14
(64) Tetr_66_6	0,21	0,17	0,27	0,25	0,22	0,24	0,19	?	0,24	0,23	0,37	0,29	0,22	0,22	0,20	0,20	0,19	0,25	0,25	0,19	0,21	0,20	0,31	0,26	0,32	?	0,28	0,28	0,31	0,21	0,21	0,25	0,22	0,19	0,27	0,19	?	0,24	0,19	0,25
(65) Tetr_Mes_17	0,19	0,17	0,26	0,19	0,18	0,25	0,20	?	0,26	0,23	0,20	0,28	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,24	0,21	0,20	0,21	0,21	0,31	0,24	0,34	?	0,33	0,28	0,28	0,22	0,22	0,24	0,22	0,19	0,25	0,20	?	0,23	0,20	0,27
(66) Tetr_Mes_5	0,19	0,17	0,26	0,19	0,18	0,25	0,20	?	0,26	0,23	0,20	0,28	0,22	0,22	0,22	0,22	0,24	0,21	0,20	0,21	0,21	0,31	0,24	0,34	?	0,33	0,28	0,28	0,22	0,22	0,24	0,22	0,19	0,25	0,20	?	0,23	0,20	0,28	
(67) Tetr_R_9_2	0,18	0,13	0,26	?	0,16	0,14	0,18	?	0,26	0,22	?	?	0,22	0,21	0,20	0,20	0,18	0,30	0,21	0,16	0,17	0,19	?	0,22	0,25	?	?	?	?	0,20	0,17	0,23	0,18	0,16	0,26	0,07	?	0,20	0,15	0,20
(68) Tetr_R_9_3	0,20	0,15	0,31	0,24	0,20	0,23	0,19	?	0,23	0,20	0,28	0,22	0,24	0,21	0,20	0,20	0,19	0,28	0,27	0,19	0,21	0,21	0,32	0,23	0,31	?	0,28	0,26	0,27	0,21	0,20	0,23	0,20	0,18	0,28	0,14	?	0,25	0,18	0,24
(69) Tetr_sp_S028	0,14	0,14	0,21	0,17	0,17	0,24	0,14	0,22	0,18	0,14	0,27	0,28	0,13	0,14	0,16	0,15	0,15	0,16	0,13	0,15	0,16	0,17	0,23	0,26	0,31	0,17	0,36	0,22	0,15	0,13	0,19	0,20	0,19	0,14	0,17	0,30	0,12	0,14	0,16	0,19
(70) Tetr_sp_S057	0,13	0,13	0,18	0,18	0,18	0,23	0,13	0,25	0,17	0,14	0,26	0,29	0,13	0,12	0,17	0,17	0,13	0,15	0,12	0,13	0,13	0,16	0,22	0,25	0,29	0,16	0,35	0,25	0,13	0,11	0,19	0,22	0,17	0,13	0,16	0,27	0,11	0,14	0,15	0,17
(71) Tetr_sp_S075	0,15	0,16	0,20	0,16	0,16	0,22	0,17	0,16	0,18	0,15	0,25	0,30	0,17	0,17	0,15	0,15	0,17	0,18	0,16	0,16	0,18	0,19	0,23	0,19	0,33	0,18	0,35	0,23	0,16	0,17	0,18	0,20	0,21	0,15	0,15	0,33	0,13	0,13	0,18	0,21
(72) Tetr_sp_S081	0,12	0,12	0,19	0,17	0,17	0,24	0,14	0,22	0,18	0,14	0,27	0,28	0,13	0,14	0,15	0,15	0,13	0,16	0,12	0,15	0,14	0,15	0,22	0,25	0,30	0,16	0,33	0,26	0,14	0,13	0,19	0,20	0,17	0,12	0,16	0,31	0,10	0,13	0,13	0,19
(73) Tetr_sp_S082	0,14	0,14	0,21	0,17	0,17	0,24	0,14	0,22	0,18	0,14	0,27	0,28	0,13	0,14	0,16	0,15	0,15	0,16	0,13	0,15	0,16	0,17	0,23	0,26	0,31	0,17	0,36	0,22	0,15	0,13	0,19	0,20	0,19	0,14	0,17	0,30	0,12	0,14	0,1	

Πίνακας 9. Συνέχεια

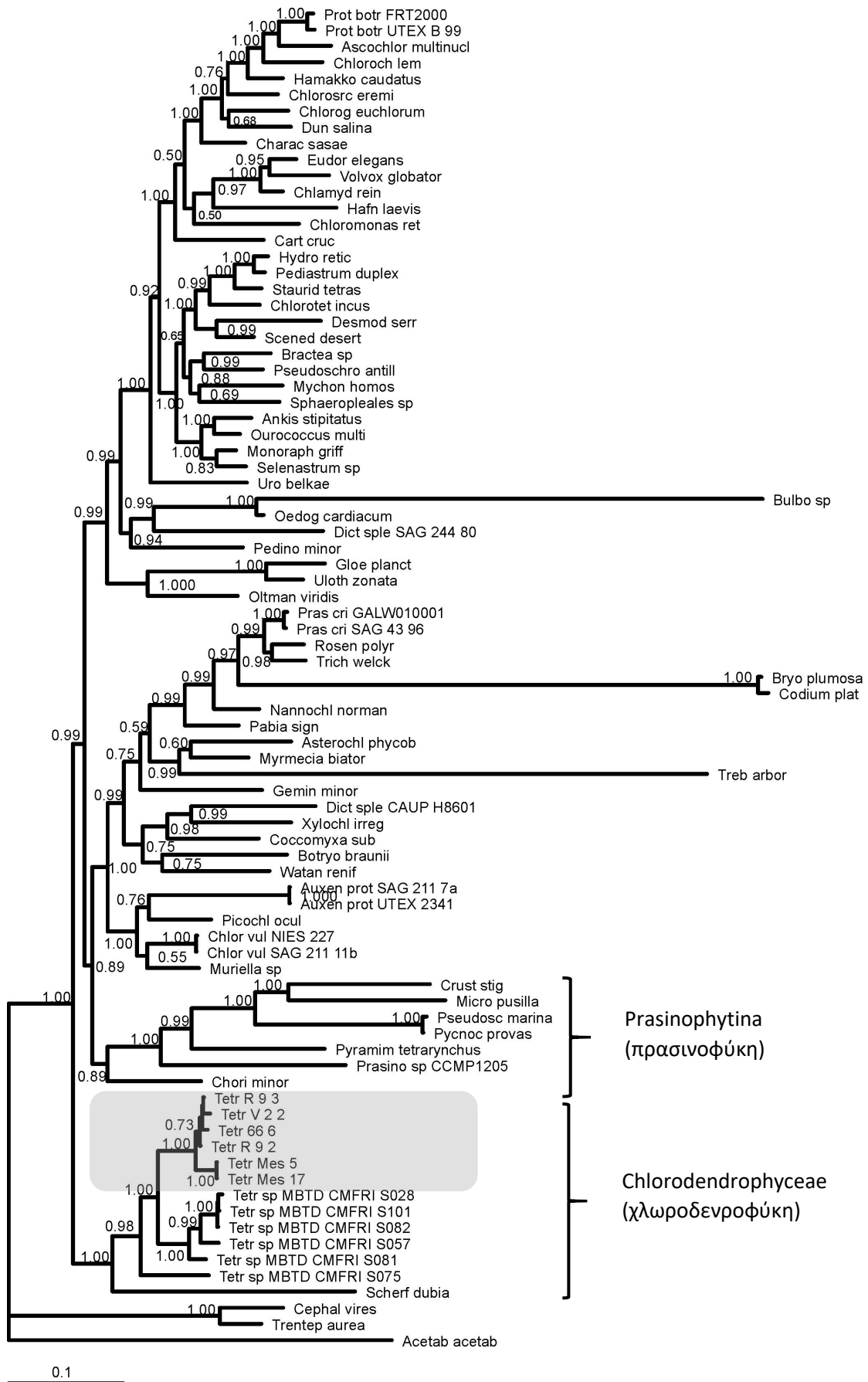
	(41)	(42)	(43)	(44)	(45)	(46)	(47)	(48)	(49)	(50)	(51)	(52)	(53)	(54)	(55)	(56)	(57)	(58)	(59)	(60)	(61)	(62)	(63)	(64)	(65)	(66)	(67)	(68)	(69)	(70)	(71)	(72)	(73)	(74)	(75)	(76)	(77)	(78)	(79)	(80)	(81)	(82)				
(42) Oedog_car	0,21																																													
(43) Oltman_vir	0,21	0,19																																												
(44) Ouro_multi	0,19	0,17	0,12																																											
(45) Pabia_sig	0,13	0,19	0,19	0,18																																										
(46) Ped_dup	0,19	0,18	0,16	0,13	0,18																																									
(47) Ped_min	0,20	0,18	0,15	0,13	0,18	0,16																																								
(48) Pico_ocul	0,17	0,16	0,16	0,16	0,18	0,17	0,15																																							
(49) Pras_cri_GAL	0,14	0,20	0,21	0,19	0,16	0,20	0,21	0,18																																						
(50) Pras_cri_SAG	0,14	0,20	0,21	0,19	0,16	0,20	0,21	0,17	0,01																																					
(51) Prasino_sp	0,24	0,23	0,20	0,21	0,23	0,22	0,17	0,19	0,25	0,25																																				
(52) Prot_botr_FRT	0,21	0,18	0,13	0,11	0,19	0,13	0,13	0,16	0,21	0,21	0,19																																			
(53) Prot_botr_UTEX	0,20	0,17	0,13	0,11	0,19	0,12	0,14	0,16	0,21	0,21	0,19	0,02																																		
(54) Pseudos_anti	0,19	0,18	0,15	0,11	0,19	0,14	0,16	0,17	0,22	0,21	0,20	0,11	0,11																																	
(55) Pseudosc_mar	0,30	0,27	0,26	0,27	0,28	0,27	0,23	0,26	0,32	0,32	0,28	0,26	0,26	0,25																																
(56) Pycn_prov	0,30	0,27	0,26	0,25	0,27	0,27	0,22	0,25	0,30	0,30	0,26	0,24	0,24	0,24	0,01																															
(57) Pyr_tetr	0,21	0,24	0,22	0,22	0,21	0,23	0,22	0,20	0,23	0,23	0,26	0,24	0,23	0,22	0,28	0,27																														
(58) Ros_pol	0,17	0,22	0,21	0,21	0,17	0,20	0,22	0,18	0,08	0,08	0,26	0,21	0,21	0,23	0,31	0,30	0,24																													
(59) Scen_des	0,17	0,16	0,13	0,11	0,17	0,11	0,14	0,15	0,18	0,18	0,20	0,11	0,11	0,13	0,28	0,27	0,20	0,18																												
(60) Scherf_dub	0,18	0,20	0,22	0,19	0,17	0,18	0,19	0,19	0,20	0,20	0,22	0,19	0,19	0,19	0,30	0,28	0,20	0,21	0,18																											
(61) Selenastrum_sp	0,20	0,16	0,11	0,08	0,18	0,11	0,12	0,16	0,21	0,21	0,18	0,09	0,08	0,10	0,24	0,23	0,22	0,21	0,09	0,18																										
(62) Sphaerosp	0,16	0,19	0,15	0,11	0,17	0,12	0,15	0,16	0,19	0,18	0,20	0,14	0,14	0,13	0,26	0,26	0,20	0,19	0,11	0,18	0,09																									
(63) Staur_tet	0,21	0,18	0,14	0,11	0,17	0,07	0,14	0,16	0,21	0,21	0,20	0,12	0,12	0,09	0,26	0,25	0,21	0,18	0,10	0,18	0,09	0,11																								
(64) Tetr_66_6	0,27	0,23	0,16	0,20	0,25	0,25	0,20	0,22	0,20	0,21	0,18	0,20	0,19	0,20	0,26	0,26	0,21	0,25	0,21	0,16	0,15	0,22	?																							
(65) Tetr_Mes_17	0,26	0,24	0,19	0,20	0,22	0,24	0,22	0,23	0,19	0,19	0,19	0,21	0,21	0,20	0,28	0,27	0,20	0,22	0,21	0,16	0,18	0,23	?	0,06																						
(66) Tetr_Mes_5	0,26	0,24	0,19	0,20	0,22	0,24	0,22	0,23	0,19	0,19	0,19	0,21	0,21	0,20	0,28	0,27	0,20	0,22	0,21	0,16	0,18	0,23	?	0,06	0,00																					
(67) Tetr_R_9_2	?	0,25	0,12	0,17	0,17	0,26	0,19	0,22	0,11	0,13	0,20	0,18	0,18	0,22	0,23	0,21	0,15	0,13	0,15	0,16	?	0,19	?	0,01	0,02	0,02																				
(68) Tetr_R_9_3	0,23	0,22	0,15	0,18	0,23	0,27	0,20	0,24	0,18	0,18	0,15	0,21	0,20	0,20	0,27	0,26	0,20	0,25	0,22	0,16	0,14	0,21	?	0,01	0,04	0,04	0,00																			
(69) Tetr_sp_S028	0,20	0,19	0,15	0,13	0,19	0,18	0,15	0,15	0,19	0,18	0,18	0,14	0,13	0,14	0,28	0,26	0,17	0,19	0,16	0,17	0,12	0,14	0,13	?	?	?	?	?																		
(70) Tetr_sp_S057	0,20	0,18	0,14	0,13	0,20	0,16	0,13	0,15	0,18	0,17	0,18	0,12	0,11	0,13	0,27	0,25	0,18	0,19	0,14	0,17	0,11	0,13	0,12	?	?	?	?	?	0,04																	
(71) Tetr_sp_S075	0,18	0,19	0,17	0,17	0,18	0,15	0,18	0,15	0,17	0,17	0,20	0,17	0,16	0,17	0,29	0,27	0,20	0,18	0,17	0,16	0,14	0,16	0,15	?	?	?	?	?	0,10	0,12																
(72) Tetr_sp_S081	0,20	0,18	0,14	0,12	0,20	0,17	0,14	0,15	0,20	0,19	0,17	0,12	0,11	0,13	0,29	0,27	0,21	0,18	0,14	0,18	0,11	0,14	0,13	?	?	?	?	?	0,05	0,04	0,11															
(73) Tetr_sp_S082	0,20	0,19	0,15	0,13	0,19	0,18	0,15	0,15	0,19	0,18	0,18	0,14	0,13	0,14	0,28	0,26	0,17	0,19	0,16	0,17	0,12	0,14	0,13	?	?	?	?	?	0,00	0,04	0,10	0,05														
(74) Tetr_sp_S101	0,20	0,19	0,15	0,13	0,19	0,18	0,15	0,15	0,19	0,18	0,18	0,14	0,13	0,14	0,28	0,26	0,17	0,19	0,16	0,17	0,12	0,14	0,13	?	?	?	?	?	0,00	0,04	0,10	0,05	0,00													
(75) Tetr_V_2_2	0,22	0,20	0,17	0,16	0,22	0,19	0,18	0,18	0,20	0,20	0,20	0,18	0,17	0,17	0,26	0,26	0,21	0,22	0,17	0,17	0,15	0,17	0,15	0,02	0,05	0,05	0,00	0,01	0,10	0,11	0,12	0,09	0,10	0,10												
(76) Treb_arb	0,16	0,18	0,17	0,16	0,15	0,17	0,17	0,17	0,16	0,16	0,20	0,18	0,17	0,17	0,26	0,24	0,21	0,18	0,15	0,19	0,16	0,16	0,17	0,21	0,22	0,22	0,11	0,22	0,17	0,16	0,19	0,18	0,17	0,17	0,21											
(77) Trent_aur	0,27	0,30	0,27	0,24	0,29	0,26	0,26	0,28	0,30	0,29	0,31	0,26	0,26	0,28	0,38	0,38	0,28	0,30	0,25	0,30	0,24	0,25	0,26	0,33	0,33	0,33	0,00	0,26	0,25	0,27	0,28	0,26	0,25	0,25	0,27	0,29										
(78) Trich_wel	0,15	0,21	0,22	0,21	0,16	0,21	0,22	0,18	0,08	0,07	0,26	0,22	0,22	0,23	0,34	0,33	0,23	0,08	0,19	0,21	0,23	0,20	0,20	0,23	0,19	0,19	0,04	0,23	0,21	0,20	0,18	0,20	0,21	0,21	0,23	0,18	0,29									
(79) Ulo_zon	0,20	0,22	0,19	0,20	0,20	0,20	0,20	0,21	0,20	0,19	0,24	0,20	0,19	0,21	0,30	0,27	0,23	0,22	0,18	0,21	0,18	0,21	0,18	0,24	0,24	0,24	0,24	0,22	0,19	0,20	0,20	0,19	0,19	0,19	0,19	0,22	0,20	0,30	0,21							
(80) Uro_bel	0,24	0,18	0,13	0,10	0,20	0,14	0,16	0,16	0,19	0,18	0,25	0,11	0,11	0,14	0,28	0,26	0,2																													

Πίνακας 10. Συνέχεια

(42)	Oedog_car	0,26	0,07	0,08	0,10	0,13	0,13	0,10	0,06	0,40	0,35	0,07	0,13	0,07	0,08	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,08	0,08	0,08	0,39	0,12	0,15	0,08	0,07	0,08	0,08	0,10	0,10	0,09	0,08	0,06	0,13	0,06	0,07	0,07	0,09			
(43)	Oltman_vir	0,25	0,09	0,08	0,09	0,11	0,12	0,10	0,08	0,43	0,42	0,10	0,13	0,09	0,10	0,07	0,08	0,08	0,09	0,09	0,10	0,10	0,09	0,08	0,43	0,14	0,12	0,08	0,09	0,08	0,11	0,09	0,08	0,10	0,09	0,09	0,08	0,10	0,09	0,09	0,14	0,09	0,07	0,10	0,07
(44)	Ouro_multi	0,26	0,02	0,06	0,09	0,12	0,12	0,08	0,05	0,40	0,40	0,06	0,13	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,05	0,07	0,08	0,39	0,12	0,12	0,07	0,08	0,07	0,08	0,09	0,10	0,08	0,07	0,04	0,13	0,01	0,06	0,05	0,08	0,08			
(45)	Pabia_sig	0,26	0,07	0,07	0,07	0,09	0,10	0,06	0,05	0,45	0,41	0,08	0,13	0,07	0,08	0,05	0,05	0,07	0,09	0,09	0,09	0,08	0,06	0,05	0,44	0,10	0,14	0,05	0,06	0,08	0,09	0,08	0,10	0,09	0,09	0,08	0,11	0,07	0,04	0,08	0,08	0,04			
(46)	Ped_dup	0,26	0,04	0,06	0,10	0,13	0,12	0,10	0,04	0,44	0,40	0,06	0,14	0,05	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,06	0,07	0,04	0,08	0,08	0,43	0,12	0,10	0,07	0,09	0,06	0,07	0,08	0,11	0,07	0,07	0,00	0,15	0,04	0,06	0,06	0,07				
(47)	Pedi_min	0,27	0,09	0,09	0,10	0,14	0,14	0,10	0,08	0,45	0,41	0,09	0,14	0,08	0,10	0,09	0,08	0,09	0,09	0,08	0,09	0,08	0,09	0,08	0,44	0,13	0,14	0,08	0,08	0,08	0,10	0,10	0,11	0,10	0,09	0,08	0,14	0,08	0,08	0,09	0,07				
(48)	Pico_ocul	0,25	0,08	0,08	0,07	0,08	0,09	0,07	0,06	0,45	0,42	0,08	0,12	0,07	0,08	0,03	0,03	0,07	0,08	0,07	0,08	0,09	0,06	0,06	0,44	0,11	0,14	0,06	0,07	0,07	0,09	0,07	0,10	0,08	0,09	0,08	0,13	0,08	0,04	0,08	0,04				
(49)	Pras_cri_GAL	0,25	0,07	0,07	0,07	0,10	0,10	0,06	0,06	0,38	0,42	0,07	0,13	0,06	0,08	0,05	0,05	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,05	0,04	0,37	0,11	0,15	0,05	0,07	0,07	0,08	0,07	0,09	0,08	0,09	0,07	0,11	0,07	0,05	0,07	0,03				
(50)	Pras_cri_SAG	0,25	0,08	0,07	0,06	0,09	0,10	0,06	0,05	0,42	0,41	0,08	0,13	0,07	0,08	0,05	0,05	0,07	0,08	0,08	0,09	0,09	0,05	0,04	0,42	0,10	0,15	0,05	0,07	0,07	0,09	0,07	0,09	0,09	0,09	0,09	0,08	0,11	0,08	0,05	0,08	0,03			
(51)	Prasino_sp	0,29	0,15	0,12	0,13	0,16	0,17	0,14	0,11	0,49	0,46	0,13	0,15	0,14	0,14	0,12	0,11	0,12	0,14	0,15	0,15	0,15	0,12	0,13	0,48	0,13	0,19	0,12	0,14	0,13	0,15	0,14	0,15	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,12	0,14	0,14	
(52)	Prot_botr_FRT	0,26	0,08	0,03	0,10	0,15	0,14	0,11	0,07	0,46	0,43	0,07	0,14	0,05	0,07	0,09	0,09	0,03	0,06	0,04	0,05	0,09	0,10	0,10	0,45	0,14	0,17	0,10	0,09	0,05	0,07	0,10	0,11	0,07	0,04	0,07	0,15	0,07	0,09	0,08	0,09				
(53)	Prot_botr_UTEH	0,26	0,08	0,03	0,09	0,14	0,14	0,10	0,07	0,41	0,43	0,07	0,13	0,05	0,07	0,08	0,08	0,03	0,07	0,04	0,05	0,09	0,09	0,09	0,40	0,13	0,17	0,09	0,09	0,05	0,07	0,10	0,10	0,07	0,04	0,07	0,14	0,07	0,08	0,08	0,09				
(54)	Pseudos_anti	0,26	0,04	0,06	0,09	0,11	0,11	0,08	0,04	0,42	0,39	0,05	0,12	0,06	0,07	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,07	0,04	0,07	0,07	0,41	0,12	0,09	0,06	0,07	0,06	0,07	0,08	0,10	0,07	0,08	0,03	0,13	0,04	0,06	0,05	0,07				
(55)	Pseudosc_mar	0,28	0,15	0,12	0,13	0,16	0,17	0,12	0,12	0,48	0,47	0,14	0,17	0,14	0,13	0,13	0,12	0,12	0,14	0,14	0,14	0,14	0,11	0,12	0,47	0,11	0,21	0,12	0,14	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,13	0,14	0,13	0,14	0,10	
(56)	Pycn_prov	0,28	0,15	0,12	0,13	0,16	0,17	0,12	0,12	0,49	0,47	0,14	0,17	0,14	0,13	0,13	0,12	0,12	0,14	0,15	0,14	0,14	0,11	0,12	0,48	0,11	0,21	0,12	0,14	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15	0,13	0,15	0,13	0,14	0,10	
(57)	Pyr_tetr	0,27	0,13	0,11	0,11	0,16	0,16	0,11	0,10	0,50	0,46	0,12	0,16	0,11	0,12	0,11	0,10	0,10	0,12	0,13	0,12	0,12	0,10	0,10	0,50	0,08	0,18	0,10	0,10	0,11	0,13	0,12	0,14	0,13	0,12	0,13	0,10	0,13	0,10	0,13	0,06	0,07			
(58)	Ros_pol	0,25	0,07	0,07	0,07	0,10	0,10	0,06	0,06	0,38	0,42	0,07	0,13	0,06	0,08	0,05	0,05	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,05	0,05	0,37	0,11	0,15	0,05	0,07	0,07	0,08	0,07	0,09	0,08	0,09	0,07	0,12	0,07	0,04	0,07	0,04				
(59)	Scen_des	0,26	0,05	0,06	0,10	0,12	0,12	0,09	0,05	0,45	0,39	0,05	0,14	0,06	0,08	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,07	0,04	0,08	0,08	0,44	0,12	0,08	0,08	0,06	0,08	0,09	0,10	0,08	0,07	0,03	0,13	0,04	0,07	0,06	0,07	0,06				
(60)	Scherf_dub	1,36	1,23	1,28	1,25	1,14	1,14	1,35	1,07 ?	1,84	1,06	1,27	1,23	1,23	1,11	1,11	1,24	1,23	1,20	1,24	1,22	1,25	1,25 ?	1,26	1,06	1,15	1,23	1,30	1,28	1,14	1,22	1,24	1,30	1,14	1,27	1,23	1,11	1,20	1,25	0,06	0,08				
(61)	Selenastrum_sp	0,27	0,02	0,08	0,09	0,11	0,11	0,06	0,06	0,29	0,48	0,06	0,15	0,06	0,08	0,07	0,07	0,09	0,07	0,06	0,08	0,03	0,07	0,06	0,29	0,13	0,11	0,08	0,11	0,07	0,08	0,09	0,08	0,07	0,08	0,04	0,13	0,02	0,06	0,06	0,08				
(62)	Sphaerop_sp	0,26	0,06	0,07	0,10	0,14	0,13	0,10	0,06	0,44	0,42	0,07	0,15	0,07	0,09	0,08	0,08	0,07	0,08	0,07	0,08	0,06	0,08	0,09	0,43	0,13	0,11	0,09	0,09	0,07	0,09	0,10	0,12	0,09	0,08	0,05	0,14	0,05	0,08	0,07	0,10				
(63)	Staur_tet	0,25	0,04	0,06	0,10	0,14	0,12	0,11	0,04	0,46	0,40	0,06	0,15	0,05	0,07	0,07	0,08	0,06	0,06	0,07	0,04	0,09	0,08	0,45	0,12	0,09	0,08	0,08	0,06	0,07	0,08	0,11	0,07	0,07	0,01	0,15	0,04	0,06	0,05	0,07					
(64)	Tetr_66_6	0,25	0,08	0,08	0,09	0,11	0,11	0,09	0,08	0,35	0,45	0,07	0,14	0,07	0,09	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,35	0,12	0,15	0,07	0,10	0,07	0,09	0,08	0,09	0,09	0,08	0,13	0,07	0,07	0,08	0,07	0,08	0,07				
(65)	Tetr_Mes_17	0,25	0,08	0,09	0,09	0,11	0,11	0,09	0,08	0,36	0,45	0,07	0,14	0,07	0,09	0,07	0,07	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,36	0,12	0,16	0,07	0,10	0,07	0,10	0,08	0,09	0,09	0,09	0,08	0,13	0,08	0,07	0,09	0,07				
(66)	Tetr_Mes_5	0,25	0,08	0,09	0,09	0,11	0,11	0,09	0,08	0,36	0,45	0,07	0,14	0,07	0,09	0,07	0,07	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,36	0,12	0,16	0,07	0,10	0,07	0,10	0,08	0,09	0,09	0,09	0,08	0,13	0,08	0,07	0,09	0,07				
(67)	Tetr_R_9_2	0,25	0,07	0,08	0,09	0,11	0,11	0,09	0,08	0,35	0,45	0,06	0,14	0,07	0,09	0,07	0,07	0,08	0,08	0,07	0,08	0,08	0,07	0,35	0,12	0,15	0,07	0,10	0,07	0,09	0,08	0,09	0,09	0,09	0,07	0,13	0,07	0,07	0,08	0,06					
(68)	Tetr_R_9_3	0,25	0,08	0,09	0,09	0,11	0,11	0,09	0,08	0,35	0,45	0,07	0,14	0,07	0,09	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,35	0,12	0,15	0,07	0,10	0,07	0,09	0,08	0,09	0,09	0,09	0,08	0,13	0,07	0,07	0,08	0,07					
(69)	Tetr_sp_S028	?	0,07	0,08	0,09	0,13	0,13	0,12	0,07 ?	0,23	0,06	0,13	0,06	0,09	0,07	0,07	0,08	0,09	0,09	0,09	0,07	0,08	0,09 ?	0,09 ?	0,05	0,08	0,09	0,09	0,11	0,09	0,09	0,08	0,08	0,14	0,06	0,07	0,08	0,08							
(70)	Tetr_sp_S057	?	0,06	0,06	0,07	0,11	0,11	0,10	0,06 ?	0,23	0,05	0,12	0,05	0,08	0,06	0,06	0,06	0,07	0,08	0,07	0,06	0,07	0,08 ?	0,08 ?	0,04	0,06	0,08	0,08	0,10	0,07	0,08	0,07	0,07	0,12	0,05	0,06	0,07	0,01							
(71)	Tetr_sp_S075	0,34	0,11	0,12	0,10	0,14	0,14	0,11	0,11 ?	0,40	0,10	0,17	0,10	0,12	0,08	0,08	0,12	0,11	0,11	0,10	0,10	0,09	0,09 ?	0,13	0,30	0,09	0,11	0,10	0,11	0,11	0,10	0,11	0,13	0,11	0,15	0,10	0,08	0,12	0,08						
(72)	Tetr_sp_S081	0,31	0,09	0,11	0,10	0,13	0,13	0,10	0,10 ?	0,37	0,08	0,16	0,08	0,10	0,07	0,07	0,11	0,09	0,09	0,09	0,09	0,08	0,08 ?	0,12	0,22	0,08	0,10	0,09	0,09	0,10	0,09	0,11	0,10	0,14	0,09	0,07	0,11	0,07							
(73)	Tetr_sp_S082	0,31	0,09	0,11	0,10	0,14	0,14	0,11	0,10 ?	0,33	0,08	0,16	0,08	0,10	0,07	0,07	0,11	0,11	0,11	0,10	0,10	0,08	0,09 ?	0,10	0,35	0,08	0,10	0,11	0,10	0,08	0,10	0,11	0,11	0,10	0,13	0,09	0,07	0,11	0,09						
(74)	Tetr_sp_S101	0,11	0,07	0,07	0,06	0,09	0,																																						

Πίνακας 10. Συνέχεια

	(41)	(42)	(43)	(44)	(45)	(46)	(47)	(48)	(49)	(50)	(51)	(52)	(53)	(54)	(55)	(56)	(57)	(58)	(59)	(60)	(61)	(62)	(63)	(64)	(65)	(66)	(67)	(68)	(69)	(70)	(71)	(72)	(73)	(74)	(75)	(76)	(77)	(78)	(79)	(80)	(81)	(82)
(42) Oedog_car	0,08																																									
(43) Oltman_vir	0,09	0,09																																								
(44) Ouro_multi	0,07	0,07	0,09																																							
(45) Pabia_sig	0,03	0,08	0,08	0,06																																						
(46) Ped_dup	0,08	0,07	0,10	0,04	0,08																																					
(47) Ped_min	0,08	0,08	0,10	0,09	0,08	0,08																																				
(48) Pico_ocul	0,06	0,08	0,08	0,07	0,06	0,08	0,09																																			
(49) Pras_cri_GAL	0,02	0,08	0,08	0,07	0,03	0,07	0,08	0,06																																		
(50) Pras_cri_SAG	0,02	0,08	0,08	0,07	0,03	0,08	0,08	0,05	0,00																																	
(51) Prasio_sp	0,14	0,13	0,14	0,13	0,13	0,14	0,14	0,13	0,12	0,12																																
(52) Prot_botr_FRT	0,10	0,09	0,10	0,07	0,10	0,07	0,10	0,09	0,09	0,10	0,15																															
(53) Prot_botr_UTEX	0,09	0,09	0,09	0,08	0,09	0,08	0,10	0,08	0,09	0,09	0,14	0,00																														
(54) Pseudos_anti	0,06	0,06	0,08	0,04	0,06	0,04	0,07	0,07	0,06	0,06	0,12	0,07	0,07																													
(55) Pseudosc_mar	0,12	0,13	0,14	0,13	0,11	0,14	0,13	0,13	0,11	0,11	0,13	0,14	0,14	0,13																												
(56) Pycn_prov	0,13	0,13	0,14	0,13	0,11	0,14	0,13	0,13	0,11	0,11	0,13	0,15	0,14	0,13	0,00																											
(57) Pyr_tetr	0,11	0,11	0,12	0,11	0,09	0,12	0,11	0,11	0,09	0,09	0,11	0,14	0,12	0,11	0,10	0,10																										
(58) Ros_pol	0,02	0,08	0,08	0,07	0,03	0,07	0,08	0,05	0,00	0,00	0,13	0,09	0,09	0,06	0,11	0,11	0,10																									
(59) Scen_des	0,08	0,07	0,09	0,04	0,07	0,03	0,08	0,08	0,07	0,08	0,13	0,07	0,07	0,04	0,14	0,14	0,12	0,07																								
(60) Scherf_dub	1,33	1,09	1,12	1,23	1,27	1,13	1,15	1,15	1,37	1,37	1,14	1,24	1,24	1,18	1,24	1,24	1,22	1,37	1,18																							
(61) Selenastrum_sp	0,06	0,08	0,08	0,01	0,05	0,05	0,08	0,08	0,06	0,06	0,13	0,09	0,09	0,04	0,13	0,13	0,10	0,06	0,04	1,23																						
(62) Sphaerop_sp	0,09	0,07	0,11	0,06	0,09	0,05	0,09	0,08	0,07	0,09	0,14	0,08	0,08	0,05	0,15	0,15	0,13	0,07	0,05	1,14	0,06																					
(63) Staur_tet	0,09	0,07	0,10	0,04	0,08	0,01	0,08	0,08	0,07	0,08	0,14	0,07	0,08	0,04	0,14	0,15	0,13	0,07	0,04	1,14	0,04	0,05																				
(64) Tetr_66_6	0,07	0,09	0,09	0,08	0,07	0,08	0,09	0,07	0,07	0,07	0,12	0,08	0,08	0,07	0,13	0,13	0,11	0,07	0,07	1,18	0,09	0,07	0,07																			
(65) Tetr_Mes_17	0,07	0,09	0,09	0,08	0,07	0,08	0,09	0,08	0,07	0,07	0,12	0,09	0,09	0,08	0,12	0,12	0,10	0,07	0,08	1,18	0,09	0,08	0,08	0,01																		
(66) Tetr_Mes_5	0,07	0,09	0,09	0,08	0,07	0,08	0,09	0,08	0,07	0,07	0,12	0,09	0,09	0,08	0,13	0,13	0,10	0,07	0,08	1,18	0,09	0,08	0,08	0,01	0,00																	
(67) Tetr_R_9_2	0,07	0,08	0,09	0,08	0,07	0,08	0,09	0,07	0,07	0,07	0,11	0,08	0,08	0,07	0,12	0,12	0,10	0,07	0,07	1,18	0,09	0,07	0,07	0,00	0,00	0,00																
(68) Tetr_R_9_3	0,07	0,09	0,09	0,08	0,07	0,08	0,09	0,07	0,07	0,07	0,12	0,09	0,08	0,07	0,13	0,13	0,11	0,07	0,07	1,18	0,09	0,07	0,07	0,00	0,01	0,01	0,00															
(69) Tetr_sp_S028	0,06	0,06	0,07	0,08	0,06	0,08	0,08	0,07	0,06	0,06	0,07	0,08	0,08	0,06	0,12	0,12	0,09	0,06	0,07	?	?	0,06	0,09	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04														
(70) Tetr_sp_S057	0,05	0,05	0,08	0,07	0,05	0,07	0,08	0,06	0,05	0,05	0,07	0,07	0,07	0,05	0,10	0,10	0,08	0,05	0,06	?	?	0,05	0,08	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,01													
(71) Tetr_sp_S075	0,08	0,13	0,10	0,11	0,08	0,11	0,12	0,09	0,08	0,08	0,14	0,12	0,12	0,10	0,15	0,15	0,11	0,08	0,10	?	?	0,16	0,12	0,12	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03							
(72) Tetr_sp_S081	0,06	0,11	0,08	0,09	0,06	0,10	0,10	0,07	0,06	0,06	0,14	0,10	0,10	0,08	0,13	0,13	0,10	0,06	0,09	?	?	0,13	0,10	0,10	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,02	0,02	0,04										
(73) Tetr_sp_S082	0,07	0,09	0,09	0,10	0,06	0,10	0,11	0,07	0,07	0,07	0,13	0,10	0,10	0,08	0,13	0,13	0,10	0,06	0,09	?	?	0,18	0,09	0,10	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,01	0,01	0,04	0,01									
(74) Tetr_sp_S101	0,05	0,05	0,07	0,07	0,04	0,08	0,07	0,05	0,05	0,05	0,08	0,08	0,08	0,06	0,09	0,09	0,06	0,05	0,06	?	?	0,04	0,07	0,08	0,03	0,03	0,03	0,02	0,03	0,01	0,01	0,03	0,01	0,00								
(75) Tetr_V_2_2	0,07	0,09	0,09	0,08	0,07	0,08	0,09	0,07	0,07	0,07	0,12	0,08	0,08	0,07	0,12	0,12	0,10	0,07	0,07	1,18	0,08	0,07	0,07	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03								
(76) Treb_arb	1,15	1,07	1,06	1,14	1,19	1,07	1,17	1,14	1,18	1,16	1,19	1,14	1,14	1,12	1,17	1,17	1,17	1,18	1,12	1,62	1,14	1,11	1,08	1,07	1,07	1,07	1,07	1,07	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1,07			
(77) Trent_aur	0,14	0,13	0,13	0,13	0,13	0,14	0,14	0,12	0,12	0,12	0,15	0,15	0,14	0,12	0,17	0,16	0,16	0,13	0,14	1,27	0,14	0,15	0,15	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,12	0,11	0,17	0,16	0,15	0,12	0,14	1,27						
(78) Trich_wel	0,03	0,08	0,08	0,07	0,03	0,09	0,08	0,06	0,01	0,13	0,11	0,10	0,07	0,12	0,12	0,09	0,01	0,08	1,31	0,07	0,09	0,08	0,07	0,08	0,07	0,06	0,05	0,08	0,07	0,05	0,07	1,16	0,13									
(79) Ulo_zon	0,10	0,10	0,08	0,09	0,09	0,11	0,11	0,10	0,09	0,09	0,14	0,11	0,10	0,09	0,13	0,14	0,14	0,09	0,10	1,23	0,08	0,11	0,10	0,09	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,07	0,09	0										



Εικόνα 43. Φυλογενετικό δέντρο βάσει της Μπεύζιανης Συνεπαγωγής, το οποίο προέκυψε από την ανάλυση των αλληλουχιών των δύο γονιδίων. Οι αναγραφόμενες τιμές αντιπροσωπεύουν την υποστήριξη κάθε κλάδου ως % ποσοστό της δομικής του ακεραιότητας. Η γραμμοσκιασμένη περιοχή αντιπροσωπεύει τις αλληλουχίες AthU-AI. Κλίμακα: 0,1 νουκλεοτιδική υποκατάσταση/θέση

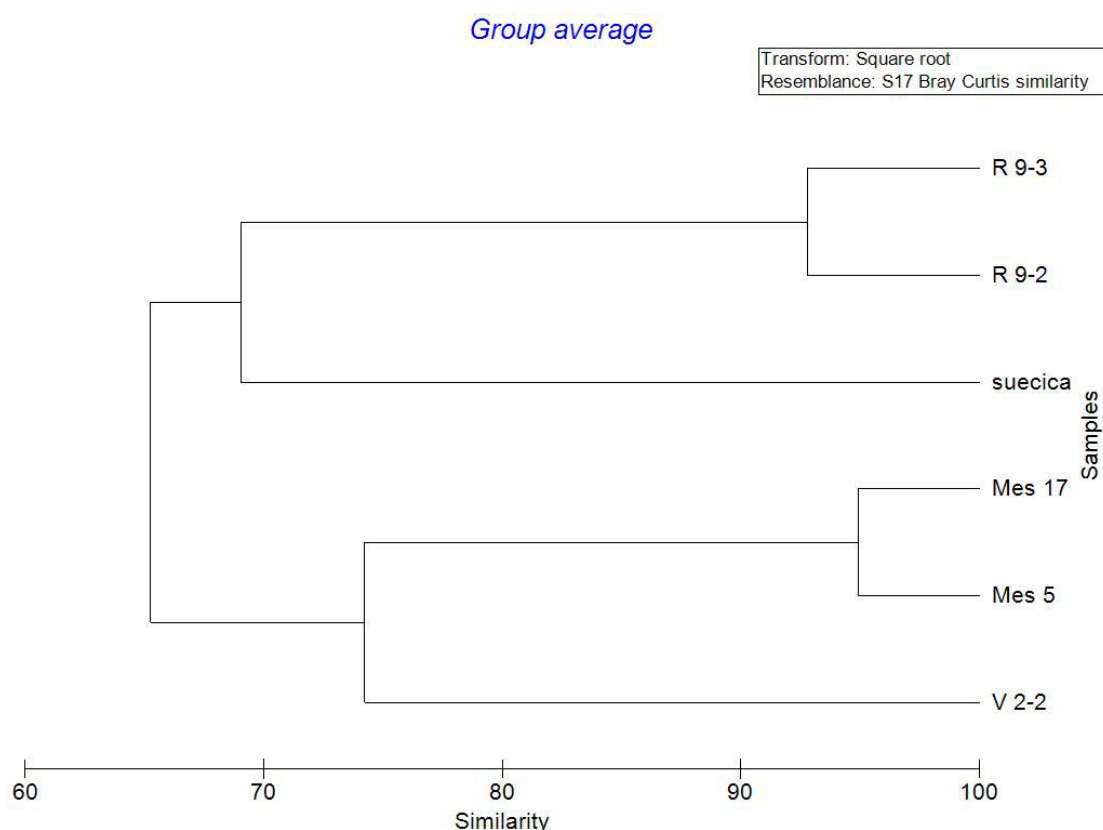
3.4.4. Ανάλυση Λιπαρών Οξέων

Τα προφίλ των λιπαρών οξέων για τα στελέχη AthU-AI Mes 5, Mes 17 και V 2-2 αναλύθηκαν στα πλαίσια της Διατριβής αυτής, ενώ τα προφίλ των στελεχών R 9-2 και R 9-3 προήλθαν από βιβλιογραφικά δεδομένα (Tzovenis *et al.* 2009). Χάριν συγκρίσεως, στην ανάλυση συμπεριελήφθη και το προφίλ του είδους *Tetraselmis suecica*, το οποίο χρησιμοποιείται στη βιομηχανία των υδατοκαλλιεργειών (βλ. Tzovenis 2001). Τα λιπιδικά προφίλ όλων των στελεχών απεικονίζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Προφίλ λιπαρών οξέων των στελεχών *Tetraselmis* AthU-AI. Τα στελέχη Mes 5, Mes 17 και V2-2 όπως αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία, σε σύγκριση με τα προφίλ των στελεχών R 9-2, R 9-3 όπως παρουσιάζονται από τους Tzovenis *et al.* (2009), και το είδος *T. suecica* όπως αναφέρεται από τον Tzovenis (2001). Παρουσιάζεται επίσης και το περιεχόμενο σε κορεσμένα (SAFA), μονο-ακόρεστα (MUFA) και πολυ-ακόρεστα λιπαρά οξέα.

Strain	Mes_5	Mes_17	R_9_2	R_9_3	V_2_2	<i>T. suecica</i>
14:00	1.35	1.21	0.83	0.24	0.94	0.50
16:00	25.90	25.54	29.50	28.10	20.15	17.60
16:1n-7	1.96	2.06	1.33	0.54	0.66	3.70
16:1n-9	0.00	0.00	3.00	3.18	1.51	0.00
16:2n-4	0.00	0.00	1.03	1.46	2.94	0.80
16:2n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.60
16:4n-3	2.25	1.63	5.29	7.38	9.49	20.80
18:00	11.75	12.94	2.13	1.19	0.74	0.80
18:1n-9	0.06	0.36	28.60	26.43	0.58	9.50
18:1n-7	7.79	7.57	2.72	2.95	4.37	2.60
18:2n-9	2.22	2.33	0.00	0.00	0.00	0.00
18:2n-6	7.40	7.89	5.90	6.95	5.11	4.60
18:3n-3	19.24	17.01	7.08	8.54	21.07	14.40
18:4n-3	9.16	10.39	2.60	3.15	11.04	11.20
20:1n-9	4.09	3.78	2.25	1.35	6.09	0.00
20:5n-3	4.21	4.41	3.67	3.76	5.92	4.30
22:5n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	4.01	0.00
SAFA	38.99	40.43	33.29	30.17	21.83	18.90
MUFA	13.90	14.45	38.06	34.77	15.35	16.50
PUFA	45.69	45.10	27.20	33.25	60.55	56.80

Βάσει της ανάλυσης διακύμανσης ANOVA (Πίνακας 12) δεν προέκυψαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των λιπιδικών προφίλ των στελεχών ($p > 0,05$). Ωστόσο, σημειώνουμε την εμφάνιση ενός ω -3 λιπαρού οξέος με 22 άτομα άνθρακα ($22:5n-3$) αποκλειστικά στο στέλεχος AthU-AI V 2-2, την απουσία δύο λιπαρών οξέων με 16 άτομα -τα οποία εμφανίζονται στα υπόλοιπα στελέχη- από τα AthU-AI Mes 5 και Mes 17, καθώς και την αυξημένη περιεκτικότητα των στελεχών AthU-AI R 9-3 και R 9-3 σε $18:1n-9$ λιπαρό οξύ (28,6% και 26,43% αντιστοίχως), το οποίο σχεδόν απουσιάζει από τα υπόλοιπα στελέχη AthU-AI. Το λιπιδικό περιεχόμενο όλων των στελεχών ομαδοποιήθηκε με βάση την ομοιότητα κατά Bray-Curtis (Εικόνα 44), αποκαλύπτοντας δύο διακριτές ομάδες, την ομάδα “Ροδιά” (στελέχη AthU-AI R 92, R 9-3) και την ομάδα “Μεσολόγγι” (στελέχη AthU-AI Mes 5, Mes 17). Τα στελέχη του Μεσολογγίου εμφάνισαν ομοιότητα 94.9%, ενώ τα στελέχη της Ροδιάς εμφάνισαν ομοιότητα 92.8%. Το στέλεχος AthU-AI V 2-2 εμφάνισε μεγαλύτερη ομοιότητα με την ομάδα “Μεσολόγγι” (~75%), αλλά το προφίλ του ήταν σαφώς διακριτό έναντι όλων



Εικόνα 44. Ανάλυση ομαδοποίησης (Cluster analysis) του περιεχομένου των μελετηθέντων στελεχών σε λιπαρά οξέα βάσει του δείκτη ομοιότητας Bray-Curtis. Στον οριζόντιο άξονα φαίνεται η ομοιότητα των εκάστοτε ομαδοποιημένων συστάδων ως εκατοστιαία αναλογία. Ο μετασχηματισμός των δεδομένων έγινε με τη μέθοδο της τετραγωνικής ρίζας. (Λογισμικό εξαγωγής αποτελεσμάτων: Primer-6, Clarke & Gorley 2006)

των υπολοίπων στελεχών. Στα προφίλ των στελεχών του Μεσολογγίου επικρατούν τα λιπαρά οξέα 16:0 (25–26%), 18:3n-3 (~17–19%), 18:00 (~11.5–13%), 18:4n-3 (~9–10%), 18:1n-7 και 18:2n-6 (7–8%), ενώ περιέχονται επίσης και τα 20:1n-9 (3–4%) και 20:5n-3 (εικοσιπενταενοϊκό οξύ, EPA: ~4–4.5%). Αμφότερα τα στελέχη εμφανίζουν παρόμοιο περιεχόμενο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), της τάξεως του 45% περίπου, ποσοστό υψηλότερο από εκείνο των στελεχών της Ροδιάς (27–34%), αλλά χαμηλότερο από εκείνο του στελέχους της Βατάτσας (60.55%). Τα περιεχόμενα των στελεχών του Μεσολογγίου σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFAs) είναι επίσης παρόμοια (13–14.5%) και χαμηλότερα από εκείνα των στελεχών της Ροδιάς (35–38%) και παρόμοια με εκείνο του στελέχους της Βατάτσας (~15%). Στο προφίλ του στελέχους V 2-2, επικρατούν τα λιπαρά οξέα 16:0 (20%), και 18:3n-3 (21%) ενώ εμφανίζεται σημαντική περιεκτικότητα σε EPA (~6%).

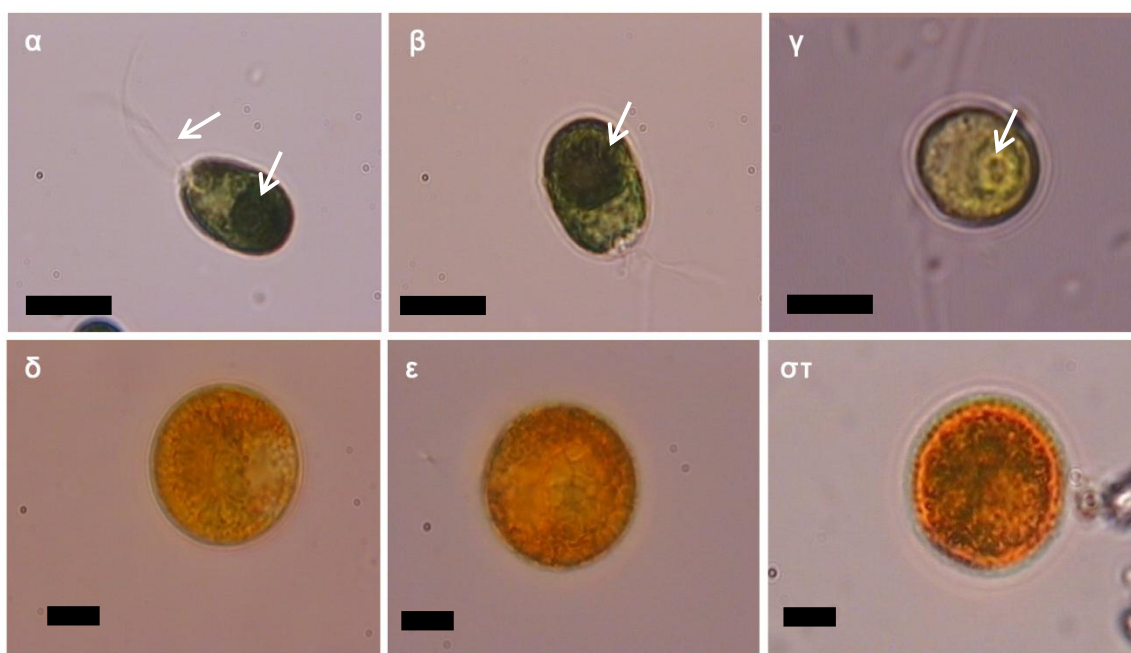
Πίνακας 12. Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για το λιπιδικό περιεχόμενο των μελετηθέντων στελεχών, όπου δεν φαίνεται να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους ($p > 0,05$).

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	13.9994	5	2.7999	0.0442	0.9988
error	4,812.5323	76	63.3228		
total	4,826.5317	81			

3.5. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Dunaliella salina*

3.5.1. Μελετηθέντα Στελέχη

Από τα 25 στελέχη τα οποία είναι κατατεθειμένα στην Τράπεζα AthU-AI ως αντιπρόσωποι του είδους *Dunaliella salina*, είκοσι (20) έχουν απομονωθεί (Δολαψάκης 2008) από τις αλυκές του Μεγάλου Εμβόλου στη Μακεδονία (στελέχη AthU-AI Dun 2-8, Dun 21-32, Dun 34), τέσσερα (4) απομονώθηκαν από τις αλυκές του Μεσολογγίου (AthU-AI Mes 35-38) στα πλαίσια της Διατριβής, και ένα (1) έχει απομονωθεί από τις αλυκές της Σάμου (AthU-AI Dun 39) (Καρλοβασίτη 2015). Για όλα τα στελέχη (Πίνακας 1) πραγματοποιήθηκαν μορφολογικές παρατηρήσεις, ενώ σε 12 από αυτά εφαρμόστηκαν πειράματα καταπόνησης ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση της αλατότητας στην αύξηση και την παραγωγή β-καρωτενίου. Το στέλεχος AthU-AI Mes 36 δεν συμπεριελήφθη στα πειράματα διότι η διαδικασία απομόνωσης αυτού δεν είχε ολοκληρωθεί όταν εφαρμόστηκε η πειραματική διαδικασία καταπόνησης.



Εικόνα 45. Κύτταρα των στελεχών AthU-AI του γένους *Dunaliella* (είδος *Dunaliella salina* και *Dunaliella cf. salina*). α-β) Κύτταρα μετά από χρώση με διάλυμα Lugol, γ) ζωντανό κύτταρο, άποψη του οπισθίου τμήματος του κυττάρου, δ-στ) απλανοσπόρια *D. salina* σε διάφορα στάδια ανάπτυξης. Βέλη: μαστίγια, πυρηνοειδές.
Κλίμακα: 10 μm
(Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούντσιου)

3.5.2. Μορφολογική Περιγραφή

Μετά από παρατήρηση ζωντανών και μονιμοποιημένων κυττάρων σε διάφορες φάσεις της καλλιέργειας, με φωτονικό μικροσκόπιο, όλα τα υπό μελέτη στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco 1905. Τα στελέχη Dun 21-36 ταυτοποιήθηκαν στα πλαίσια της Διατριβής αυτής, ενώ τα στελέχη Dun 2-8 είχαν ταυτοποιηθεί προηγουμένως (Δολαφάκης 2008) και τα στοιχεία απομόνωσης και καλλιέργειας αυτών είναι κατατεθειμένα στην Τράπεζα στελεχών AthU-AI.



Εικόνα 46. Κύτταρα του στελέχους Athu-AI Dun 30 (μορφότυπος 5) σε διάφορα στάδια της καλλιέργειας. α) Νεαρό κύτταρο (2η ημέρα) με πράσινο χρωματισμό, στο οποίο διακρίνεται η οφθαλμική κηλίδα (κεφαλή βέλους), β) κύτταρο στην εκθετική φάση (1η εβδομάδα), στο οποίο έχει αρχίσει να συσσωρεύεται β-καρωτένιο σε μορφή σταγονιδίων και η οφθαλμική κηλίδα δεν είναι πλέον εμφανής, ενώ το σχήμα του είναι πιο πεπλατυσμένο, γ) κύτταρο σε γηραιότερη καλλιέργεια (3η εβδομάδα) στο οποίο έχει συσσωρευθεί μεγάλη ποσότητα β-καρωτενίου (ερυθρό κύτταρο) και το σχήμα του είναι ωσειδές.

Κλίμακα: 10 μm

(Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούντσιου)

Όλα τα στελέχη παρουσιάζουν τα τυπικά μορφολογικά γνωρίσματα των αλόφιλων ειδών του γένους *Dunaliella*, υπο-γένος *Dunaliella*, sectio *Dunaliella* (βλ. Borowitzka & Siva 2007, Gozalez et al. 2019) (Εικόνα 45). Το σχήμα των κυττάρων είναι απιοειδές (pyriform), ελλειψοειδές έως κυλινδρικό, ενίοτε σφαιροειδές και πεπλατυσμένο ιδιαίτερα στα μεταγενέστερα στάδια ζωής (ερυθρά κύτταρα) (Εικόνα 46). Τα κύτταρα εμφανίζουν αμβλέα οπίσθια άκρα σε όλα τα στάδια ζωής αλλά το πρόσθιο άκρο του κυττάρου είναι λιγότερο ή περισσότερο οξύληκτο στα νεότερα κύτταρα ενώ στα γηραιότερα κύτταρα είναι και αυτό αμβλύ, προδίδοντας μια πιο σφαιρική όψη. Το μέσο μήκος των κυττάρων διαφέρει στα διάφορα στελέχη αλλά κυμαίνεται περίπου στα 12-15 μm, ενώ το πλάτος κυμαίνεται αντιστοίχως στα 8,5 - 13 μm. Τα κύτταρα φέρουν δύο (2) ισομήκη μαστίγια, μήκους περίπου ίδιου με αυτό του κυττάρου (Εικόνα 45α). Ο χλωροπλάστης είναι κυπελλοειδής (Εικόνα 46α-β) με πολλαπλούς λοβούς στο οπίσθιο τμήμα του, και καταλαμβάνει το μεγαλύτερο τμήμα του κυττάρου. Ένα ευμέγεθες, σφαιρικού σχήματος πυρηνοειδές περιέχεται εντός και στο οπίσθιο

τμήμα του χλωροπλάστη, φέρει δε παχύ περίβλημα αμυλοκόκκων το οποίο είναι ορατό στο οπτικό μικροσκόπιο προσδίδοντας στο πυρηνοειδές μια σχεδόν “ανάγλυφη όψη” (Εικόνα 45 α-γ, 46α). Η οφθαλμική κηλίδα δεν είναι πάντα ευδιάκριτη αλλά είναι μάλλον διάχυτη (κυρίως στα γηραιότερα, ερυθρά κύτταρα), και συνήθως εντοπίζεται στο οπίσθιο μέρος του κυττάρου (Εικόνα 46). Παλμελλοειδή κύτταρα (*palmeellae*) δεν παρατηρήθηκαν στις καλλιέργειες, παρατηρήθηκαν όμως απλανοσπόρια, συνήθως σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας (Εικόνα 45 δ-στ). Τα απλανοσπόρια αρχίζουν να σχηματίζονται συνήθως από ερυθρά κύτταρα που αποβάλλουν τα μαστίγιά τους (Εικόνα 45δ). Το εσωτερικό του κυττάρου τους γίνεται σταδιακά κοκκιώδες (Εικόνα 45ε) ενώ γύρω από το κύτταρο σχηματίζεται ένα παχύ περίβλημα, μάλλον πολυσακχαρικής φύσεως, το οποίο στα πλήρως σχηματισμένα απλανοσπόρια εμφανίζεται πτυχωτό (Εικόνα 45στ).



Εικόνα 47. Σταδιακός χρωματισμός των καλλιεργειών *D. salina* (στέλεχος AthU-AI Dup 32) σε συνθήκες υψηλής αλατότητας (>60‰). Οι νεαρές καλλιέργειες εμφανίζουν πράσινο χρωματισμό ενώ σταδιακά ο χρωματισμός μετατρέπεται σε κιτρινωπό και οι γηραιότερες καλλιέργειες έχουν ερυθρό/ καστανέρυθρο χρωματισμό.

(Φωτογραφία Α. Ντζουβάρας)

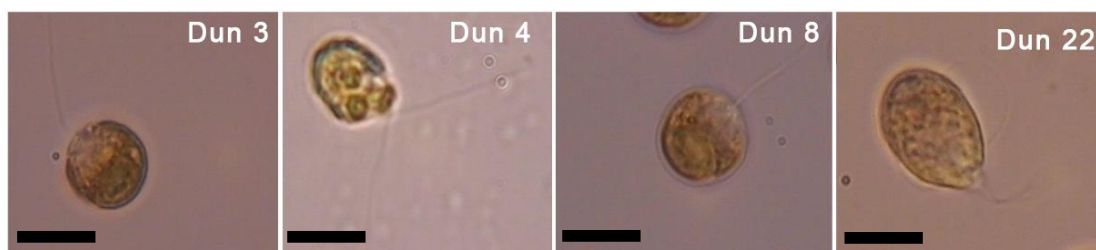
Όλα τα στελέχη είναι αλόφιλα, και πιο συγκεκριμένα προτιμούν υπεράλμυρα ύδατα (>60‰) και έχουν απομονωθεί από περιβάλλοντα αλυκών. Τα κύτταρα είναι πράσινα στα πρώτα στάδια ζωής (νεαρές καλλιέργειες), ενώ στα μεταγενέστερα στάδια (γηραιότερες καλλιέργειες) τα κύτταρα χρωματίζονται κιτρινέρυθρα έως ερυθρά (Εικόνα 46) λόγω συσσώρευση λιπαρών σταγονιδίων καρωτενοειδών (κυρίως β-κρωτενίου) στο εσωτερικό του χλωροπλάστη. Ακολούθως, η μακροσκοπική εικόνα της καλλιέργειας μεταβάλλεται με την πάροδο του χρόνου (Εικόνα 47). Οι νεαρές

καλλιέργειες έχουν πράσινο χρωματισμό, ο οποίος μεταβάλλεται σε κιτρινοπράσινο, κιτρινέρυθρο/καστανέρυθρο έως ερυθρό, με την πάροδο του χρόνου.



Εικόνα 48. Κύτταρα στελεχών AthU-AI *Dunaliella* cf. *salina* του μορφοτύπου “2”. Απεικονίζονται τα δύο στελέχη που εντάσσονται σε αυτόν. Κλίμακα: 10 μ m (Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούντσιου)

Βάσει των μορφολογικών τους γνωρισμάτων - ιδιαίτερως, τις διαστάσεις των κυττάρων και την προϊούσα αλλαγή του χρωματισμού κυττάρων και καλλιέργειας - τα στελέχη AthU-AI ομαδοποιήθηκαν σε 4 διακριτούς ενδοειδικούς “μορφοτύπους” (Πίνακας 13) σύμφωνα με το σύστημα που αναπτύχθηκε για ένα υποσύνολο των υπό μελέτη στελεχών προηγουμένως στη βιβλιογραφία (Δολαψάκης 2008). Συγκεκριμένα,

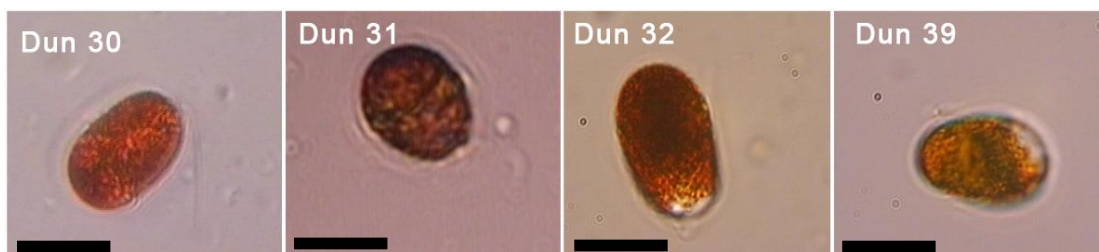


Εικόνα 49. Ενδεικτικά κύτταρα στελεχών AthU-AI *Dunaliella* cf. *salina* του μορφοτύπου “3”. Απεικονίζονται τέσσερα από τα 15 στελέχη που εντάσσονται σε αυτόν. Κλίμακα: 10 μ m (Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούντσιου)



Εικόνα 50. Κύτταρα στελεχών AthU-AI *Dunaliella* cf. *salina* του μορφοτύπου “4”. Απεικονίζονται τα τρία στελέχη που εντάσσονται σε αυτόν. Φαίνεται χαρακτηριστικά το κιτρινέρυθρο χρώμα που προκύπτει από τη συσσώρευση καρωτενοειδών. Κλίμακα: 10 μ m (Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούντσιου)

τα στελέχη AthU-AI Dun 2-8 είχαν διαχωριστεί σε 3 “μορφοτύπους”, ενώ για την ομαδοποίηση των στελεχών AthU-AI Dun 21-39, επιπλέον των “μορφοτύπων” αυτών, αναπτύχθηκε στα πλαίσια της Διατριβής αυτής και ένας τέταρτος “μορφότυπος”, χρησιμοποιώντας τα ίδια κριτήρια, τα οποία επιπλέον εμπλουτίστηκαν στη συνέχεια με βιοχημικά δεδομένα παραγωγής β-καρωτενίου (βλ. παρακάτω). Ο μορφότυπος







Εικόνα 51. Κύτταρα στελεχών AthU-AI *Dunaliella cf. salina* του μορφότυπου “5”. Απεικονίζονται τα τέσσερα στελέχη που εντάσσονται σε αυτόν. Φαίνεται χαρακτηριστικά το σκοτεινό ερυθρό χρώμα που προκύπτει από την αυξημένη συσσώρευση καρωτενοειδών καθώς και το πεπλατυσμένο σχήμα των κυττάρων. Κλίμακα: 10 μm (Φωτογραφίες: Ξ. Χαντζηστρούντσιου)

αυτός ονομάστηκε “μορφότυπος 5” σε συνέχεια του συστήματος κατά Δολαψάκη. Τα στελέχη που ανήκουν στον εν λόγω μορφότυπο εμφανίζουν μέσο μήκος 13,5 μm, μέσο πλάτος 11,2 μm και αυξημένο βιο-όγκο ($\sim 7,37 \times 10^2 \mu\text{m}^3$) των ώριμων κυττάρων σε σχέση με τους υπόλοιπους μορφοτύπους. Επιπλέον, ο μορφότυπος 5 χαρακτηρίζεται από σκοτεινέρυθρο (βαθύ κόκκινο) χρωματισμό των κυττάρων και έντονο καστανέρυθρο (στο χρώμα της “τερακότα”) χρωματισμό της καλλιέργειας. Η ιδιαιτερότητα αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα του μορφότυπου αυτού παράγουν αισθητά αυξημένες ποσότητες β-καρωτενίου υπό συνθήκες καταπόνησης όπως αυξημένη αλατότητα (βλ. επόμενο κεφάλαιο) και συνθήκες στέρησης αζώτου (βλ. Συζήτηση). Η κατανομή των στελεχών στους 4 μορφοτύπους παρατίθεται στον Πίνακα 13 και οι κυτταρικοί μορφότυποι απεικονίζονται στις Εικόνες 48-51, ενώ η μακροσκοπική εικόνα των καλλιεργειών φαίνεται στην Εικόνα 52.



Εικόνα 52. Αποθεματικές καλλιέργειες (stock) των διαφορετικών μορφοτύπων *Dunaliella cf. salina*, οι οποίες συντηρούνται στην Τράπεζα AthU-AI (αλατότητα 60‰).

Πίνακας 13. Μορφότυποι των στελεχών AthU-AI *Dunaliella* cf. *salina* sensu Δολαψάκης 2008 (μορφότυποι 2-4) και Χαντζηστρούντσιου 2020 (μορφότυπος 5).

Μορφότυπος	Στελέχη	Μήκος κυτάρου (μm)	Πλάτος κυτάρου (μm)	Αλλαγή χρωματισμού	Βιοόγκος κυτάρου (μm ³)	Μορφολογία κυτάρου
2	D2, D21	12,7	8,5	Πρασινοκίτρινος	5,01E+02	
3	D3, D4, D7, D8, D22, D23, D24, D25, D26, D27, D 28, D29, D 36, D37, D38	14,3	10	Πρασινοκαστανός	6,29E+02	
4	D5, D6, D35	14,7	8,5	Κιτρινέρυθρος (Πορτοκαλί)	5,84E+02	
5	D30, D31, D32, D39	13,5	11,2	Σκοτεινέρυθρος (σκούρο κόκκινο)	7,37E+02	

3.5.3. Βιοχημικές Αποκρίσεις Στελεχών στην Αλατότητα

Οι μετρήσεις του προκαταρκτικού πειράματος αλατότητας (στατικές καλλιέργειες 10 mL) εμφανίζονται στον Πίνακα 14. Για το σύνολο των στελεχών και των συνθηκών αλατότητας υπολογίστηκαν οι παράμετροι:

- κυτταρική πυκνότητα ($\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$),
- βιο-όγκος κυττάρου (μm^3),
- ξηρό βάρος κυττάρου ($\text{pg}\cdot\text{cell}^{-1}$),
- ξηρό βάρος καλλιέργειας ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- περιεκτικότητα καλλιέργειας σε β-καρωτένιο (b-carotene $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),
- περιεκτικότητα κυττάρου σε β-καρωτένιο (b-carotene $\text{pg}\cdot\text{cell}^{-1}$),
- ποσοστιαία αναλογία β-καρωτενίου επί του ξηρού βάρους (b-carotene %dw),
- ημερήσια παραγωγικότητα β-καρωτενίου στην καλλιέργεια (b-carotene $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$).

Από τα στελέχη μάρτυρες, το CCAP 19/18 ήταν εκείνο που εμφάνισε την πλέον αυξημένη περιεκτικότητα και παραγωγή σε β-καρωτένιο, κάτι που ήταν αναμενόμενο δεδομένου ότι αυτό είναι και το στέλεχος που έχει χρησιμοποιηθεί στην πλειονότητα των σχετικών μελετών παραγωγής β-καρωτενίου από στελέχη *D. salina*. Η μέγιστη περιεκτικότητα που εμφάνισε το στέλεχος αυτό σε αυτήν τη σειρά πειραμάτων ήταν 5,92% επί του ξηρού βάρους του κυττάρου (% dw) σε αλατότητα 100‰. Τα υπόλοιπα στελέχη από διεθνείς τράπεζες παρουσίασαν αρκετά χαμηλότερες τιμές, ενώ το στέλεχος SAG 42.88, προηγουμένως καταχωρημένο ως *Dunaliella bardawil* από τους Ben-Amotz & Avron (1976) δεν εμφάνισε ποσοστά β-καρωτενίου >5% επί του ξηρού βάρους του κυττάρου σε καμία από τις πειραματικές επαναλήψεις (μέγιστο 4,41% σε αλατότητα 80‰). Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι το στέλεχος CCAP 19/3 προηγουμένως κατατεθειμένο ως *D. salina* έχει πλέον μετονομαστεί σε *D. viridis* (Assunção *et al.* 2012), είδος το οποίο δεν παράγει μεν καρωτένιο, αλλά στα πειράματά μας παρουσίασε σχετικά υψηλά ποσοστά β-καρωτενίου (5,75% σε αλατότητα 120‰).

Από τα στελέχη AthU-AI, εκείνα που εμφάνισαν τις υψηλότερες περιεκτικότητες σε β-καρωτένιο (>10% dw) ήταν τα Dun 2 (11,72% dw σε αλατότητα 120‰), Dun 6 (12,42% dw σε αλατότητα 140‰), Dun 8 (10,04% dw σε αλατότητα 180‰) και Dun 32 (10,05% dw σε αλατότητα 100‰) με τη μέγιστη τιμή να είναι εκείνη του Dun 6. Το στέλεχος AthU-AI Dun 35 (στέλεχος Μεσολογγίου) παρουσίασε σταθερά υψηλή

παραγωγικότητα σε β-καρωτένιο σε όλο το εύρος αλατοτήτων φθάνοντας τη μέγιστη τιμή του $0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{ημέρα}^{-1}$ σε αλατότητα 60%. Αξίζει να σημειωθεί ότι το στέλεχος αυτό παρουσίασε επίσης πολύ υψηλή παραγωγή βιομάζας (cell yield), φθάνοντας τιμές της τάξης των 10^6 κυττάρων ανά mL καλλιέργειας, τιμή που είναι μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από όλα τα υπόλοιπα στελέχη, τα οποία ανέπτυξαν κυτταρικές πυκνότητες της τάξης των 10^4 - 10^5 κυττάρων ανά mL καλλιέργειας.

Για όλα τα στελέχη πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης one-way ANOVA με την αλατότητα ως ανεξάρτητη μεταβλητή και την εκάστοτε μετρηθείσα παράμετρο ως την εξαρτημένη μεταβλητή, ώστε να επιβεβαιωθεί η στατιστική σημαντικότητα των μετρήσεων και ο έλεγχος της υπόθεσης ότι η αλατότητα επηρεάζει την παραγωγή βιομάζας και β-καρωτενίου στις καλλιέργειες των στελεχών. Οι παράμετροι που αναλύθηκαν ήταν: α) η κυτταρική πυκνότητα ($\text{cells}\cdot\text{mL}^{-1}$) και β) η περιεκτικότητα του κυττάρου σε β-καρωτένιο ($\text{pg}\cdot\text{cell}^{-1}$), δεδομένου ότι οι υπόλοιπες παράμετροι είναι παράγωγα αυτών και εμφανίζουν αντίστοιχη διακύμανση. Σε όλες τις περιπτώσεις η ανάλυση υπέδειξε ότι οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στις μετρηθείσες παραμέτρους με τη μεταβολή της αλατότητας ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0,05$). Στην ανάλυση δεν συμπεριελήφθη η δοκιμή της αλατότητας 40% δεδομένου ότι σε αλατότητες $< 60\%$ οι μετρηθείσες παράμετροι αναμένεται να έχουν χαμηλές τιμές. Τα αποτελέσματα για όλες τις αναλύσεις διακύμανσης αυτού του σταδίου παρατίθενται στο Παράρτημα 7.

Βάσει των αποτελεσμάτων αυτών, τα στελέχη AthU-AI Dun 2, Dun 3-6, Dun 8, Dun 30-32 και Dun 35 συμπεριελήφθησαν στη δεύτερη διερευνητική σειρά πειραμάτων. Τα αποτελέσματα για την περιεκτικότητα β-καρωτενίου %dw και για την κυτταρική πυκνότητα αμφοτέρων των πειραμάτων ελήφθησαν υπ'όψιν για τις ταξινομικές εκτιμήσεις, ενώ για τα στελέχη που συμμετείχαν στις δύο πειραματικές διαδικασίες ελήφθη υπ'όψιν η μέγιστη περιεκτικότητα β-καρωτενίου (%dw) που μετρήθηκε συνολικά.

Πίνακας 14. Παράμετροι καλλιέργειας και παραγωγής β-καρωτενίου των στελεχών *Dunaliella salina* στο προκαταρκτικό πείραμα επίδρασης αλατότητας (στατικές καλλιέργειες μικρής κλίμακας). Αναγράφονται οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση για κάθε συνθήκη (στέλεχος x αλατότητα).

Αλατότητα	40 ‰		60 ‰		80 ‰		100 ‰		120 ‰		140 ‰		160 ‰		180 ‰		200 ‰		220 ‰		240 ‰	
	Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD	
Στέλεχος	19-18 CCAP																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵	2,72	0,17	3,14	0,21	5,82	0,32	6,27	0,24	5,93	0,22	4,88	0,13	4,01	0,30	2,36	0,11	3,17	0,08	2,36	0,10	0,87	0,05
Βιο-όγκος κυττάρου (μm ³)	967,25	85,98	1030,72	92,82	519,67	37,73	568,16	42,96	613,30	47,82	628,75	49,49	592,26	45,56	913,23	80,16	1035,18	93,30	912,69	80,10	689,90	56,08
Ξηρό βάρος κυττάρου (pg/cell)	247,62	22,01	263,87	23,76	133,04	9,66	145,45	11,00	157,00	12,24	160,96	12,67	151,62	11,66	233,79	20,52	265,01	23,88	233,65	20,51	176,62	14,36
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,07	0,00	0,08	0,00	0,08	0,00	0,09	0,00	0,09	0,00	0,08	0,00	0,06	0,00	0,06	0,00	0,08	0,00	0,06	0,00	0,02	0,00
B-carotene (mg/L)	2,79	0,30	2,13	0,28	5,06	0,10	5,39	0,12	5,15	0,35	4,38	0,26	3,73	0,26	2,52	0,09	3,12	0,11	2,52	0,12	1,42	0,07
b-carotene (pg/cell)	10,24	1,76	6,78	1,33	8,70	0,31	8,61	0,50	8,68	1,59	8,96	2,00	9,31	0,87	10,68	0,82	9,83	1,38	10,68	1,20	16,37	1,40
b-carotene % dw	4,13%		2,57%				5,92%		5,53%		5,57%				4,57%		3,71%		4,57%			
b-carotene mg/L/day	0,10		0,08		0,18		0,19		0,18		0,16		0,13		0,09		0,11		0,09			0,05
Στέλεχος	19-3 CCAP																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵	5,27	0,23	4,06	0,19	12,40	0,49	7,38	0,31	8,69	0,36	8,95	0,37	5,74	0,25	2,24	0,12	2,17	0,12	1,60	0,10	1,72	0,10
Βιο-όγκος κυττάρου (μm ³)	338,64	18,21	320,49	16,26	270,90	10,91	370,16	21,61	289,80	12,95	283,54	12,28	345,64	18,97	393,21	24,10	392,15	23,98	383,55	23,06	385,35	56,08
Ξηρό βάρος κυττάρου (pg/cell)	86,69	4,66	82,04	4,16	69,35	2,79	94,76	5,53	74,19	3,32	72,59	3,14	88,48	4,86	100,66	6,17	100,39	6,14	98,19	5,90	98,65	14,36
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,05	0,00	0,03	0,00	0,09	0,00	0,07	0,00	0,06	0,00	0,06	0,00	0,05	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00
B-carotene (mg/L)	1,17	0,10	1,08	0,06	1,48	0,04	1,33	0,01	1,42	0,13	1,44	0,13	1,21	0,03	0,95	0,02	0,94	0,02	0,90	0,02	0,91	0,02
b-carotene (pg/cell)	2,22	0,43	2,67	0,32	1,19	0,08	1,80	0,03	1,64	0,36	1,61	0,35	2,10	0,12	4,24	0,17	4,35	0,17	5,65	0,20	5,31	0,20
b-carotene % dw	2,56%		3,25%		1,72%		1,90%		2,21%		2,22%		2,37%		4,21%		4,33%		5,75%		5,38%	
b-carotene mg/L/day	0,04		0,04		0,05		0,05		0,05		0,05		0,04		0,03		0,03		0,03		0,03	
Στέλεχος	19-25 CCAP																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵	7,26	0,30	17,37	0,68	12,80	0,51	15,00	0,56	3,14	0,15	3,53	0,17	2,47	0,13	3,16	0,15	4,05	0,19	2,77	0,14	3,52	0,17
Βιο-όγκος κυττάρου (μm ³)	668,46	53,77	819,82	70,09	940,21	83,06	769,90	64,70	708,49	58,09	798,04	67,74	1059,26	95,90	1032,68	93,03	995,21	88,99	931,10	82,08	1012,31	90,84
Ξηρό βάρος κυττάρου (pg/cell)	171,13	13,77	209,87	17,94	240,69	21,26	197,09	16,56	181,37	14,87	204,30	17,34	271,17	24,55	264,37	23,82	254,77	22,78	238,36	21,01	259,15	23,26
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,12	0,00	0,36	0,00	0,31	0,00	0,30	0,00	0,06	0,00	0,07	0,00	0,07	0,00	0,08	0,00	0,10	0,00	0,07	0,00	0,09	0,00
B-carotene (mg/L)	1,32	0,08	2,06	0,13	2,65	0,16	2,45	0,15	3,09	0,19	2,65	0,16	2,60	0,16	1,63	0,10	1,45	0,19	1,13	0,07	1,04	0,06
b-carotene (pg/cell)	1,81	0,27	1,19	0,19	2,07	0,31	1,64	0,27	9,85	1,27	7,49	0,94	10,53	1,23	5,18	0,67	3,58	1,00	4,10	0,50	2,97	0,35
b-carotene % dw	1,06%		0,57%		0,86%		0,83%		5,43%		3,67%		3,88%		1,96%		1,41%		1,72%		1,14%	
b-carotene mg/L/day	0,05		0,07		0,09		0,09		0,11		0,09		0,09		0,06		0,05		0,04		0,04	
Στέλεχος	42-88 SAG																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵	10,13	0,41	15,27	0,60	13,14	0,52	12,68	0,50	11,44	0,46	13,14	0,52	10,98	0,44	7,17	0,30	7,49	0,31	5,23	0,23	6,82	0,29
Βιο-όγκος κυττάρου (μm ³)	696,38	56,78	288,40	12,80	117,95	5,58	349,66	19,40	230,98	6,61	256,45	9,36	364,22	20,97	295,86	13,60	226,96	6,18	293,05	13,30	286,94	12,64
Ξηρό βάρος κυττάρου (pg/cell)	178,27	14,54	73,83	3,28	30,20	1,43	89,51	4,97	59,13	1,69	65,65	2,40	93,24	5,37	75,74	3,48	58,10	1,58	75,02	3,40	73,46	3,24
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,18	0,00	0,11	0,00	0,04	0,00	0,11	0,00	0,07	0,00	0,09	0,00	0,10	0,00	0,05	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00	0,05	0,00
B-carotene (mg/L)	1,46	0,07	1,91	0,09	1,75	0,08	1,72	0,08	1,63	0,08	1,75	0,08	1,30	0,07	0,96	0,06	1,11	0,07	0,95	0,06	0,92	0,06
b-carotene (pg/cell)	1,44	0,17	1,25	0,15	1,33	0,15	1,35	0,16	1,42	0,17	1,33	0,15	1,18	0,16	1,34	0,20	1,49	0,23	1,81	0,26	1,35	0,21
b-carotene % dw	0,81%		1,69%		4,41%		1,51%		2,40%		2,03%		1,27%		1,77%		2,56%		2,42%		1,83%	
b-carotene mg/L/day	0,05		0,07		0,06		0,06		0,06		0,06		0,05		0,03		0,040		0,03		0,03	

Έντονη γραφή (Bold): ποσοστά β-καρωτενίου >5% επί του ξηρού βάρους του κυττάρου.

Σκίαση: τιμές παραγωγικότητας β-καρωτενίου >0,1 mg·L⁻¹·day⁻¹

Πίνακας 14. Συνέχεια.

Αλατότητα	40 ‰		60 ‰		80 ‰		100 ‰		120 ‰		140 ‰		160 ‰		180 ‰		200 ‰		220 ‰		240 ‰	
	Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD	
Στέλεχος	D2																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁴	6,97	0,29	5,71	0,25	1,33	0,09	3,06	0,15	0,91	0,07	1,23	0,08	1,64	0,10	1,41	0,09	1,40	0,09	1,58	0,09	1,30	0,08
Βιο-όγκος κυττάρου (μm ³)	320,35	16,24	500,86	35,70	533,76	39,25	421,42	27,14	532,76	39,14	573,58	43,54	699,19	57,08	735,96	61,05	671,38	54,08	827,85	70,95	699,67	57,13
Ξηρό βάρος κυττάρου (pg/cell)	82,01	4,16	128,22	9,14	136,64	10,05	107,88	6,95	136,39	10,02	146,84	11,15	178,99	14,61	188,40	15,63	171,87	13,84	211,93	18,16	179,12	14,63
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,06	0,00	0,07	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00	0,02	0,00
B-carotene (mg/L)	1,08	0,06	1,35	0,08	1,37	0,08	1,16	0,07	1,45	0,09	1,69	0,10	1,99	0,12	1,82	0,11	1,81	0,11	1,95	0,12	1,74	0,10
b-carotene (pg/cell)	1,54	0,21	2,37	0,32	10,31	0,89	3,78	0,47	15,98	1,29	13,73	1,25	12,14	1,20	12,94	1,22	12,96	1,22	12,32	1,33	13,39	1,25
b-carotene % dw	0,02		0,02		0,08		3,51%		11,72%		9,35%				6,87%		7,54%		5,81%			
b-carotene mg/L/day	0,04		0,05		0,05		0,04		0,05		0,06		0,07		0,06		0,06		0,07		0,06	
Στέλεχος	D3																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁴	3,97	0,18	3,05	0,15	5,95	0,26	5,06	0,22	1,01	0,07	2,23	0,12	2,81	0,14	2,20	0,12	1,92	0,11	0,91	0,07		
Βιο-όγκος κυττάρου (μm ³)	619,11	22,88	675,15	24,95	678,76	25,08	635,40	23,48	695,85	0,00	744,03	27,49	805,07	29,74	770,15	28,45	769,08	28,42	796,26	29,42		
Ξηρό βάρος κυττάρου (pg/cell)	158,49	5,86	172,84	6,39	173,76	6,42	162,66	6,01	178,14	0,00	190,47	7,04	206,10	7,61	197,16	7,28	196,89	7,28	203,84	7,53		
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,06	0,00	0,05	0,00	0,10	0,00	0,08	0,00	0,02	0,00	0,04	0,00	0,06	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00	0,02	0,00		
B-carotene (mg/L)	1,38	0,07	1,56	0,08	1,76	0,08	1,50	0,08	1,61	0,00	2,42	0,10	2,85	0,11	2,40	0,10	2,20	0,09	1,08	0,06		
b-carotene (pg/cell)	3,48	0,39	5,10	0,53	2,96	0,31	2,97	0,36	15,95	0,00	10,86	0,83	10,15	0,79	10,92	0,83	11,44	0,82	11,95	0,86		
b-carotene % dw	2,20%		2,95%		1,70%		1,82%		8,95%		5,70%		4,92%		5,54%		5,81%		5,86%			
b-carotene mg/L/day	0,05		0,06		0,06		0,05		0,06		0,09		0,10		0,09		0,08		0,04			
Στέλεχος	D4																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁴	0,92	0,07	1,19	0,08	1,07	0,08	2,13	0,11	1,13	0,08	1,44	0,09	2,43	0,13	1,73	0,10	1,45	0,09	1,07	0,08		
Βιο-όγκος κυττάρου (μm ³)	1325,69	124,62	1308,83	122,80	852,81	73,64	529,51	38,79	927,79	81,73	1353,44	127,61	1341,25	126,30	729,88	60,39	976,98	87,03	919,62	80,85		
Ξηρό βάρος κυττάρου (pg/cell)	339,38	31,90	335,06	31,44	218,32	18,85	135,55	9,93	237,51	20,92	346,48	32,67	343,36	32,33	186,85	15,46	250,11	22,28	235,42	20,70		
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,03	0,00	0,04	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,05	0,00	0,08	0,00	0,03	0,00	0,04	0,00	0,03	0,00		
B-carotene (mg/L)	1,46	0,09	1,66	0,10	1,57	0,09	2,35	0,14	1,61	0,10	1,84	0,11	2,57	0,16	2,06	0,13	1,85	0,11	1,85	0,09		
b-carotene (pg/cell)	15,89	1,29	13,97	1,25	14,69	1,13	11,04	1,27	14,31	1,25	12,80	1,22	10,58	1,23	11,88	1,30	12,77	1,22	17,31	1,13		
b-carotene % dw	4,68%		4,17%		6,73%		8,14%		6,02%		3,69%		3,08%		6,36%		5,11%		7,35%			
b-carotene mg/L/day	0,05		0,06		0,06		0,08		0,06		0,07		0,09		0,07		0,07		0,07			
Στέλεχος	D5																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁴	3,71	0,17	5,88	0,25	2,04	0,11	5,61	0,24	1,02	0,07	1,50	0,09	3,26	0,16	11,80	0,47	4,32	0,20	7,30	0,31	4,84	0,21
Βιο-όγκος κυττάρου (μm ³)	615,18	48,03	196,11	2,85	556,78	41,73	338,73	18,23	762,53	63,91	559,55	42,03	639,01	50,60	459,63	31,26	493,83	34,94	514,64	37,19	422,14	27,22
Ξηρό βάρος κυττάρου (pg/cell)	157,49	12,30	50,20	0,73	142,54	10,68	86,71	4,67	195,21	16,36	143,25	10,76	163,59	12,95	117,67	8,00	126,42	8,94	131,75	9,52	108,07	6,97
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,06	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,05	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,05	0,00	0,14	0,00	0,05	0,00	0,10	0,00	0,05	0,00
B-carotene (mg/L)	1,06	0,06	1,22	0,07	1,47	0,09	1,20	0,07	1,24	0,07	1,89	0,11	1,71	0,10	2,06	0,13	1,76	0,11	1,54	0,09	1,14	0,07
b-carotene (pg/cell)	2,85	0,35	2,07	0,28	7,23	0,82	2,13	0,29	12,16	1,00	12,57	1,22	5,25	0,63	1,75	0,28	4,06	0,55	2,11	0,29	2,36	0,33
b-carotene % dw	1,81%		4,12%		5,07%		2,46%		6,23%		8,77%		3,21%		1,48%		3,21%		1,60%		2,18%	
b-carotene mg/L/day	0,04		0,04		0,05		0,04		0,04		0,07		0,06		0,07		0,06		0,05		0,04	

Έντονη γραφή (Bold): ποσοστά β-καρωτενίου >5% επί του ξηρού βάρους του κυττάρου.

Σκίαση: τιμές παραγωγικότητας β-καρωτενίου >0,1 mg·L⁻¹·day⁻¹

Πίνακας 14. Συνέχεια.

Αλατότητα	40 ‰		60 ‰		80 ‰		100 ‰		120 ‰		140 ‰		160 ‰		180 ‰		200 ‰		220 ‰		240 ‰	
	Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD	
Στέλεχος	D6																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵	0,92	0,07	3,70	0,17	1,06	0,08	1,52	0,09	0,88	0,07	1,29	0,08	1,55	0,09	1,45	0,09	1,03	0,07	1,00	0,07	0,98	0,07
Βιο-όγκος κυτάρου (μm ³)	583,82	44,65	519,89	37,75	674,09	54,38	415,36	24,49	618,53	48,39	423,06	27,32	540,18	39,94	517,68	37,52	488,77	34,40	656,88	52,52	570,01	43,16
Ξηρό βάρος κυτάρου (pg/cell)	149,46	11,43	133,09	9,66	172,57	13,92	106,33	6,27	158,34	12,39	108,30	6,99	138,29	10,22	132,53	9,61	125,12	8,81	168,16	13,45	145,92	11,05
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,01	0,00	0,05	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00
B-carotene (mg/L)	0,85	0,05	1,06	0,06	1,35	0,08	1,31	0,08	1,21	0,07	1,73	0,10	1,92	0,12	1,85	0,11	1,47	0,09	1,52	0,09	1,29	0,08
b-carotene (pg/cell)	9,30	0,71	2,85	0,35	12,65	1,00	8,64	0,89	13,74	1,00	13,45	1,25	12,42	1,33	12,75	1,22	14,25	1,29	15,22	1,29	13,09	1,14
b-carotene % dw	0,06		0,02		0,07		8,13%		8,68%		12,42%				9,62%		11,39%		9,05%			
b-carotene mg/L/day	0,03		0,04		0,05		0,05		0,04		0,06		0,07		0,07		0,05		0,05		0,05	
Στέλεχος	D7																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵					3,37	0,16	6,89	0,29			4,16	0,19	1,66	0,10	2,68	0,14	3,33	0,16	3,53	0,17		
Βιο-όγκος κυτάρου (μm ³)					610,08	47,48	662,84	53,16			621,97	48,76	584,50	44,72	559,85	42,06	609,55	47,42	612,52	47,74		
Ξηρό βάρος κυτάρου (pg/cell)					156,18	12,15	169,69	13,61			159,22	12,48	149,63	11,45	143,32	10,77	156,05	12,14	156,81	12,22		
Ξηρό Βάρος (g/L)					0,05	0,00	0,12	0,00			0,07	0,00	0,02	0,00	0,04	0,00	0,05	0,00	0,06	0,00		
B-carotene (mg/L)					1,03	0,06	1,29	0,08			1,09	0,06	0,91	0,05	0,98	0,06	1,03	0,06	1,04	0,06		
b-carotene (pg/cell)					3,06	0,38	1,87	0,28			2,62	0,32	5,46	0,50	3,66	0,43	3,09	0,38	2,96	0,35		
b-carotene % dw					1,96%		1,10%				1,65%		3,65%		2,55%		1,98%		1,89%			
b-carotene mg/L/day					0,04		0,05				0,04		0,03		0,04		0,04		0,04		0,04	
Στέλεχος	D8																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵					2,92	0,14	1,07	0,08	0,86	0,07	0,99	0,07	0,84	0,07	0,93	0,07	0,94	0,07	0,86	0,07		
Βιο-όγκος κυτάρου (μm ³)					648,40	51,61	660,29	52,89	688,20	55,90	656,15	52,44	656,15	52,44	640,55	50,76	640,55	50,76	643,84	51,12		
Ξηρό βάρος κυτάρου (pg/cell)					165,99	13,21	169,03	13,54	176,18	14,31	167,97	13,42	167,97	13,42	163,98	12,99	163,98	12,99	164,82	13,09		
Ξηρό Βάρος (g/L)					0,05	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00		
B-carotene (mg/L)					1,22	0,07	1,28	0,08	1,42	0,08	1,51	0,09	1,26	0,07	1,52	0,09	1,18	0,07	1,20	0,07		
b-carotene (pg/cell)					4,17	0,50	11,93	1,00	16,49	1,14	15,26	1,29	14,90	1,00	16,46	1,29	12,57	1,00	13,89	1,00		
b-carotene % dw					2,51%		7,06%		9,36%		9,08%		8,87%		10,04%		7,66%		8,43%			
b-carotene mg/L/day					0,04		0,05		0,05		0,05		0,04		0,05		0,04		0,04		0,04	
Στέλεχος	D29																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵	3,70	0,17	3,59	0,17	4,17	0,19	4,41	0,20	4,15	0,19	4,39	0,20	2,88	0,14	2,42	0,13	2,31	0,12	2,55	0,13	2,55	0,13
Βιο-όγκος κυτάρου (μm ³)	615,07	48,01	613,48	47,84	622,18	47,78	625,69	49,16	621,87	48,75	625,47	49,14	602,76	46,69	595,97	45,96	588,22	45,12	581,32	44,38	585,88	44,87
Ξηρό βάρος κυτάρου (pg/cell)	157,46	12,29	157,05	12,25	159,28	12,23	160,18	12,58	159,20	12,48	160,12	12,58	154,31	11,95	152,57	11,77	150,58	11,55	148,82	11,36	149,99	11,49
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,06	0,00	0,06	0,00	0,07	0,00	0,07	0,00	0,07	0,00	0,07	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00	0,03	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00
B-carotene (mg/L)	1,06	0,06	0,75	0,06	1,09	0,06	1,11	0,06	1,09	0,06	1,11	0,06	1,00	0,06	0,96	0,05	0,92	0,05	0,89	0,05	0,91	0,05
b-carotene (pg/cell)	2,85	0,35	2,07	0,35	2,61	0,32	2,51	0,30	2,62	0,32	2,52	0,30	3,46	0,43	3,97	0,38	4,01	0,42	3,50	0,38	3,58	0,38
b-carotene % dw	1,81%		1,32%		1,64%		1,57%		1,65%		1,57%		2,24%		2,60%		2,66%		2,35%		2,39%	
b-carotene mg/L/day	0,04		0,03		0,04		0,04		0,04		0,04		0,04		0,03		0,03		0,03		0,03	

Έντονη γραφή (Bold): ποσοστά β-καρωτενίου >5% επί του ξηρού βάρους του κυττάρου.

Σκίαση: τιμές παραγωγικότητας β-καρωτενίου >0,1 mg·L⁻¹·day⁻¹

Πίνακας 14. Συνέχεια.

Αλατότητα	40 ‰		60 ‰		80 ‰		100 ‰		120 ‰		140 ‰		160 ‰		180 ‰		200 ‰		220 ‰		240 ‰	
	Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD	
Στέλεχος	D30																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵	0,96	0,07	1,64	0,10	1,54	0,09	1,70	0,10	1,95	0,11	1,66	0,10	1,22	0,08	1,29	0,08	1,37	0,09	1,39	0,09	1,91	0,11
Βιο-όγκος κυτάρου (μm ³)	876,62	76,21	992,69	88,72	986,09	88,01	719,12	59,23	771,18	64,84	925,65	81,49	769,95	64,71	734,46	60,88	963,54	85,58	670,26	53,96	729,88	60,39
Ξηρό βάρος κυτάρου (pg/cell)	271,75	23,63	307,73	27,50	305,69	27,28	222,93	18,36	239,07	20,10	286,95	25,26	238,69	20,06	227,68	18,87	298,70	26,53	207,78	16,73	226,26	18,72
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,03	0,00	0,05	0,00	0,05	0,00	0,04	0,00	0,05	0,00	0,05	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,04	0,00	0,03	0,00	0,04	0,00
B-carotene (mg/L)	1,49	0,07	1,99	0,09	2,65	0,10	2,77	0,11	2,95	0,11	2,74	0,11	3,15	0,12	2,47	0,10	2,53	0,10	2,54	0,10	2,19	0,09
b-carotene (pg/cell)	15,53	1,00	12,12	0,90	17,24	1,11	16,29	1,10	15,16	1,00	16,53	1,10	25,87	1,50	19,13	1,25	18,44	1,11	18,29	1,11	11,45	0,82
b-carotene % dw	0,06		0,04		0,06		7,31%		6,34%		5,76%				8,40%		6,17%		8,80%			
b-carotene mg/L/day	0,05		0,07		0,09		0,10		0,11		0,10		0,11		0,09		0,09		0,09		0,08	
Στέλεχος	D31																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵	1,18	0,08	1,30	0,08	1,05	0,08	1,61	0,10	1,42	0,09	1,04	0,07	1,46	0,00	1,28	0,00	1,22	0,08	1,18	0,08	1,25	0,08
Βιο-όγκος κυτάρου (μm ³)	715,54	58,85	796,39	67,56	966,20	85,87	731,14	60,53	726,87	60,07	932,87	82,27	772,70	65,01	748,64	62,41	775,44	65,30	670,26	53,96	729,88	60,39
Ξηρό βάρος κυτάρου (pg/cell)	221,82	18,24	246,88	20,94	299,52	26,62	226,65	18,76	225,33	18,62	289,19	25,50	239,54	20,15	232,08	19,35	240,39	20,24	207,78	16,73	226,26	18,72
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,03	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,04	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00
B-carotene (mg/L)	1,65	0,09	0,75	0,12	2,15	0,16	2,19	0,17	2,20	0,18	2,14	0,17	2,08	0,20	2,17	0,15	2,20	0,16	2,13	0,16	1,71	0,13
b-carotene (pg/cell)	14,01	1,13	5,74	1,50	20,37	2,00	13,58	1,70	15,48	2,00	20,49	2,43	14,24	0,00	16,93	0,00	17,98	2,00	18,01	2,00	13,61	1,63
b-carotene % dw	6,32%		2,33%		6,80%		5,99%		6,87%		7,09%		5,94%		7,29%		7,48%		8,67%		6,02%	
b-carotene mg/L/day	0,06		0,03		0,08		0,08		0,08		0,08		0,07		0,08		0,08		0,08		0,06	
Στέλεχος	D32																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵	1,31	0,08	1,63	0,10	1,01	0,07	1,10	0,08	1,14	0,08	1,16	0,08	1,66	0,10	1,50	0,09	1,36	0,09	1,44	0,09	1,39	0,09
Βιο-όγκος κυτάρου (μm ³)	807,32	68,74	851,71	73,52	918,29	80,70	960,39	85,24	927,79	81,73	763,88	64,06	808,62	68,88	748,64	62,41	913,86	80,22	924,85	81,41	917,68	80,64
Ξηρό βάρος κυτάρου (pg/cell)	250,27	21,31	264,03	22,79	284,67	25,02	297,72	26,42	287,62	25,34	236,80	19,86	250,67	21,35	232,08	19,35	283,30	24,87	286,70	25,24	284,48	25,00
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,03	0,00	0,04	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,04	0,00	0,03	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00
B-carotene (mg/L)	2,48	0,15	2,72	0,17	2,26	0,14	3,28	0,20	2,71	0,17	1,79	0,11	2,01	0,12	2,63	0,16	2,52	0,16	2,58	0,16	2,54	0,16
b-carotene (pg/cell)	19,00	1,88	16,70	1,70	22,42	2,00	29,91	2,50	23,75	2,13	15,36	1,38	12,07	1,20	17,45	1,78	18,49	1,78	17,92	1,78	18,29	1,78
b-carotene % dw	7,59%		6,33%		7,88%		10,05%		8,26%		6,49%		4,82%		7,52%		6,53%		6,25%		6,43%	
b-carotene mg/L/day	0,09		0,10		0,08		0,12		0,10		0,06		0,07		0,09		0,09		0,09		0,09	
Στέλεχος	D35																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵	8,80	0,69	15,45	0,78	10,83	0,75	10,53	0,79	7,92	0,51	10,20	0,79	12,62	0,83	8,48	0,69	6,40	0,40	7,80	0,51	4,25	0,30
Βιο-όγκος κυτάρου (μm ³)	558,23	43,25	535,12	42,02	543,14	41,56	541,11	41,58	521,35	40,98	535,41	42,01	523,03	40,75	522,24	41,25	532,87	41,18	556,12	42,06	570,71	43,87
Ξηρό βάρος κυτάρου (pg/cell)	173,05	13,41	165,89	13,03	168,37	12,88	167,74	12,89	161,62	12,70	165,98	13,02	162,14	12,63	161,89	12,79	165,19	12,77	172,40	13,04	176,92	13,60
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,15	0,00	0,26	0,00	0,18	0,00	0,18	0,00	0,13	0,00	0,17	0,00	0,20	0,00	0,14	0,00	0,11	0,00	0,13	0,00	0,08	0,00
B-carotene (mg/L)	5,30	0,11	8,43	0,15	4,79	0,12	8,24	0,13	6,54	0,11	5,60	0,13	7,93	0,14	6,74	0,12	6,16	0,12	6,91	0,12	6,12	0,13
b-carotene (pg/cell)	6,02	0,16	5,46	0,19	4,42	0,16	7,82	0,17	8,26	0,22	5,49	0,16	6,29	0,17	7,95	0,17	9,63	0,30	8,85	0,23	14,41	0,44
b-carotene % dw	3,48%		3,29%		2,63%		4,66%		5,11%		3,31%		3,88%		4,91%		5,83%		5,14%		8,14%	
b-carotene mg/L/day	0,19		0,30		0,17		0,29		0,23		0,20		0,28		0,24		0,22		0,25		0,22	

Έντονη γραφή (Bold): ποσοστά β-καρωτενίου >5% επί του ξηρού βάρους του κυττάρου.

Σκίαση: τιμές παραγωγικότητας β-καρωτενίου >0,1 mg·L⁻¹·day⁻¹

Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται οι μετρήσεις του διερευνητικού (screening) πειράματος αλατότητας (αεριζόμενες καλλιέργειες 250 mL) για τα στελέχη CCAP 19/18 (στέλεχος μάρτυρας), AthU-AI Dun 2, Dun 5, Dun 6, Dun 8, Dun 30, Dun 31 και Dun 32. Τα αποτελέσματα για τα στελέχη AthU-AI Dun 3-4 και Dun 35 παραλείπονται διότι οι καλλιέργειες αυτών κατέρρευσαν σε όλες τις επαναλήψεις.

Συγκεκριμένα για το στέλεχος AthU-AI Dun 35, αξίζει να αναφερθεί ότι ακόμη και στο προκαταρκτικό πείραμα ο χρωματισμός της καλλιέργειας δεν αντιστοιχούσε στη μετρηθείσα παραγωγικότητα σε β-καρωτένιο, δηλ. ήταν καστανοπράσινος και όχι κιτρινέρυθρος ή ερυθρός όπως θα αναμενόταν. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε, το στέλεχος εμφάνισε εξαιρετικά υψηλή κυτταρική πυκνότητα. Αυτή η υψηλή κυτταρική συγκέντρωση ενδεχομένως προκάλεσε παρεμβολές στην αναλυτική μέθοδο (φασματοφωτομετρία) και λόγω αποκλίσεων από τον νόμο Beer-Lambert (Mehta 2012) είχε ως αποτέλεσμα υπερεκτίμηση της παραγωγικότητας του β-καρωτενίου στην καλλιέργεια (παρατηρούμε ότι η περιεκτικότητα σε $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ φαίνεται να είναι σημαντικά μεγαλύτερη για το στέλεχος Dun 35 σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη). Ως εκ τούτου οι καλλιέργειες του συγκεκριμένου στελέχους χρειάστηκε να αραιωθούν πριν από την φωτομέτρηση.

Στις Εικόνες 53-56 παρουσιάζονται διαγραμματικά τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των στελεχών για κάθε μία από τις μελετηθείσες παραμέτρους αύξησης και παραγωγής β-καρωτενίου των καλλιεργειών. Ως παράμετροι αύξησης επιλέχθηκαν:

(α) η παραγωγή (yield, διαφορά αρχικής και τελικής κυτταρικής πυκνότητας) σε $\text{κύτταρα}\cdot\text{mL}^{-1}$

(β) η ξηρή βιομάζα της καλλιέργειας σε $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Ως παράμετροι παραγωγής β-καρωτενίου επιλέχθηκαν:

(γ) η περιεκτικότητα του κυττάρου σε β-καρωτένιο σε $\text{pg}\cdot\text{κύτταρο}^{-1}$

(δ) η ημερήσια παραγωγή β-καρωτενίου στις καλλιέργειες σε $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{ημέρα}^{-1}$.

Πίνακας 15. Παράμετροι καλλιέργειας και παραγωγής β-καρωτενίου των στελεχών *Dunaliella salina* στο διερευνητικό (screening) πείραμα επίδρασης αλατότητας (αεριζόμενες καλλιέργειες μέσης κλίμακας). Αναγράφονται οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση για κάθε συνθήκη (στέλεχος x αλατότητα).

Αλατότητα	40 ‰ Mean ± STD		60 ‰ Mean ± STD		80 ‰ Mean ± STD		100 ‰ Mean ± STD		120 ‰ Mean ± STD		140 ‰ Mean ± STD		160 ‰ Mean ± STD		180 ‰ Mean ± STD		200 ‰ Mean ± STD		220 ‰ Mean ± STD		240 ‰ Mean ± STD	
Στέλεχος	19-18 CCAP																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁴ 5			5,00	0,22	7,65	0,32	3,23	0,16	4,79	0,21	5,02	0,22	2,35	0,12	2,35	0,12	1,66	0,10	1,33	0,09	1,81	0,10
Βιο-όγκος κυτάρου (μm ³)			716,52	58,95	519,67	37,73	568,16	42,96	613,30	47,82	628,75	49,49	592,26	45,56	705,87	57,80	810,46	69,08	803,26	68,30	825,27	7,67
Ξηρό βάρος κυτάρου (pg/cell)			222,12	18,27	161,10	11,70	176,13	13,32	190,12	14,82	194,91	15,34	183,60	14,12	218,82	17,92	251,24	21,41	249,01	21,17	255,83	2,38
Ξηρό Βάρος (g/L)			0,11	0,00	0,12	0,00	0,06	0,00	0,09	0,00	0,10	0,00	0,04	0,00	0,05	0,00	0,04	0,00	0,03	0,00	0,05	0,00
B-carotene (mg/L)			4,91	0,28	6,31	0,39	5,13	0,36	4,45	0,27	4,88	0,28	3,26	0,21	2,97	0,18	1,92	0,12	1,91	0,12	2,57	0,16
b-carotene (pg/cell)			9,81	1,27	8,25	1,22	15,87	2,25	9,29	1,29	9,73	1,27	13,85	1,75	12,65	1,50	11,56	1,20	14,33	1,33	14,19	1,60
b-carotene % dw			4,42%		5,12%		9,01%		4,88%		4,99%				5,78%		4,60%		5,76%			
b-carotene mg/L/day			0,25		0,32		0,26		0,22		0,24		0,16		0,15		0,10		0,10		0,13	
Στέλεχος	D 2																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁴ 5	7,32	0,00	6,58	0,28	4,86	0,22	4,60	0,21	1,00	0,07	1,92	0,11	4,12	0,00	3,52	0,17	4,76	0,21	1,69	0,10		
Βιο-όγκος κυτάρου (μm ³)	320,35	0,00	500,86	35,70	533,76	39,25	421,42	27,14	532,76	39,14	573,58	43,54	699,19	0,00	735,96	61,05	671,38	54,08	827,85	70,95		
Ξηρό βάρος κυτάρου (pg/cell)	99,31	0,00	155,27	11,07	165,46	12,17	130,64	8,41	165,16	12,13	177,81	13,50	216,75	0,00	228,15	18,93	208,13	16,76	256,63	21,99		
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,07	0,00	0,10	0,00	0,08	0,00	0,06	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00	0,09	0,00	0,08	0,00	0,10	0,00	0,04	0,00		
B-carotene (mg/L)	5,22	0,00	2,71	0,14	2,45	0,14	3,79	0,19	1,67	0,11	4,28	0,14	6,50	0,00	2,80	0,14	3,54	0,19	1,77	0,09		
b-carotene (pg/cell)	7,12	0,00	4,12	0,50	5,05	0,64	8,24	0,90	16,71	1,57	22,29	1,27	15,77	0,00	7,95	0,82	7,44	0,90	10,50	0,90		
b-carotene % dw	7,17%		2,65%		3,05%		6,30%		10,12%		12,54%		7,27%		3,48%		3,58%		4,09%			
b-carotene mg/L/day	0,19		0,14		0,12		0,19		0,08		0,21		0,32		0,14		0,18		0,09			
Στέλεχος	D 5																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁴ 5	3,41	0,16	4,81	0,21	4,51	0,20	4,13	0,19	3,25	0,20					4,02	0,11						
Βιο-όγκος κυτάρου (μm ³)	615,18	48,03	196,11	2,85	556,78	41,73	338,73	18,23	762,53	63,91					459,63	31,26						
Ξηρό βάρος κυτάρου (pg/cell)	190,71	14,89	60,79	0,88	172,60	12,94	105,01	5,65	236,38	19,81					142,49	9,69						
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,07	0,00	0,03	0,00	0,08	0,00	0,04	0,00	0,08	0,00					0,06	0,00						
B-carotene (mg/L)	1,69	0,08	3,01	0,11	6,08	0,17	3,60	0,13	1,40	0,07					2,80	0,10						
b-carotene (pg/cell)	4,95	0,00	6,26	0,00	13,49	0,00	8,72	0,00	4,32	0,00					6,98	0,00						
b-carotene % dw	2,60%		10,30%		7,81%		8,31%		1,83%						4,90%							
b-carotene mg/L/day	0,06		0,15		0,30		0,18		0,07						0,14							
Στέλεχος	D 6																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁴ 5			2,04	0,11	2,80	0,14	4,61	0,21	5,70	0,25	4,28	0,19	5,86	0,25	2,54	0,27	2,77	0,14	4,38	0,20	4,48	0,20
Βιο-όγκος κυτάρου (μm ³)			519,89	37,75	674,09	54,38	415,36	24,49	618,53	48,39	423,06	27,32	540,18	39,94	517,68	37,52	488,77	34,40	656,88	52,52	570,01	43,16
Ξηρό βάρος κυτάρου (pg/cell)			161,17	11,70	208,97	16,86	128,76	7,59	191,74	15,00	131,15	8,47	167,46	12,38	160,48	11,63	151,52	10,66	203,63	16,28	176,70	13,38
Ξηρό Βάρος (g/L)			0,03	0,00	0,06	0,00	0,06	0,00	0,11	0,00	0,06	0,00	0,10	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00	0,09	0,00	0,08	0,00
B-carotene (mg/L)			2,61	0,10	3,17	0,11	3,77	0,11	3,64	0,14	4,91	0,15	4,56	0,17	2,47	0,00	1,97	0,09	2,79	0,11	2,78	0,10
b-carotene (pg/cell)			12,78	0,00	11,33	0,00	8,18	0,00	6,39	0,00	11,46	0,00	7,78	0,00	9,72	0,00	7,11	0,00	6,38	0,00	6,21	0,00
b-carotene % dw			7,93%		5,42%		6,35%		3,33%		8,74%		4,65%		6,06%		4,69%		3,13%		3,52%	
b-carotene mg/L/day			0,13		0,16		0,19		0,18		0,25		0,23		0,12		0,10		0,14		0,14	

Έντονη γραφή (Bold): ποσοστά β-καρωτενίου >5% επί του ξηρού βάρους του κυτάρου.

Σκίαση: τιμές παραγωγικότητας β-καρωτενίου >0,3 mg·L⁻¹·day⁻¹

Πίνακας 15. Συνέχεια.

Αλατότητα	40 ‰		60 ‰		80 ‰		100 ‰		120 ‰		140 ‰		160 ‰		180 ‰		200 ‰		220 ‰		240 ‰	
	Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD		Mean ± STD	
Στέλεχος	D 8																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵	1,42	0,09	2,86	0,14	2,27	0,12	3,94	0,18	4,26	0,19	6,08	0,26										
Βιο-όγκος κυττάρου (μm ³)	681,27	25,18	659,16	24,36	648,40	24,96	660,29	24,40	688,20	25,43	656,15	24,25										
Ξηρό βάρος κυττάρου (pg/cell)	211,19	7,81	204,34	7,55	201,00	7,74	204,69	7,56	213,34	7,88	203,41	7,52										
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,03	0,00	0,06	0,00	0,05	0,00	0,08	0,00	0,09	0,00	0,12	0,00										
B-carotene (mg/L)	1,95	0,08	1,95	0,09	1,63	0,07	3,37	0,10	4,36	0,17	3,91	0,14										
b-carotene (pg/cell)	13,75	0,00	6,82	0,00	7,20	0,00	8,55	0,00	10,23	0,00	6,44	0,00										
b-carotene % dw	0,07		3,34%		3,58%		4,18%		4,79%		3,17%											
b-carotene mg/L/day	0,07		0,10		0,08		0,17		0,22		0,20											
Στέλεχος	D 30																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵					4,40	0,35	5,92	0,38	6,07	0,04	9,30	0,64	6,11	0,40	7,13	0,56			12,37	0,87		
Βιο-όγκος κυττάρου (μm ³)					759,31	55,12	698,05	46,21	592,14	41,23	628,54	43,01	597,20	40,98	601,80	45,25			559,73	40,85		
Ξηρό βάρος κυττάρου (pg/cell)					235,39	17,09	216,40	14,33	183,56	12,78	194,85	13,33	185,13	12,70	186,56	14,03			173,52	12,66		
Ξηρό Βάρος (g/L)					0,10	0,00	0,13	0,00	0,11	0,00	0,18	0,00	0,11	0,00	0,13	0,00			0,21	0,00		
B-carotene (mg/L)					5,71	0,15	6,56	0,17	2,70	0,10	4,29	0,12	4,48	0,12	5,29	0,13			11,33	0,20		
b-carotene (pg/cell)					12,98	0,00	11,08	0,00	4,45	0,00	4,61	0,00	7,33	0,00	7,42	0,00			9,16	0,00		
b-carotene % dw					5,51%		5,12%		2,43%		2,37%		3,96%		3,98%				5,28%			
b-carotene mg/L/day					0,29		0,33		0,14		0,21		0,22		0,26				0,57			
Στέλεχος	D 31																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵	0,99	0,07	1,73	0,10	0,86	0,07	1,46	0,09	1,15	0,08												
Βιο-όγκος κυττάρου (μm ³)	715,54	58,85	796,39	67,56	966,20	85,87	731,14	60,53	726,87	60,07												
Ξηρό βάρος κυττάρου (pg/cell)	221,82	18,24	246,88	20,94	299,52	26,62	226,65	18,76	225,33	18,62												
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,02	0,00	0,04	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00												
B-carotene (mg/L)	1,58	0,09	5,82	0,33	1,10	0,07	2,97	0,17	1,67	0,10												
b-carotene (pg/cell)	16,01	0,00	33,67	0,00	12,81	0,00	20,37	0,00	14,57	0,00												
b-carotene % dw	7,22%		13,64%		4,28%		8,99%		6,47%													
b-carotene mg/L/day	0,06		0,29		0,06		0,15		0,08													
Στέλεχος	D 32																					
Κυτταρική πυκνότητα (cells/ml) x10 ⁵	5,30	0,41	3,37	0,39	1,76	0,10	5,72	0,45	4,52	0,32	5,26	0,41	3,76	0,29	4,10	0,31			5,78	43,65		
Βιο-όγκος κυττάρου (μm ³)	713,21	56,31	712,85	54,29	810,32	80,70	728,15	69,58	725,36	62,13	711,22	61,58	721,03	63,74	724,85	61,98			728,52	65,32		
Ξηρό βάρος κυττάρου (pg/cell)	182,58	14,42	182,49	13,90	207,44	20,66	186,41	17,81	185,69	15,91	182,07	15,76	184,58	16,32	185,56	15,87			186,50	16,72		
Ξηρό Βάρος (g/L)	0,10	0,00	0,06	0,00	0,04	0,00	0,11	0,00	0,08	0,00	0,10	0,00	0,07	0,00	0,08	0,00			0,11	0,07		
B-carotene (mg/L)	3,72	0,12	4,65	0,12	2,10	0,11	6,16	0,15	5,77	0,16	6,38	0,17	3,87	0,13	3,50	0,13			3,67	0,14		
b-carotene (pg/cell)	7,02	0,00	13,81	0,00	11,93	0,00	10,76	0,00	12,75	0,00	12,14	0,00	10,30	0,00	8,54	0,00			6,35	0,00		
b-carotene % dw	3,84%		7,57%		5,75%		5,77%		6,87%		6,67%		5,58%		4,60%				3,41%			
b-carotene mg/L/day	0,13		0,23		0,11		0,31		0,32		0,32		0,19		0,18				0,18			

Έντονη γραφή (Bold): ποσοστά β-καρωτενίου >5% επί του ξηρού βάρους του κυττάρου.

Σκίαση: τιμές παραγωγικότητας β-καρωτενίου >0,3 mg·L⁻¹·day⁻¹

Στην Εικόνα 53 παρουσιάζεται η κυτταρική πυκνότητα των στελεχών σε όλο το εύρος αλατοτήτων. Οι μετρήσεις είναι ενδεικτικές της αύξησης και της επιβίωσης των στελεχών σε κάθε συνθήκη αλατότητας. Το στέλεχος μάρτυρας (CCAP 19/18) και τα στελέχη AthU-AI Dun 2, Dun 6, Dun 32 ήταν εκείνα που επιβίωσαν στο μεγαλύτερο εύρος αλατοτήτων, με το στέλεχος Dun 2 να εμφανίζει μέγιστη τιμή αύξησης $8,63 \times 10^5$ κύτταρα·mL⁻¹ σε αλατότητα 40‰, κάτι που δεν ήταν αναμενόμενο δεδομένου ότι πρόκειται για αλόφιλο στέλεχος. Τα στελέχη AthU-AI Dun 6 και Dun 32 εμφάνισαν μέγιστες τιμές $5,92 \times 10^5$ κύτταρα·mL⁻¹ (σε αλατότητα 160‰) και $5,91 \times 10^5$ κύτταρα·mL⁻¹ σε αλατότητα 220‰ αντιστοίχως. Αντιθέτως, τα στελέχη Dun 5, Dun 8 και Dun 31 επιβίωσαν σε ένα περιορισμένο εύρος αλατοτήτων, εμφανίζοντας χαμηλή αύξηση σε ορισμένες αλατότητες. Συγκεκριμένα, τα στελέχη Dun 5 και Dun 31 εμφάνισαν μηδενική επιβίωση σε αλατότητες >120‰ και το στέλεχος Dun 8 δεν επιβίωσε σε αλατότητες >140‰, ενώ και η αύξησή τους στις υπόλοιπες αλατότητες ήταν σχετικά χαμηλή με μέγιστα $4,93 \times 10^5$ κύτταρα·mL⁻¹ στο 60‰ για το Dun 5, $1,75 \times 10^5$ στο 60‰ για το Dun 31 και $6,11 \times 10^5$ κύτταρα·mL⁻¹ στο 140‰ για το Dun 8. Το στέλεχος Dun 31 εμφάνισε γενικότερα τη μικρότερη αύξηση σε σχέση με όλα τα στελέχη. Το στέλεχος AthU-AI Dun 30 ήταν εκείνο που παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές αύξησης σε όλο το εύρος των αλατοτήτων όπου επιβίωσε και μάλιστα παρουσίασε υψηλές τιμές σε υψηλότερες αλατότητες με μέγιστο $1,26 \times 10^6$ κύτταρα·mL⁻¹ σε αλατότητα 220‰, κυτταρική πυκνότητα που ήταν και η μεγαλύτερη τιμή συνολικά για την παράμετρο αυτή. Το στέλεχος μάρτυρας εμφάνισε μέγιστο $7,82$ κύτταρα·mL⁻¹ στα 80‰, και συνεπώς, τα στελέχη AthU-AI που εμφάνισαν συγκρίσιμη με αυτό αύξηση ήταν τα Dun 2, Dun 8 και Dun 30. Στον Πίνακα 16 παρουσιάζεται η αντίστοιχη ανάλυση διακύμανσης (ατομικός έλεγχος MANOVA) για την παράμετρο “κυτταρική παραγωγή” (cell yield) όπου φαίνεται ότι η επίδραση του παράγοντα “στέλεχος” αλλά και της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων (στέλεχος*αλατότητα) είναι στατιστικά πιο σημαντική ($p < 0,05$) από ό,τι η επίδραση του παράγοντα “αλατότητα” ($p > 0,05$).

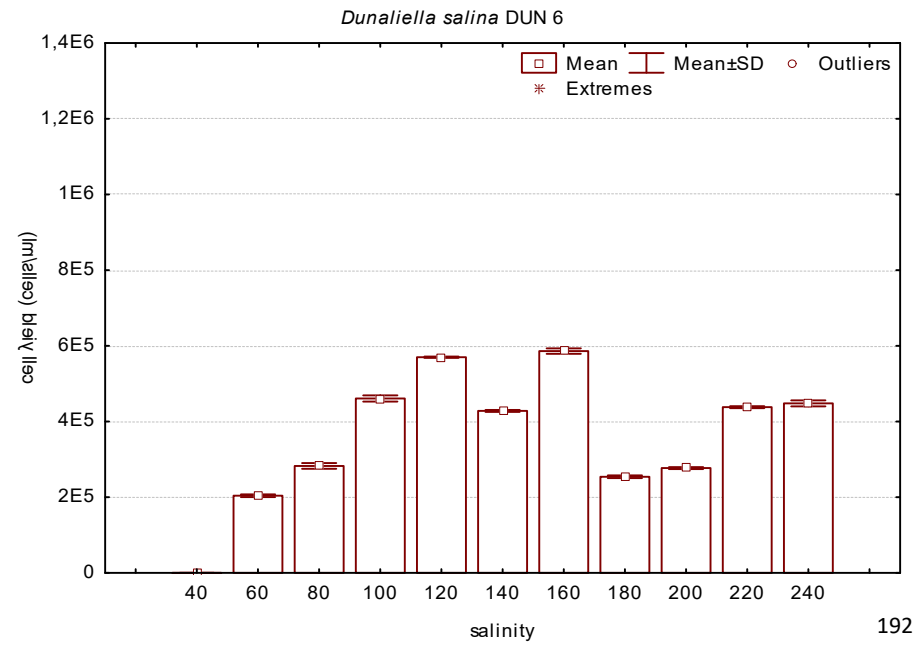
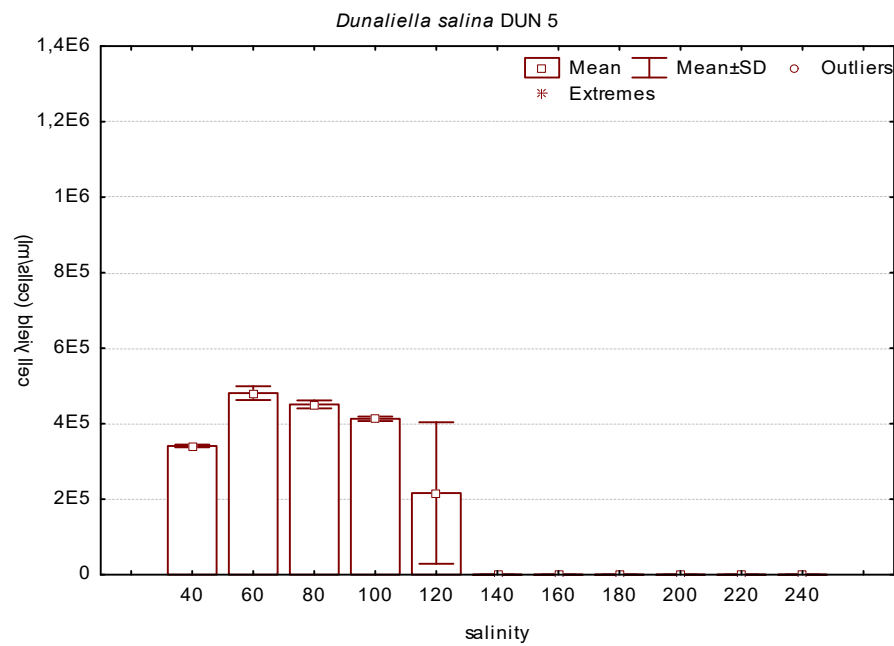
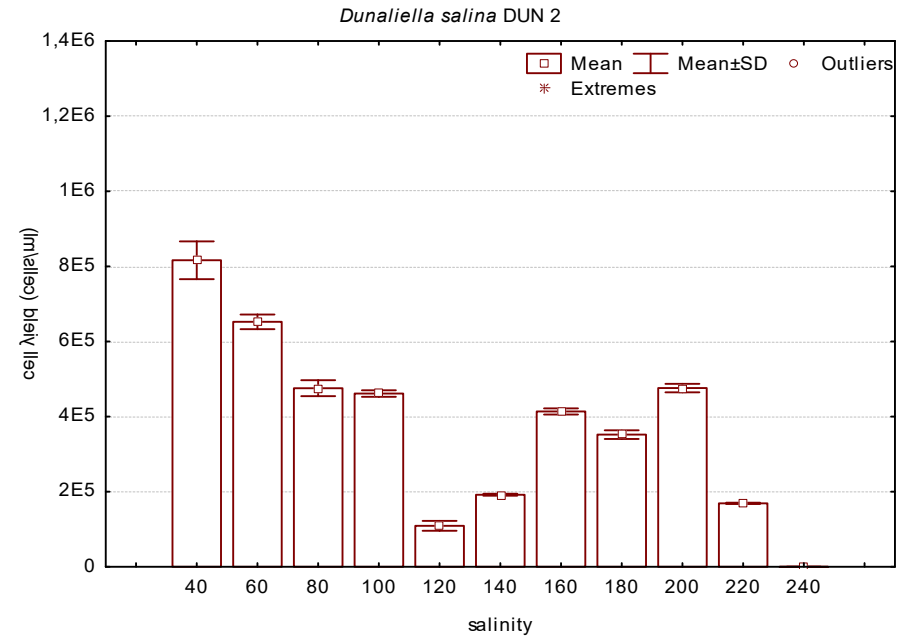
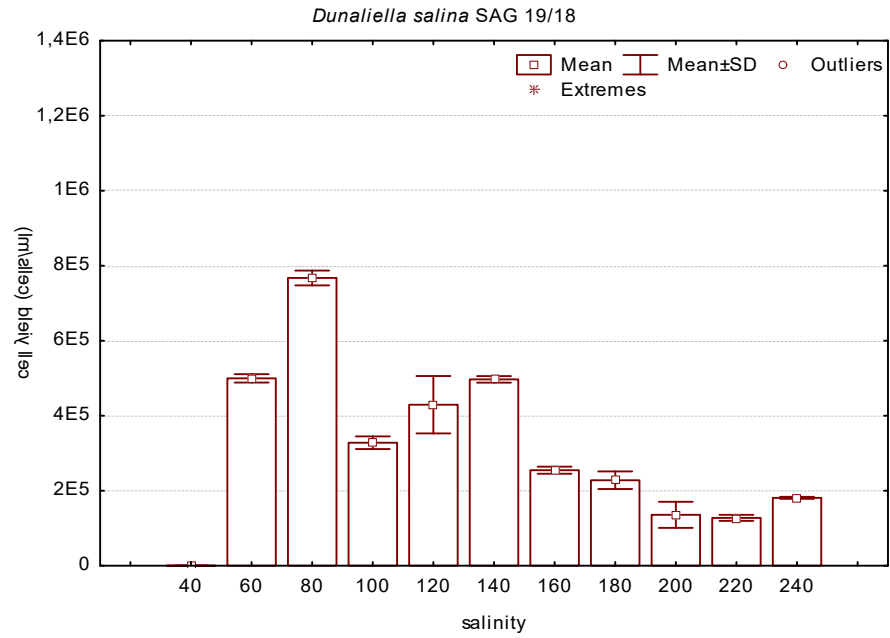
Πίνακας 16. Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την κυτταρική παραγωγή (cell yield, κύτταρα·mL⁻¹) στη διερευνητική σειρά πειραμάτων (αεριζόμενες καλλιέργειες 250mL).

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,02E+13	1	1,02E+13	2408,69	0
strain	1,05E+12	7	1,50E+11	35,27	0
salinity	2,59E+10	2	1,29E+10	3,046	0,056837
strain*salinity	1,18E+12	14	8,39E+10	19,745	0
Error	2,04E+11	48	4,25E+09		

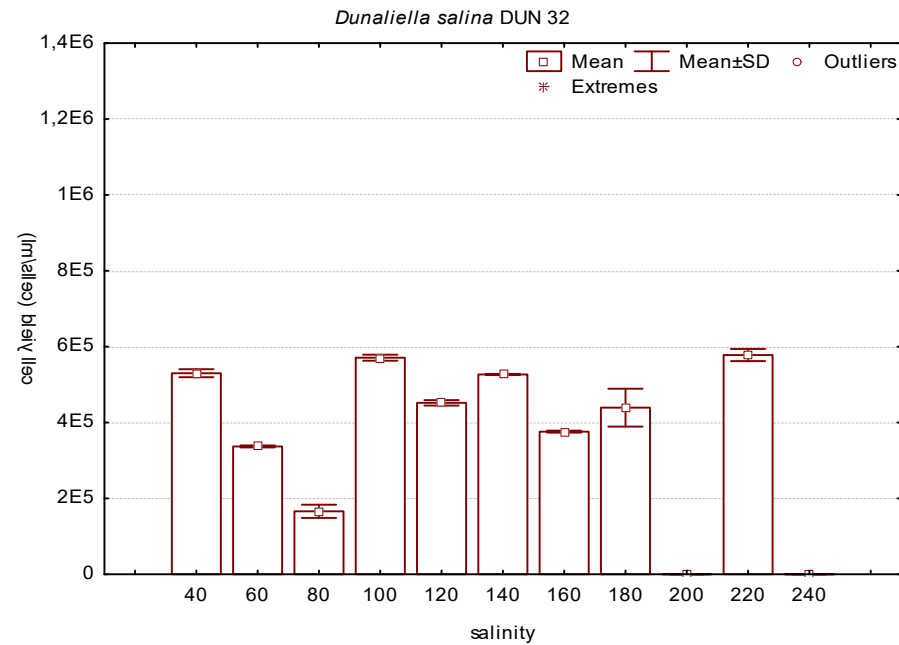
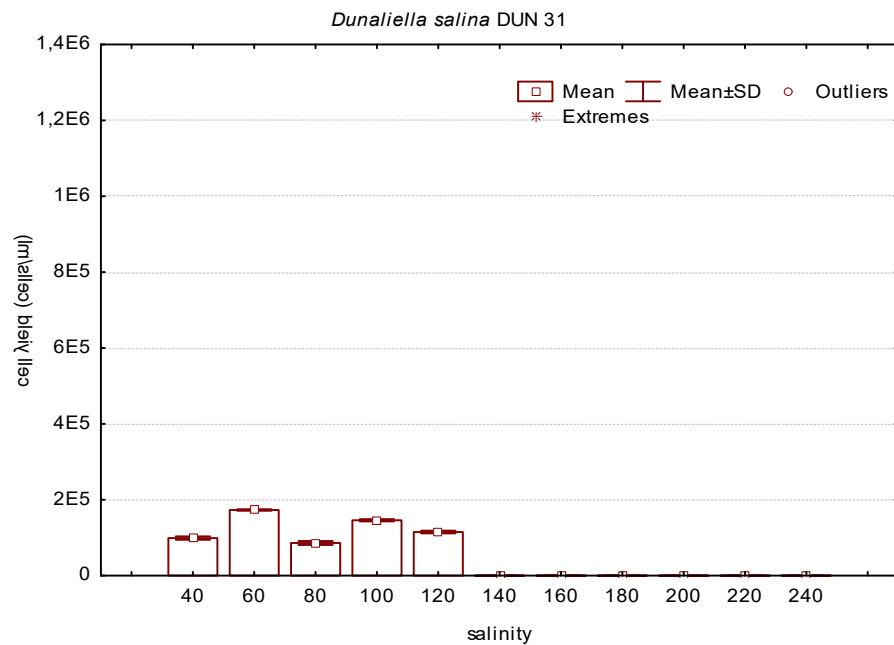
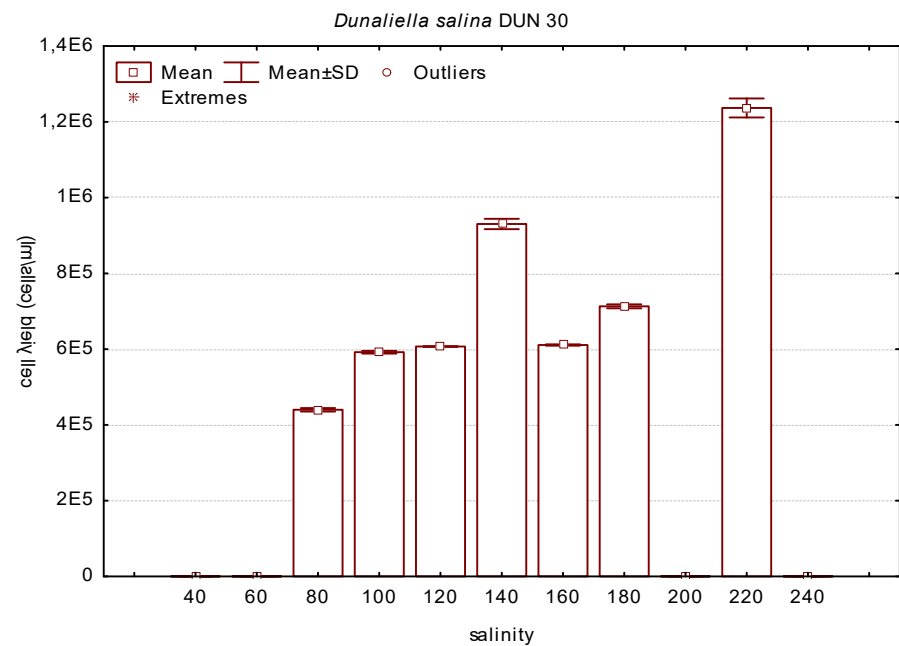
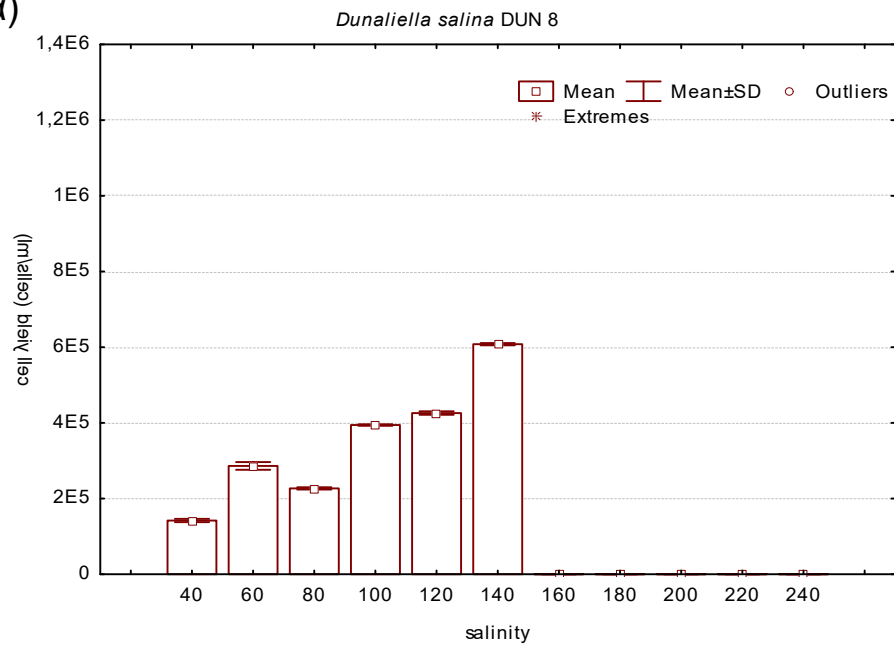
Έντονη γραφή: στατιστικά σημαντικές τιμές ($p < 0,05$)

(Λογισμικό εξαγωγής αποτελεσμάτων: TIBCO STATISTICA © TIBCO Software Inc.)

(α) Κυτταρική Παραγωγή (κυτταρική πυκνότητα)



(a)





Εικόνα 53. Κυτταρική παραγωγή (cell yield) καλλιέργειας για τη διερευνητική (screening) πειραματική σειρά (250 mL) για τα στελέχη *D. salina* CCAP 18/19 (μάρτυρας), AthU-AI Dun 2 (μορφότυπος 2), AthU-AI Dun 5 και Dun 6 (μορφότυπος 4), AthU-AI Dun 8 (μορφότυπος 3) και AthU-AI Dun 30, Dun 31 και Dun 32 (μορφότυπος 5).

(Λογισμικό εξαγωγής αποτελεσμάτων: TIBCO STATISTICA © TIBCO Software Inc.)

Στην Εικόνα 54 παρουσιάζεται το ξηρό βάρος των τελικών καλλιεργειών σε g ξηρής βιομάζας ανά L καλλιέργειας. Τα περισσότερα στελέχη κυμάνθηκαν σε χαμηλές τιμές (<0,1 g·L⁻¹) ενώ το στέλεχος μάρτυρας παρουσίασε μέγιστο 1,11 g·L⁻¹ σε αλατότητα 80%. Εξαίρεση αποτέλεσαν τα στελέχη AthU-AI Dun 30 και Dun 32 με μέγιστα 0,19 g·L⁻¹ και 0,43 g·L⁻¹ αντιστοίχως σε αλατότητα 220%. Η παραγωγή βιομάζας του στελέχους Dun 32 ήταν μακράν η μεγαλύτερη και ήταν το μόνο στέλεχος το οποίο κυμάνθηκε σε τιμές >0,1 g·L⁻¹ σε όλο το εύρος των αλατοτήτων όπου αναπτύχθηκε. Όπως αναμενόταν, η παραγωγή βιομάζας ήταν χαμηλή για όλα τα στελέχη σε αλατότητα 40% αφού στην αλατότητα αυτή τα κύτταρα δεν υφίστανται ουσιαστική ωσμωτική καταπόνηση και δεν χρειάζεται να παράγουν υψηλές ποσότητες μεταβολιτών (γλυκερόλη και β-καρωτένιο) ώστε να ανταπεξέλθουν.

Στον Πίνακα 17 παρουσιάζεται η αντίστοιχη ανάλυση διακύμανσης (ατομικός έλεγχος MANOVA) για την παράμετρο “βιομάζα σε ξηρό βάρος καλλιέργειας” (dry weight) όπου φαίνεται ότι η επίδραση των παραγόντων “στέλεχος” και “αλατότητα” καθώς και της αλληλεπίδρασης αυτών (στέλεχος*αλατότητα) είναι στατιστικά σημαντικές (p<0,05) για την παράμετρο αυτή.

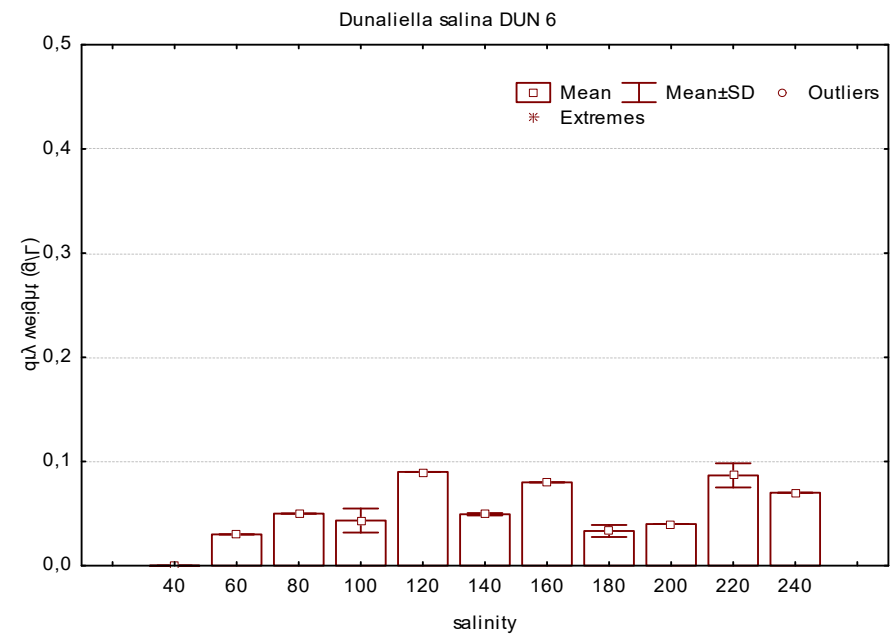
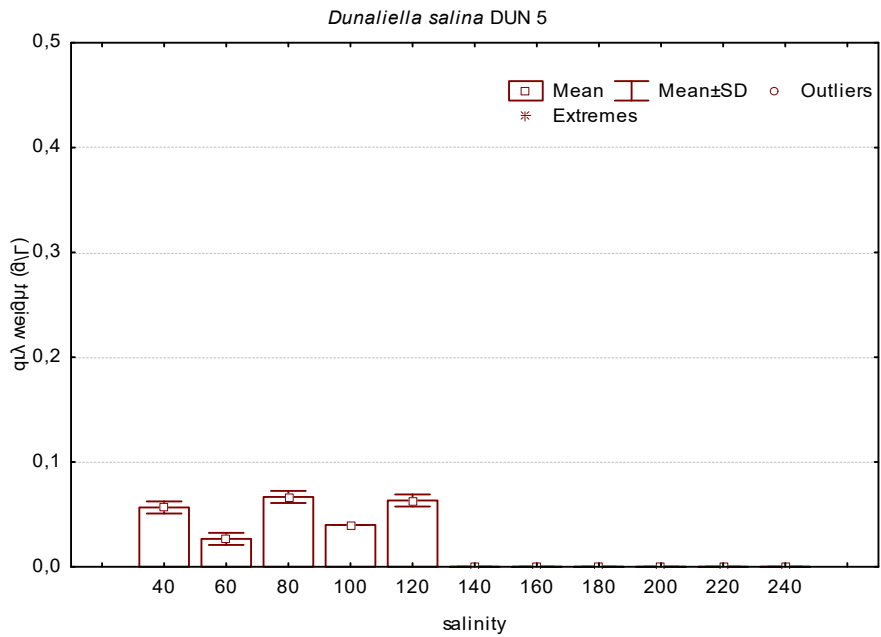
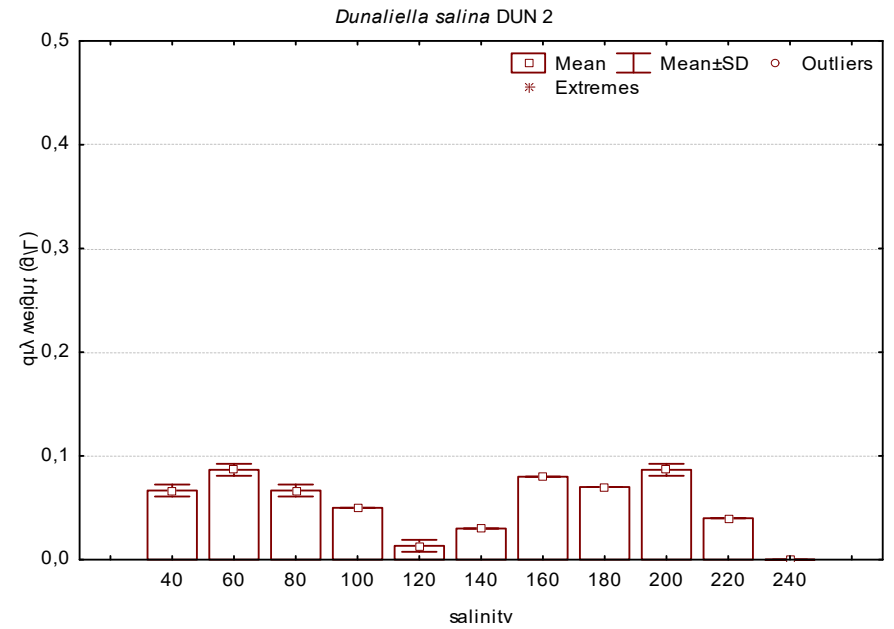
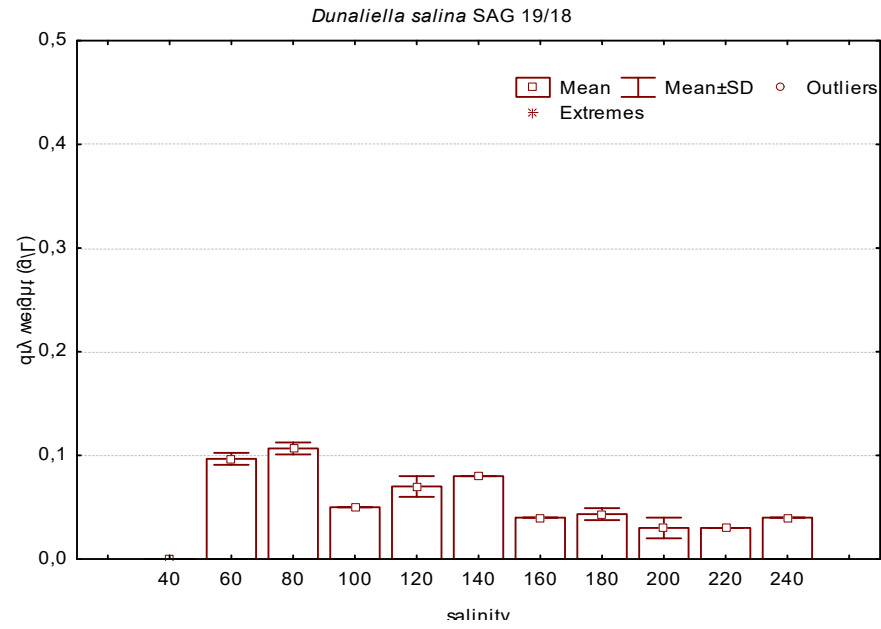
Πίνακας 17. Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για τη βιομάζα σε ξηρό βάρος (dry weight, g·mL⁻¹) στη διερευνητική σειρά πειραμάτων (αεριζόμενες καλλιέργειες 250mL).

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,670808	1	0,670808	6114,299	0
strain	0,417933	7	0,059705	544,199	0
salinity	0,011422	2	0,005711	52,057	0
strain*salinity	0,132911	14	0,009494	86,533	0
Error	0,005266	48	0,00011		

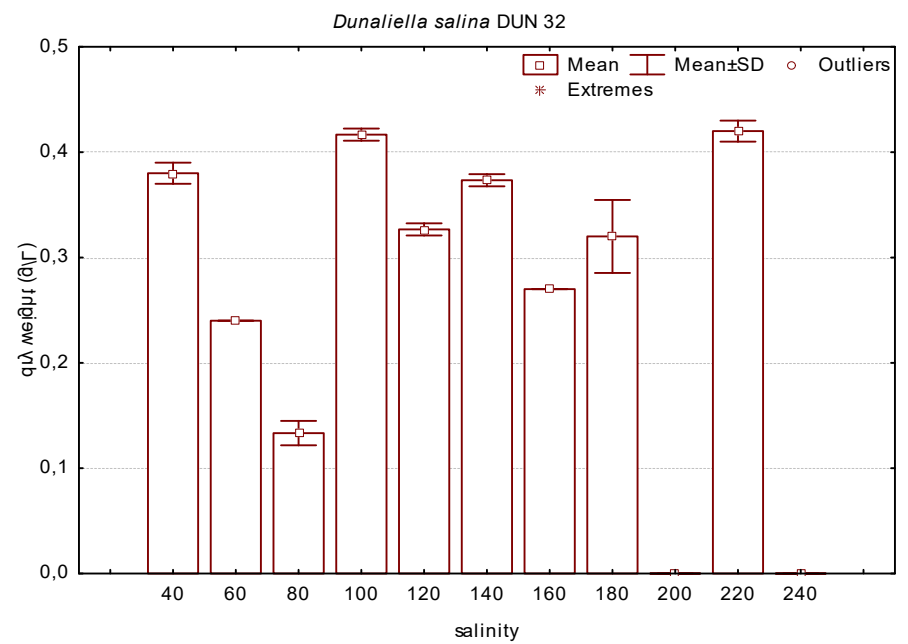
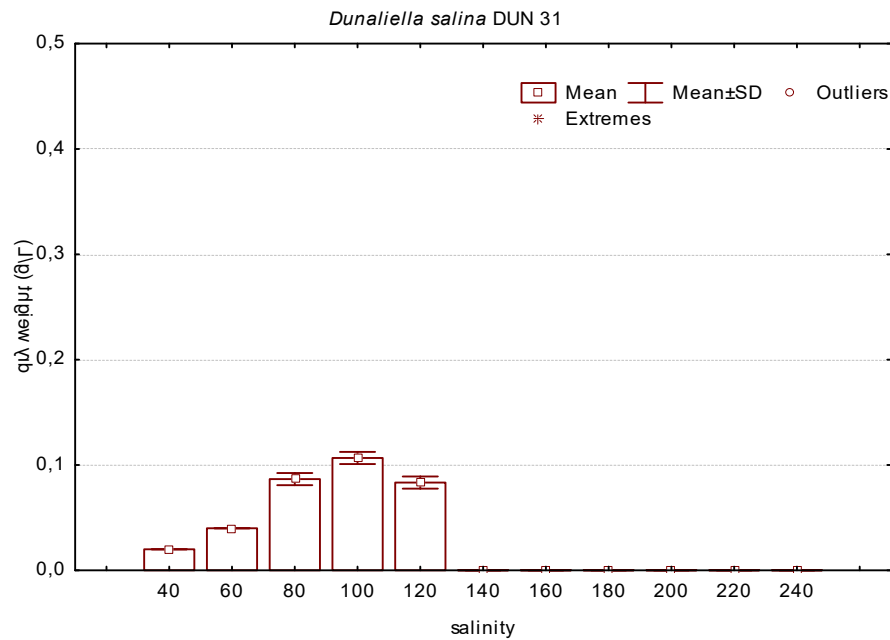
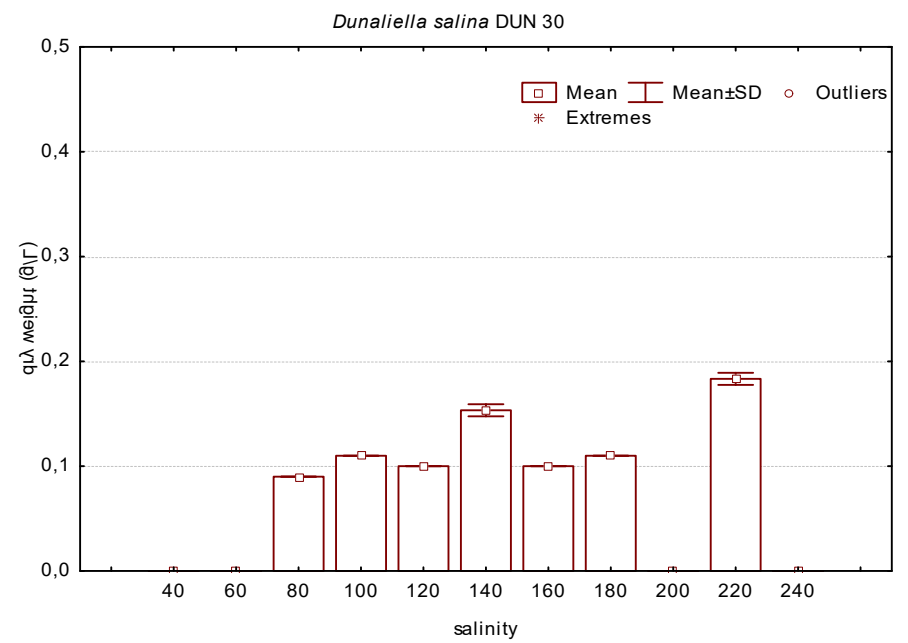
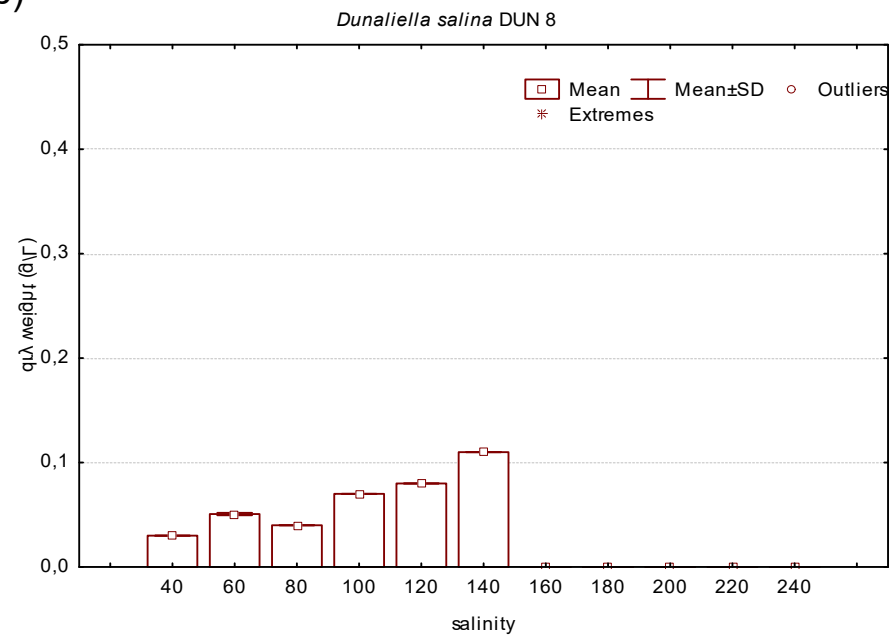
Έντονη γραφή: στατιστικά σημαντικές τιμές (p<0.05)

(Λογισμικό εξαγωγής αποτελεσμάτων: TIBCO STATISTICA © TIBCO Software Inc.)

(β) Ξηρό Βάρος (Βιομάζα)



(β)





Εικόνα 54. Βιομάζα σε ξηρό βάρος (dry weight) καλλιέργειας για τη διερευνητική (screening) πειραματική σειρά (250 mL) για τα στελέχη *D. salina* CCAP 18/19 (μάρτυρας), AthU-AI Dun 2 (μορφότυπος 2), AthU-AI Dun 5 και Dun 6 (μορφότυπος 4), AthU-AI Dun 8 (μορφότυπος 3) και AthU-AI Dun 30, Dun 31 και Dun 32 (μορφότυπος 5).

(Λογισμικό εξαγωγής αποτελεσμάτων: TIBCO STATISTICA © TIBCO Software Inc.)

Στην Εικόνα 55 παρουσιάζεται η περιεκτικότητα των κυττάρων σε μg β -καρωτενίου ανά κύτταρο, όπως μετρήθηκε στην τελική καλλιέργεια. Όλα τα στελέχη παρουσίασαν τιμές συγκρίσιμες με εκείνες του στελέχους αναφοράς με μέγιστες τιμές 13-16 $\mu\text{g}\cdot\text{κύτταρο}^{-1}$ σε χαμηλές προς μεσαίες αλατότητες. Συγκεκριμένα, το στέλεχος αναφοράς CCAP 19/18 εμφάνισε υψηλή περιεκτικότητα σε όλο το εύρος αλατοτήτων με μέγιστο 16,07 $\mu\text{g}\cdot\text{κύτταρο}^{-1}$ στο 100%. Το στέλεχος AthU-AI Dun 8 παρουσίασε μέγιστο 13,83 $\mu\text{g}\cdot\text{κύτταρο}^{-1}$ σε αλατότητα 40%, τιμή που ήταν μη αναμενόμενη δεδομένου ότι η αλατότητα αυτή είναι αρκετά χαμηλή και τα κύτταρα θεωρητικά δεν υφίστανται οσμωτική καταπόνηση. Το στέλεχος AthU-AI Dun, 5, Dun 6 και Dun 32 εμφάνισαν αντίστοιχες τιμές με μέγιστα 13,67 $\mu\text{g}\cdot\text{κύτταρο}^{-1}$ (80%), 13,07 $\mu\text{g}\cdot\text{κύτταρο}^{-1}$ (60%) και 13,88 $\mu\text{g}\cdot\text{κύτταρο}^{-1}$ (60%) αντιστοίχως. Το στέλεχος AthU-AI Dun 30 παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές με μέγιστο 12,98 $\mu\text{g}\cdot\text{κύτταρο}^{-1}$ σε αλατότητα 80%. Το στέλεχος Dun 2 διαφοροποιείται εμφανίζοντας σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις β -καρωτενίου στο εσωτερικό του κυττάρου με τιμές που φτάνουν τα 22,4 $\mu\text{g}\cdot\text{κύτταρο}^{-1}$ σε αλατότητα 140%. Ωστόσο το στέλεχος AthU-AI Dun 31 ήταν εκείνο που παρουσίασε τις υψηλότερες περιεκτικότητες εμφανίζοντας μέγιστο 35,2 $\mu\text{g}\cdot\text{κύτταρο}^{-1}$ σε αλατότητα 60%.

Στον Πίνακα 18 παρουσιάζεται η αντίστοιχη ανάλυση διακύμανσης (ατομικός έλεγχος MANOVA) για την παράμετρο “περιεκτικότητα κυττάρων σε β -καρωτένιο” (b-carotene content) όπου φαίνεται ότι η επίδραση των παραγόντων “στέλεχος” και “αλατότητα” καθώς και της αλληλεπίδρασης αυτών (στέλεχος*αλατότητα) είναι στατιστικά σημαντικές ($p < 0,05$) για την παράμετρο αυτή.

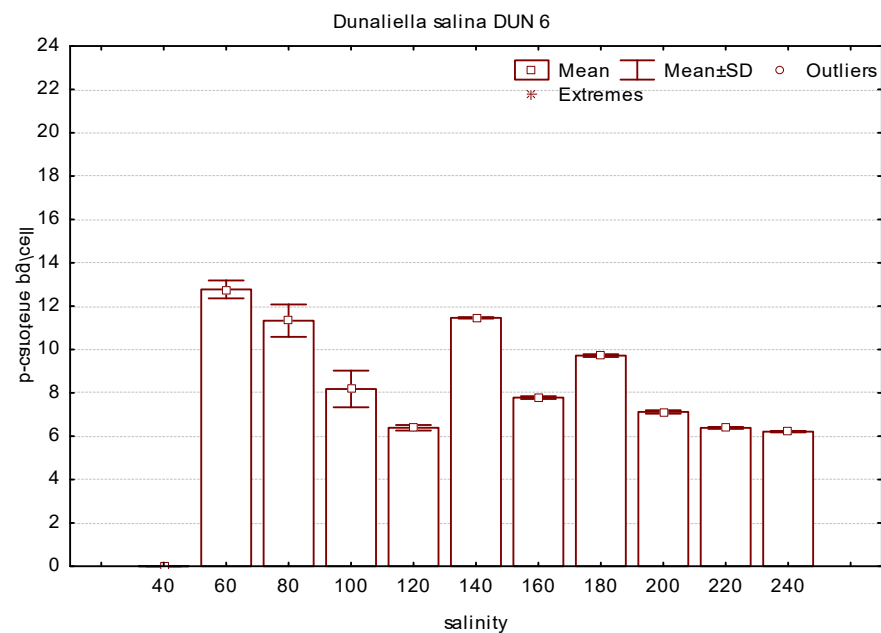
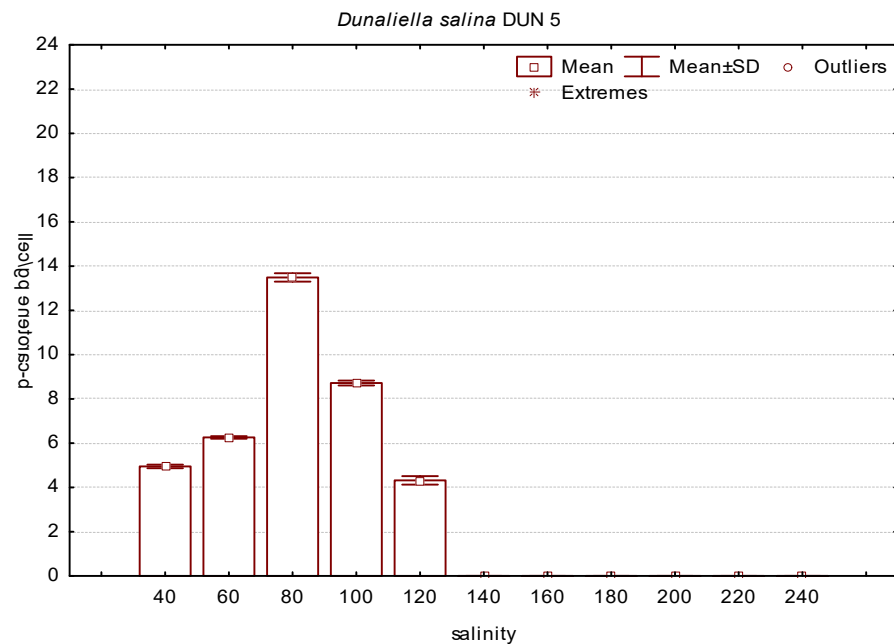
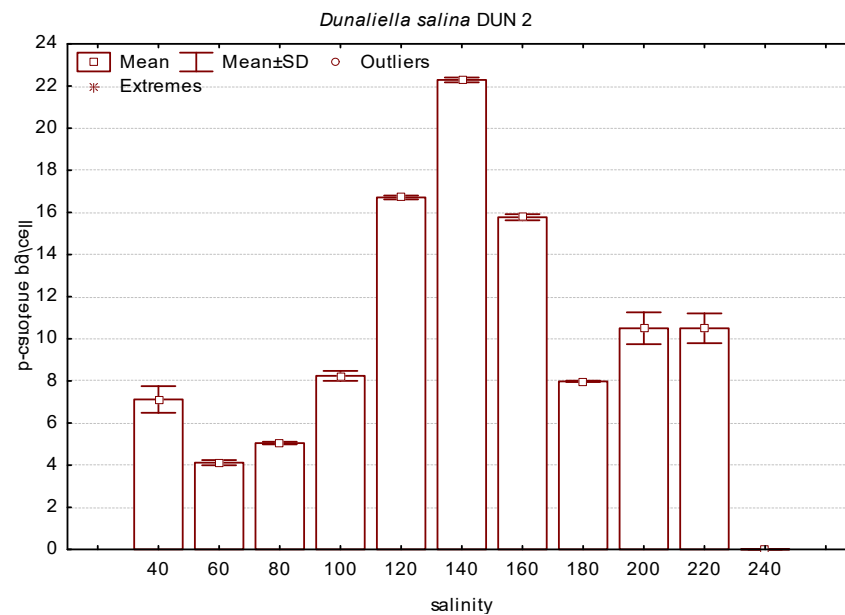
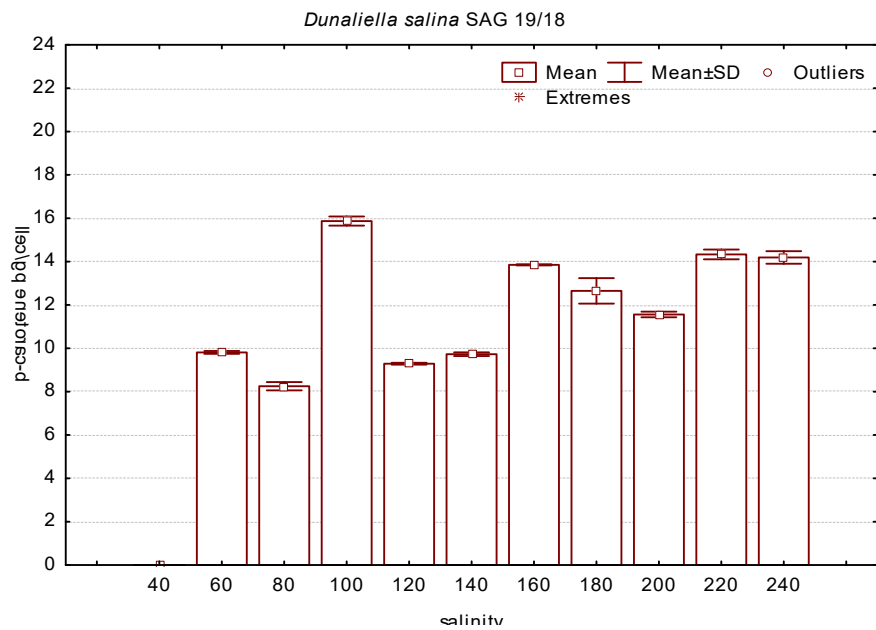
Πίνακας 18. Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την περιεκτικότητα κυττάρων σε β -καρωτένιο” ($\mu\text{g}\cdot\text{cell}^{-1}$) στη διερευνητική σειρά πειραμάτων (αεριζόμενες καλλιέργειες 250mL).

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	8035,513	1	8035,513	59030,81	0
strain	380,986	7	54,427	399,83	0
salinity	33,173	2	16,586	121,85	0
strain*salinity	684,941	14	48,924	359,41	0
Error	6,534	48	0,136		

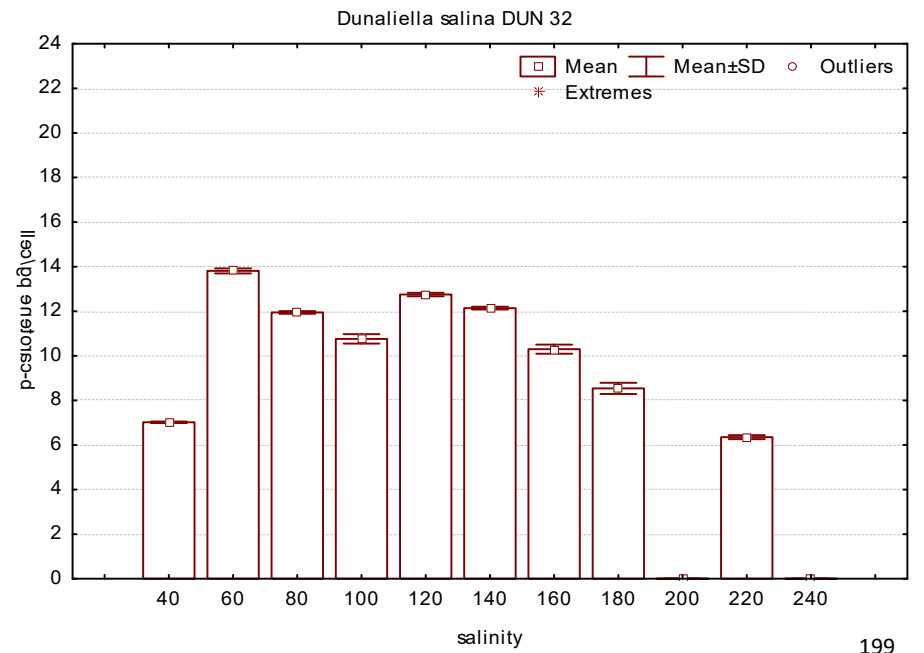
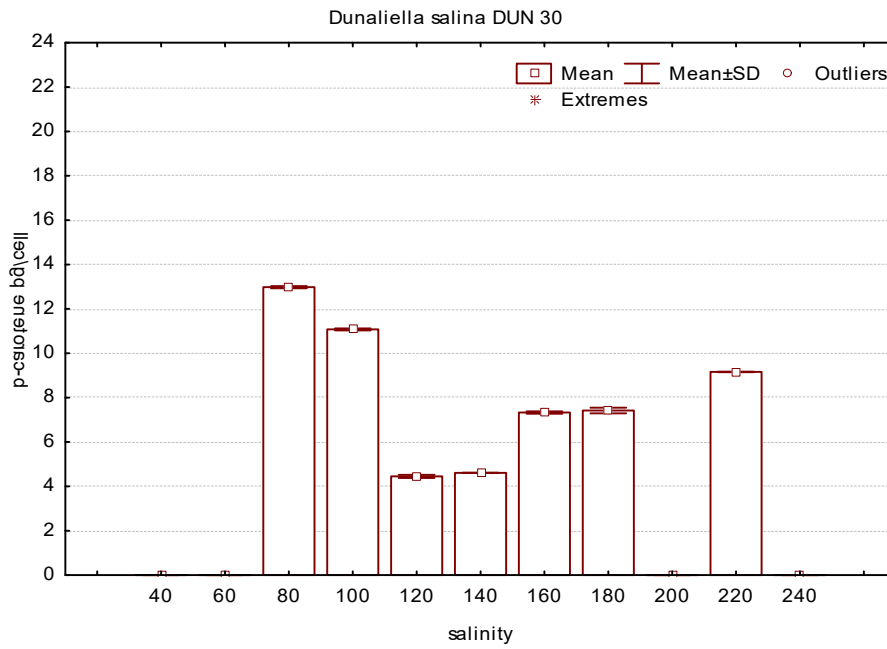
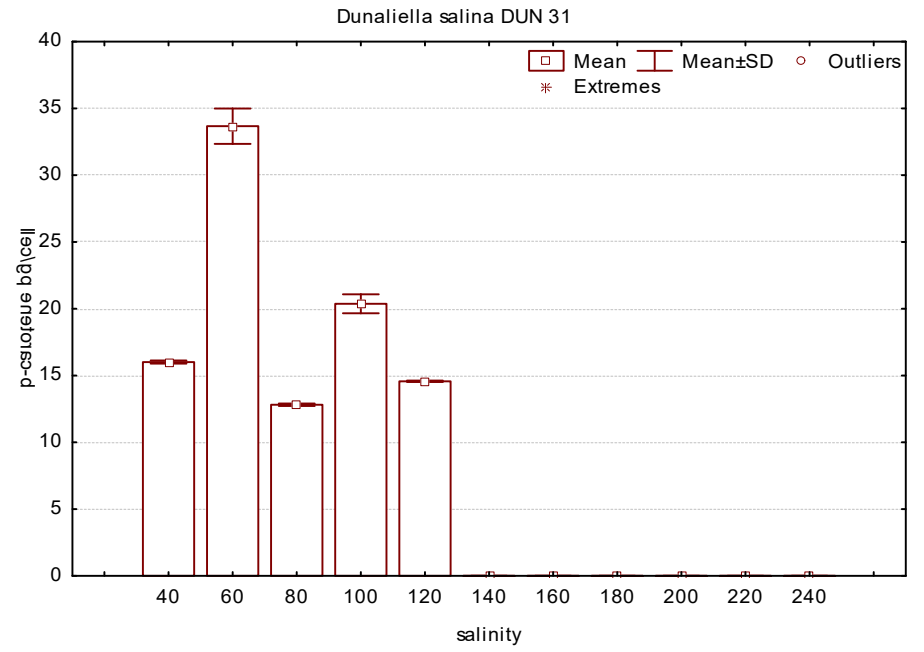
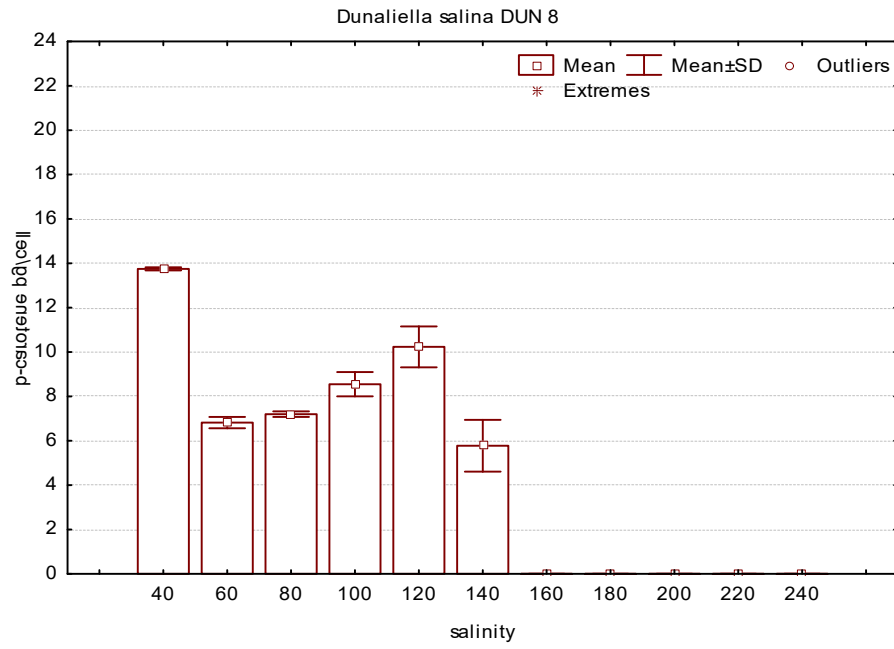
Έντονη γραφή: στατιστικά σημαντικές τιμές ($p < 0.05$)

(Λογισμικό εξαγωγής αποτελεσμάτων: TIBCO STATISTICA © TIBCO Software Inc.)

(γ) Περιεκτικότητα κυττάρων σε β-καρωτίνη



(Y)





Εικόνα 55. Περιεκτικότητα των κυττάρων σε β-καρωτένιο (b-carotene content) για τη διερευνητική (screening) πειραματική σειρά (250 mL) για τα στελέχη *D. salina* CCAP 18/19 (μάρτυρας), AthU-AI Dun 2 (μορφότυπος 2), AthU-AI Dun 5 και Dun 6 (μορφότυπος 4), AthU-AI Dun 8 (μορφότυπος 3), και AthU-AI Dun 30, Dun 31 και Dun 32 (μορφότυπος 5).

(Λογισμικό εξαγωγής αποτελεσμάτων: TIBCO STATISTICA © TIBCO Software Inc.)

Στην Εικόνα 56 παρουσιάζεται η ημερήσια παραγωγικότητα των καλλιεργειών σε β-καρωτένιο σε mg β-καρωτενίου ανά L καλλιέργειας ανά ημέρα. Παρατηρούμε ότι με εξαίρεση το στέλεχος AthU-AI Dun 8, όλα τα στελέχη παρουσίασαν υψηλές τιμές παραγωγικότητας ($>0,3 \text{ rg}\cdot\text{κύτταρο}^{-1}$), οι οποίες ήταν συγκρίσιμες με αυτές του στελέχους αναφοράς. Συγκεκριμένα, το στέλεχος αναφοράς CCAP 19/18 παρουσίασε μέγιστο $0,32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{ημέρα}^{-1}$ σε αλατότητα 80‰, εμφανίζοντας υψηλές τιμές σε ένα εύρος αλατοτήτων 60-140‰. Το στέλεχος AthU-AI Dun 8 ήταν εκείνο με τις χαμηλότερες παραγωγικότητες, έχοντας μέγιστο $0,22 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{ημέρα}^{-1}$ σε αλατότητα 120‰. Ακολούθησαν τα στελέχη AthU-AI Dun 6 και Dun 31 με μέγιστα $0,25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{ημέρα}^{-1}$ (140‰) και $0,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{ημέρα}^{-1}$ (60‰) αντιστοίχως. Τα στελέχη AthU-AI Dun 2, Dun 5 και Dun 32 εμφάνισαν μεγαλύτερες τιμές με μέγιστα $0,33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{ημέρα}^{-1}$ σε αλατότητες 160‰, 80‰ και 100‰ αντιστοίχως. Το στέλεχος AthU-AI Dun 30 εμφάνισε με διαφορά την υψηλότερη παραγωγικότητα β-καρωτενίου με μέγιστο $0,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{ημέρα}^{-1}$ σε αλατότητα 220‰.

Στον Πίνακα 19 παρουσιάζεται η αντίστοιχη ανάλυση διακύμανσης (ατομικός έλεγχος MANOVA) για την παράμετρο “ημερήσια παραγωγικότητα καλλιέργειας σε β-καρωτένιο” (b-carotene productivity) όπου φαίνεται ότι η επίδραση των παραγόντων “στέλεχος” και “αλατότητα” καθώς και της αλληλεπίδρασης αυτών (στέλεχος*αλατότητα) είναι στατιστικά σημαντικές ($p<0,05$) για την παράμετρο αυτή.

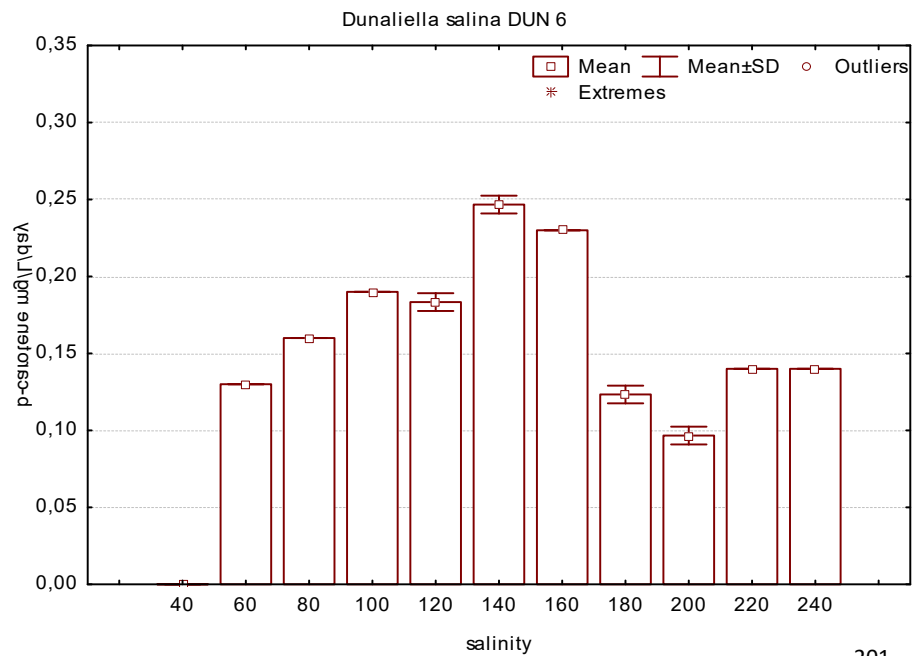
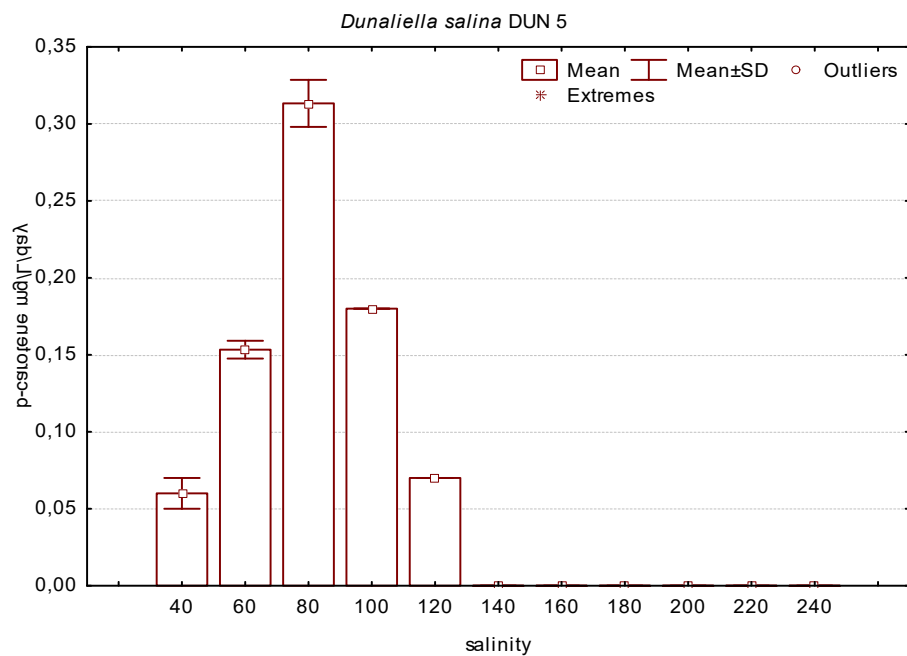
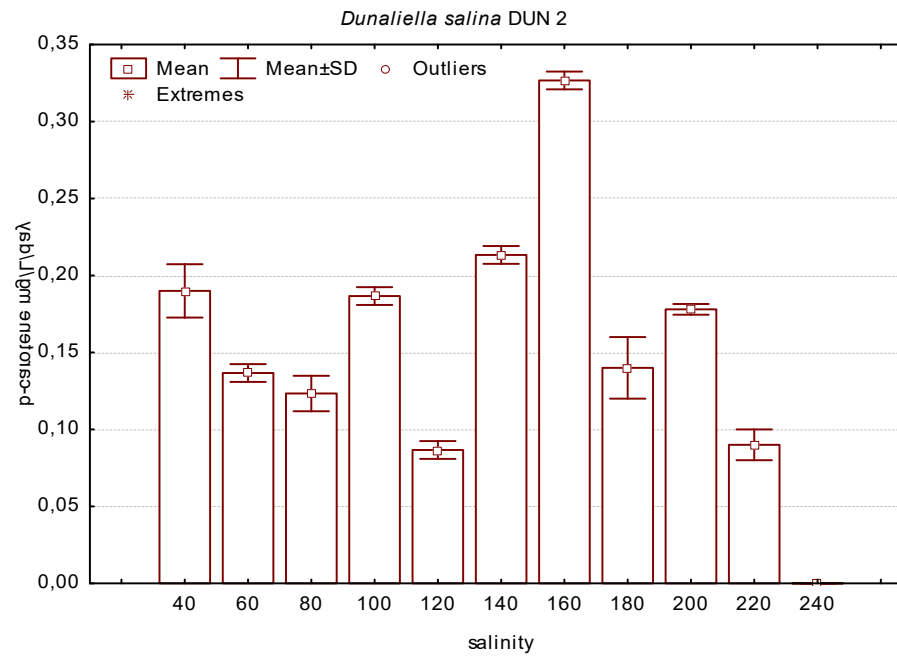
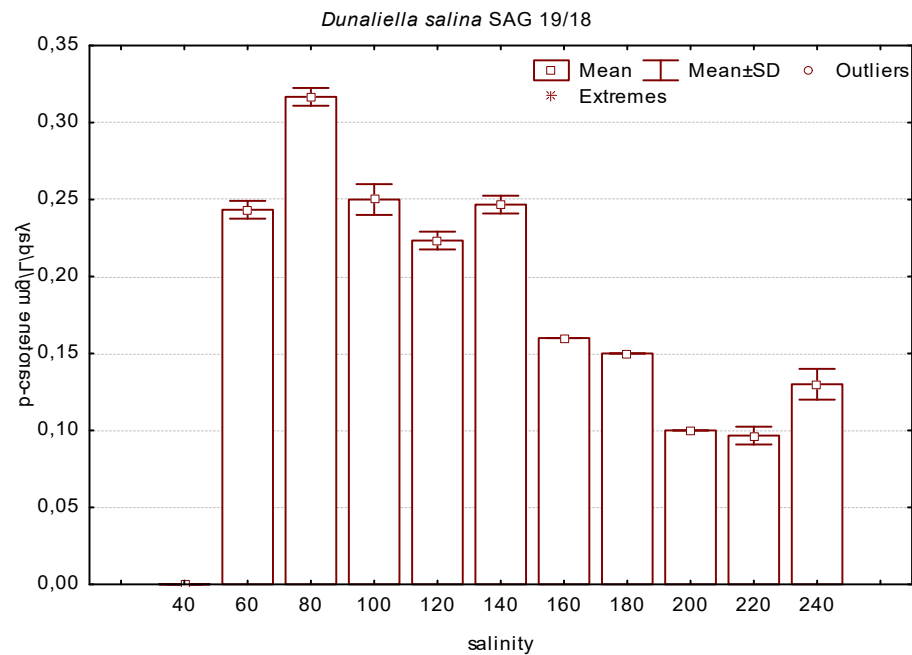
Πίνακας 19. Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την ημερήσια παραγωγικότητα καλλιέργειας σε β-καρωτένιο (b-carotene productivity) ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) στη διερευνητική σειρά πειραμάτων (αεριζόμενες καλλιέργειες 250mL).

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2,511298	1	2,511298	43966,41	0
strain	0,217476	7	0,031068	543,92	0
salinity	0,044508	2	0,022254	389,61	0
strain*salinity	0,255812	14	0,018272	319,9	0
Error	0,002742	48	0,000057		

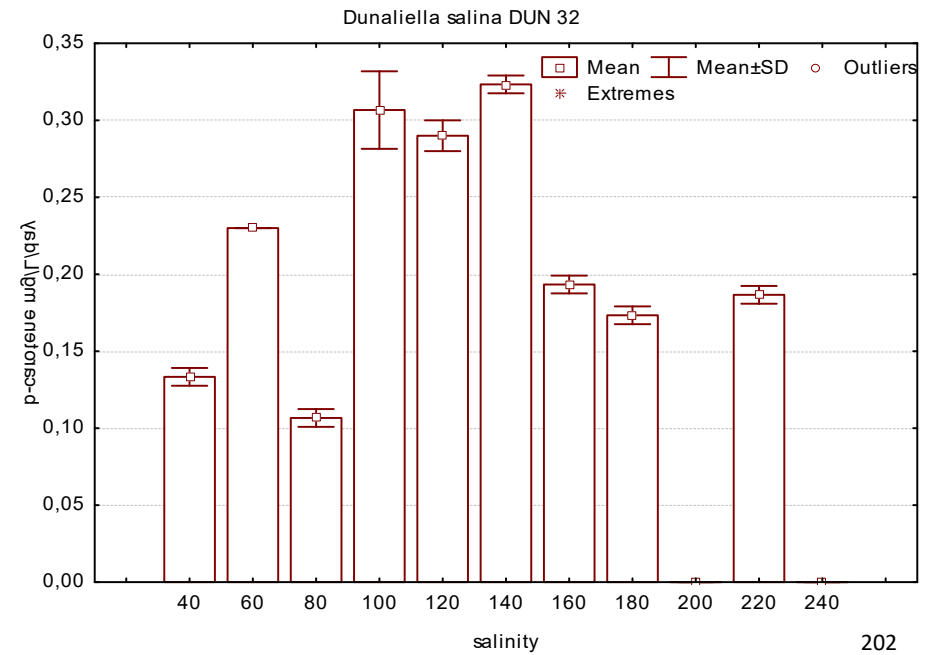
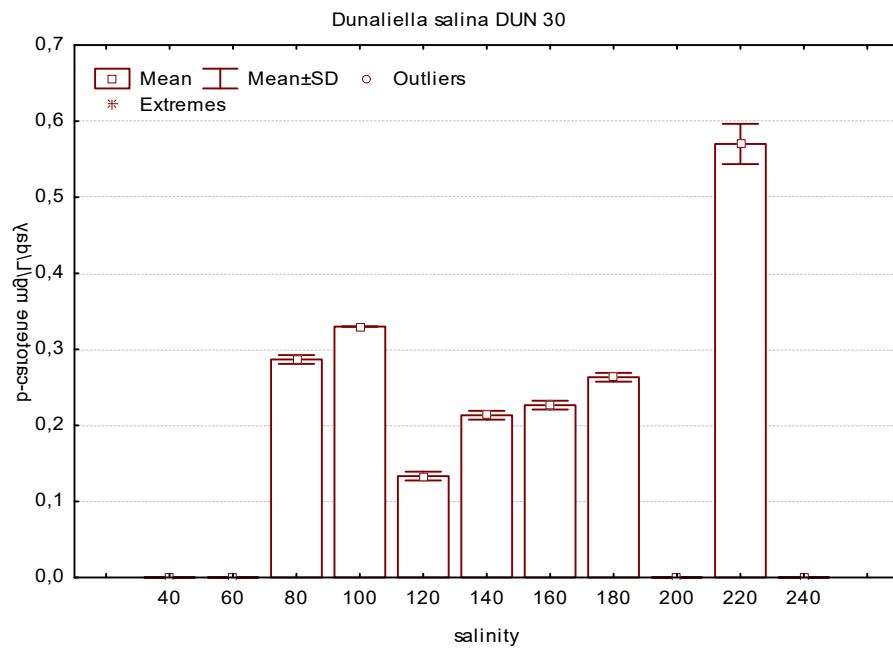
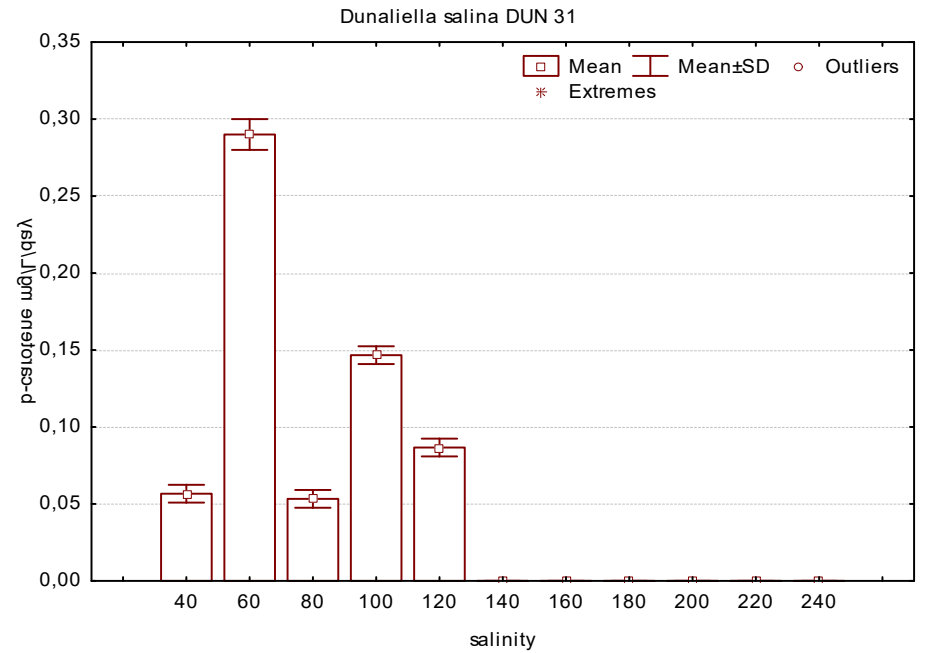
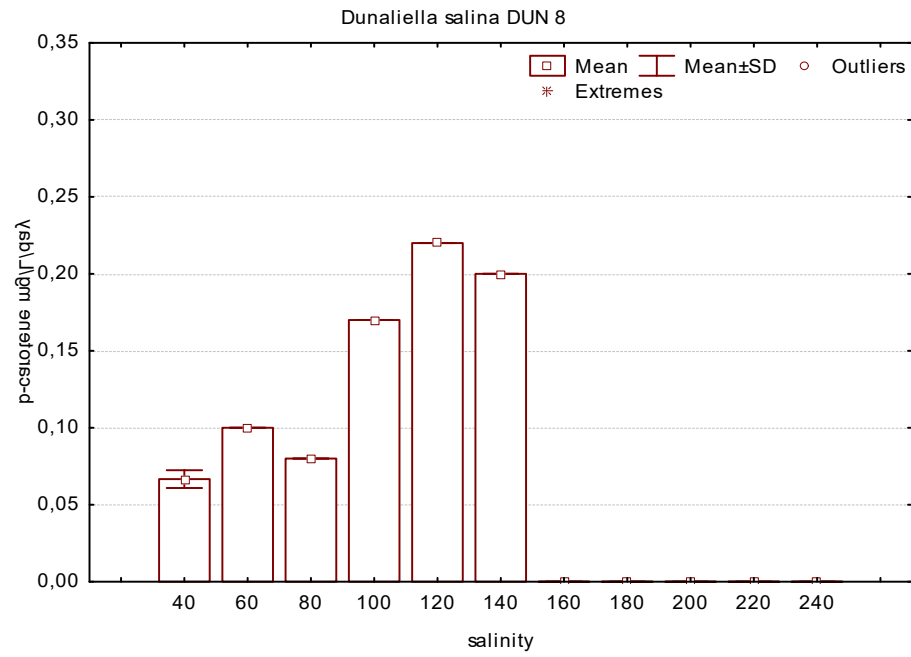
Έντονη γραφή: στατιστικά σημαντικές τιμές ($p<0,05$)

(Λογισμικό εξαγωγής αποτελεσμάτων: TIBCO STATISTICA © TIBCO Software Inc.)

(δ) Ημερήσια παραγωγικότητα καλλιέργειας σε β-καρωτένιο



(δ)





Εικόνα 56. Ημερήσια παραγωγικότητα καλλιέργειας σε β-καρωτένιο (b-carotene productivity) για τη διερευνητική (screening) πειραματική σειρά (250 mL) για τα στελέχη *D. salina* CCAP 18/19 (μάρτυρας), AthU-AI Dun 2 (μορφότυπος 2), AthU-AI Dun 5 και Dun 6 (μορφότυπος 4), AthU-AI Dun 8 (μορφότυπος 3) και AthU-AI Dun 30, Dun 31 και Dun 32 (μορφότυπος 5).
(Λογισμικό εξαγωγής αποτελεσμάτων: TIBCO STATISTICA © TIBCO Software Inc.)

Στον Πίνακα 20 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης MANOVA (Multivariate ANOVA) βάσει του κριτηρίου Wilks (λ), η οποία πραγματοποιήθηκε για όλα τα συμμετέχοντα σε αυτήν την πειραματική σειρά στελέχη, για τις τρεις συνθήκες αλατότητας όπου υπήρχε επικάλυψη για όλα τα στελέχη (δηλ. εκεί όπου επιβίωσαν όλα τα στελέχη). Οι αλατότητες αυτές ήταν οι 80‰, 100‰ και 120‰. Όπως παρατηρήθηκε και στους αντίστοιχους ατομικούς ελέγχους (Πίνακες 16-19), ο παράγοντας "στέλεχος" φαίνεται να έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στις μετρηθείσες παραμέτρους. Επιπλέον, φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων (στέλεχος*αλατότητα, $p < 0,05$), αλλά δεν εμφανίζεται κάποιο ιδιαίτερο πρότυπο ομαδοποίησης. Συνεπώς, η επίδραση της αλατότητας επί των παραμέτρων της καλλιέργειας του είδους *D. salina* δεν φαίνεται να εμφανίζει ένα συγκεκριμένο πρότυπο αλλά διαφέρει ανάλογα με το στέλεχος με έναν επί του παρόντος μη προβλέσιμο τρόπο. Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι εξ αιτίας της μειωμένης επιβίωσης των στελεχών υπήρχαν μόνο τρεις συνθήκες αλατότητας (από τις αρχικές έντεκα) με συγκρίσιμα αποτελέσματα, γεγονός που ενδεχομένως συνέβαλε σε υποεκτίμηση της επίδρασης του παράγοντα "αλατότητα". Τα αντίστοιχα αποτελέσματα του ελέγχου πραγματικής σημαντικότητας (Tukey-Test) παρατίθενται στο Παράρτημα 8.

Πίνακας 20. Πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης MANOVA βάσει των αποτελεσμάτων για τη διερευνητική σειρά πειραμάτων (αεριζόμενες καλλιέργειες 250mL) με τη χρήση του κριτηρίου Wilks (λ).

	Test	Value	F	Effect	Error	p
Intercept	Wilks	0,000451	24943,82	4	45	0
strain	Wilks	0	343,57	28	163,672	0
salinity	Wilks	0,004456	157,29	8	90	0
strain*salinity	Wilks	0,000001	120,28	56	177,2138	0

Έντονη γραφή: στατιστικά σημαντικές τιμές ($p < 0.05$)

(Λογισμικό εξαγωγής αποτελεσμάτων: TIBCO STATISTICA © TIBCO Software Inc.)

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ/ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1. ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Tetraselmis*

4.1.1. Ενδιαίτημα και Εξάπλωση

Το γένος *Tetraselmis* αντιπροσωπεύει ένα από τα πλέον ευέλικτα γένη, όσον αφορά στην ανοχή του στη μεταβλητότητα των περιβαλλοντικών συνθηκών. Αν και ως γένος εμφανίζει παγκόσμια κατανομή, οι καταγραφές του είδους *T. verrucosa* και της μορφής *T. verrucosa* f. *rubens* στη βιβλιογραφία είναι σχεδόν ανύπαρκτες. Οι μόνες πληροφορίες για την κατανομή της ταξινομικής αυτής μονάδας προέρχονται από τα στοιχεία που συνοδεύουν τις καλλιέργειες των απομονωμένων σε συλλογές στελεχών της. Σύμφωνα με τα στοιχεία αυτά, η μορφή έχει καταγραφεί σε θαλάσσια και υφάλμυρα ύδατα της Βρετανίας (Butcher 1959), της Αυστραλίας (Scandinavian Culture Collection of Algae and Protozoa, SCCAP, <http://www.sccap.dk/collection/>) της Κίνας (Culture Collection of Algae and Protozoa, CCAP <https://www.ccap.ac.uk>) και της Ιαπωνίας (Hori *et al.* 1983). Ωστόσο δεν υπάρχουν άλλα στοιχεία για την οικολογία της μορφής στη βιβλιογραφία. Τα απομονωμένα στελέχη *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* που παρουσιάζονται εδώ αποτελούν την πρώτη καταγεγραμμένη εμφάνιση της ταξινομικής αυτής μονάδας σε υδατικά οικοσυστήματα της Ελλάδας, ενισχύοντας την κατανόησή μας επί της εξάπλωσης αντιπροσώπων του γένους στο λιμνοθαλάσσιο φυτοπλαγκτόν.

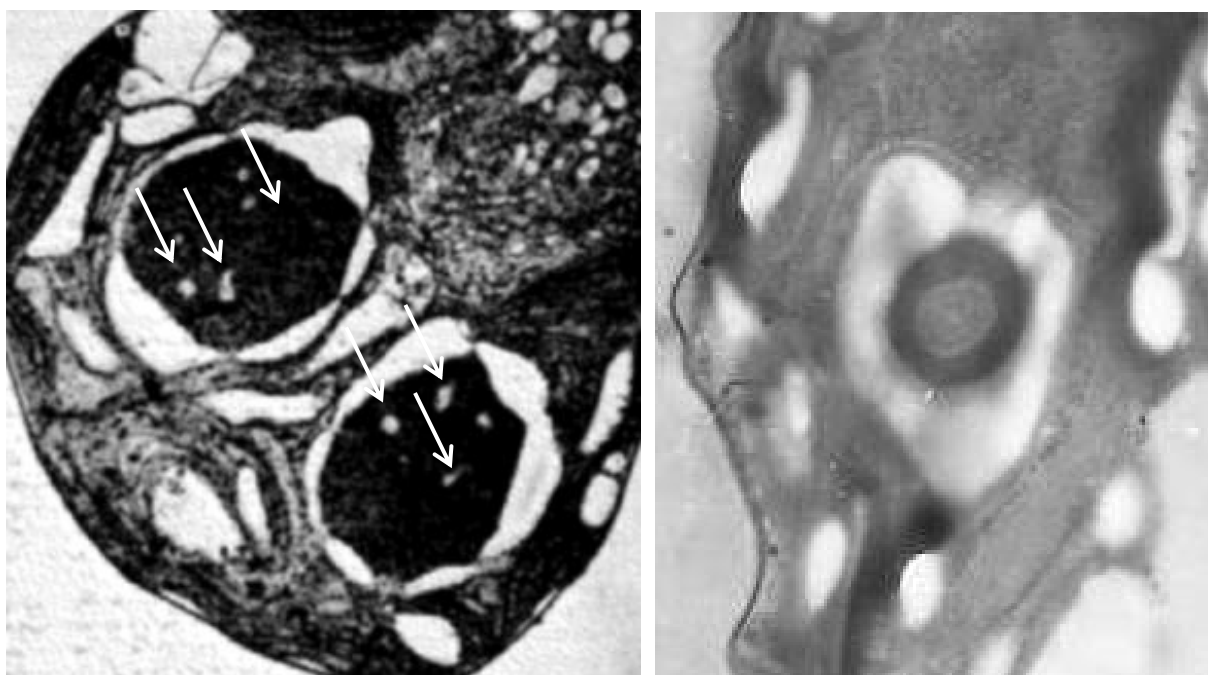
4.1.2. Μορφολογία

Όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν στην εργασία αυτή, με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου και ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης, διαπιστώθηκε ότι είναι πανομοιότυπα με το στέλεχος το οποίο ταυτοποιήθηκε ως *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* από τους Hori *et al.* (1983). Συγκεκριμένα, η δομή του πυρηνοειδούς των κυττάρων όλων των στελεχών είναι χαρακτηριστική για το υπο-γένος *Prasinocladia* Hori, Norris & Chihara (1983: 385), εμφανίζοντας μια ευμεγέθη και ευρεία κοιλότητα, η οποία εισέρχεται εντός της μήτρας του πυρηνοειδούς από την πλευρά του πυρήνα και εντός της οποίας υπάρχει ένας λοβός του πυρήνα (Hori *et al.* 1983) (Εικόνα 38c). Το γνώρισμα αυτό είχε χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τη διάκριση μεταξύ των γενών *Prasinocladus* (Cienkowski) Waern (1952:85) και *Platymonas* West (1916: 3) από τους Parke & Manton (1965), ωστόσο η ιδέα αυτή απορρίφθηκε από τους Chihara & Hori (1972), οι οποίοι τόνισαν ότι στα κύτταρα του γένους *Prasinocladus ascus* Proskauer (1950: 65) δεν εμφανίζεται πυρηνικός λοβός εντός της κοιλότητας του

πυρηνοειδούς (βλ. επίσης Norris *et al.* 1980). Εξ αιτίας της εγκόλπωσης του πυρηνικού υλικού εντός του πυρηνοειδούς, η μορφή του πυρηνοειδούς μπορεί να εμφανίζεται πεταλοειδής (σχήματος U) στο οπτικό μικροσκόπιο (Εικόνα 37). Το υπο-γένος *Prasinocladia* χαρακτηρίζεται επίσης από την παρουσία ενός θυλακοειδούς, το οποίο περιβάλλει το υλικό του πυρήνα και συνεχίζει στο εσωτερικό του χλωροπλάστη συνδεδεμένο με τα εκεί ελασμάτια (Εικόνα 38). Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα υπο-είδη του γένους, υπάρχουν ελάχιστες ή καθόλου τριχοειδείς απολήξεις στη θήκη, στο κατώτερο τμήμα της μαστιγιακής αύλακας (Εικόνα 38-39). Η δομή της μήτρας του πυρηνοειδούς είναι το καθοριστικό γνώρισμα που οδήγησε τον Parke (Parke & Dixon 1968) στη μεταφορά του είδους *T. verrucosa* Butcher (1959: 69) στο υπο-γένος *Prasinocladus*. Ωστόσο, οι Norris *et al.* (1980) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει ουσιαστική επαρκής διάκριση μεταξύ των γενών *Tetraselmis* και *Prasinocladus* και πρότειναν οι δύο ονομασίες να θεωρούνται συνώνυμες. Επιπροσθέτως, οι Hori *et al.* (1983) πρότειναν την ένταξη των ειδών που εμφανίζουν τα βασικά γνωρίσματα, τα οποία είχαν προηγουμένως θεωρηθεί χαρακτηριστικά για το γένος *Prasinocladus* (όπως η δομή της μήτρας του πυρηνοειδούς), στο υπο-γένος *Prasinocladia* του γένους *Tetraselmis*. Σύμφωνα με τους προαναφερθέντες συγγραφείς, η μεταφορά αυτή αφορά σε 3 είδη και συγκεκριμένα στα *T. marina* (Cienkowski) R.E. Norris, Hori & Chihara (1980: 337), *T. verrucosa* και *T. rubens* Butcher (1959: 69). Μετά από προσεκτική εξέταση, οι Hori *et al.* (1983) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα είδη *T. verrucosa* και *T. rubens* δεν εμφανίζουν καθοριστικές διαφορές σε εσωτερικά ή εξωτερικά γνωρίσματα, και ουσιαστικά είναι πανομοιότυπα. Ο μόνος τρόπος διάκρισης αυτών είναι ότι ο χρωματισμός των κυττάρων του *T. verrucosa* είναι πράσινος, ενώ εκείνος των κυττάρων του *T. rubens* είναι ερυθρός εξ αιτίας της εμφάνισης “αιματοχρώματος” (“haematochrome”, συσσώρευση ερυθρής/καστανέρυθρης χρωστικής στο εσωτερικό των κυττάρων, βλ. Goodwin 1952). Η κοκκιώδης εμφάνιση του οπίσθιου τμήματος του κυτταρικού σώματος, είχε περιγραφεί προηγουμένως από τον Butcher (1959). Ωστόσο η δομή αυτή δεν παρατηρήθηκε από τους Hori *et al.* (1983) όταν εξέτασαν την αυθεντική καλλιέργεια *T. verrucosa* (εκείνη που είχε απομονωθεί από τον Butcher), οδηγώντας τους συγγραφείς στο συμπέρασμα ότι τα δύο είδη θα πρέπει να θεωρούνται ως ταυτόσημο είδος με 2 διαφορετικές μορφές. Συνεπώς, τα πράσινα κύτταρα του είδους ανήκουν στη μορφή *T. verrucosa* f. *verrucosa*, ενώ τα ερυθρά (εξ αιτίας της συσσώρευσης αιματοχρώματος) στη μορφή *T. verrucosa* f. *rubens*.

Τα πέντε (5) στελέχη των Ελληνικών λιμνοθαλασσών που μελετήθηκαν εδώ, εμφανίζουν όλα τα βασικά μορφολογικά γνωρίσματα του είδους *T. verrucosa*, όπως

αυτό είχε περιγραφεί από τους Horii *et al.* (1983), καθώς και την κοκκιώδη υφή την οποία είχε περιγράψει ο Butcher (1959) για το είδος *T. verrucosa*, και η οποία αποδίδεται βάσει των παρατηρήσεών μας στη συσσώρευση αμυλοκόκκων στο στρώμα του χλωροπλάστη (Εικόνες 38 και 40). Επιπλέον τα στελέχη εμφάνισαν συσσώρευση αιματοχρώματος στο εσωτερικό των κυττάρων και οι καλλιέργειες εμφάνισαν μια ρόδινη, καστανέρυθη ή ροδόχροη απόχρωση, κάτι που συνάδει με την περιγραφή της μορφής *T. verrucosa* f. *rubens*. Η ταξινομική θέση του στελέχους AthU-AI Mes 5 ήταν αρχικά ασαφής, εξ αιτίας της εμφάνισης περισσότερων του ενός πυρηνοειδών εντός του χλωροπλάστη ορισμένων κυττάρων όταν αυτά φωτογραφήθηκαν με το σύστημα Nomarski σε οπτικό μικροσκόπιο (Εικόνα 42). Λαμβάνοντας επίσης υπ' όψιν τη συσσώρευση χρωστικής (αιματοχρώματος) στο εσωτερικό του κυττάρου, και το ενίοτε καρδιόσχημο σχήμα των κυττάρων, το στέλεχος παρουσίασε παρόμοια μορφολογία με το είδος *Tetraselmis wettsteinii* (J.Schiller) Throndsen (1988: 227). Το είδος αυτό επίσης εμφανίζει συσσώρευση κιτρινέρυθρων χρωστικών στο εσωτερικό του κυττάρου (Throndsen & Zingone 1988) και έχει καταγραφεί από την ευρύτερη περιοχή του Ιονίου πελάγους, συνεπώς η



Εικόνα 57. α) Φωτογραφία με ΗΜΔ κυττάρου του είδους *Tetraselmis wettsteinii*, όπου φαίνονται τα «πολλαπλά» πυρηνοειδή (δύο) στα οποία εισέρχονται μικροσκοπικοί δίαυλοι (canaliculi, βέλη) χαρακτηριστικό γνώρισμα των υπο-γενών *Tetraselmis* και *Parviselmis*. (τροποποιημένο από Throndsen & Zingone 1988)
 β) Φωτογραφία με ΗΜΔ κυττάρου του στελέχους AthU-AI Mes 5, το οποίο παρουσιάζει τη χαρακτηριστική για το υπο-γένος *Prasinocladia* (όπου ανήκει και το είδος *T. verrucosa*) αρχιτεκτονική του πυρηνοειδούς (μία μεγάλη κοιλότητα που περιέχει υλικό του πυρήνα, κεφαλή βέλους). (Φωτογραφία: Ξ. Χαντζηστρούντσιου, Χ. Κατσαρός)

εξάπλωσή του συνάδει με την περιοχή απομόνωσης του στελέχους (Λιμνοθάλασσα Μεσολογγίου, Ανατολικό Ιόνιο) (Throndsen & Zingone 1988, Zingone *et al.* 1990, Sarno *et al.* 1993, Caroppo *et al.* 2018). Ωστόσο, μετά από προσεκτική εξέταση της δομής του πυρηνοειδούς στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Εικόνα 57), το στελέχος AthU-AI Mes 5 εντάχθηκε επίσης στη μορφή *T. verrucosa* f. *rubens*. Στο στέλεχος παρατηρήθηκε μία κοιλότητα, η οποία περιέχει υλικό του πυρήνα και εισέρχεται εντός του πυρηνοειδούς, χαρακτηριστικό γνώρισμα του υπογένους *Prasinocladia*. Αντιθέτως, το είδος *T. wettsteinii* εμφανίζει πολλούς μικρότερους διαύλους εντός του πυρηνοειδούς (canaliculi), οι οποίοι χαρακτηρίζουν τα άλλα δύο υπογένη του γένους *Tetraselmis*. Η εμφάνιση των επιπλέον πυρηνοειδών στο οπτικό μικροσκόπιο θεωρήθηκε τεχνητό σφάλμα (artifact) της διαδικασίας φωτογράφησης, δεδομένου ότι εμφανίστηκε σε πολύ περιορισμένο αριθμό κυττάρων.

Παρατίθενται εδώ και ορισμένες επιπρόσθετες παρατηρήσεις σχετικά με την συμπεριφορά των μελετηθέντων στελεχών όσον αφορά στον χρωματισμό τόσο των κυττάρων όσο και των καλλιεργείων. Η πρώτη παρατήρηση αφορά στη μακροσκοπική εικόνα των καλλιεργείων. Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη διαφορετικής προέλευσης εμφάνισαν διαφορετικό χρωματισμό στις γηραιότερες καλλιέργειες. (Κεφάλαιο 3.4.2 Εικόνα 41). Μια πιθανή εξήγηση για τις διαφορές αυτές θα μπορούσε να είναι η διαφορετική κυτταρική πυκνότητα των καλλιεργείων, αλλά αυτό δεν ισχύει εν προκειμένω διότι οι καλλιέργειες είχαν παρόμοια κυτταρική πυκνότητα (Χαντζηστρούντσιου, αδημοσίευτα δεδομένα). Μία άλλη πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι η διαφορετική απόκριση των στελεχών σε ορισμένες συνθήκες εντός της καλλιέργειας. Είναι γνωστόν ότι τα μικροφύκη γενικότερα αλλά και το γένος *Tetraselmis* ειδικότερα, αποκρίνονται σε μεταβολές διαφόρων περιβαλλοντικών παραμέτρων προσαρμόζοντας τα μεταβολικά τους μονοπάτια και μεταβάλλοντας με τον τρόπο αυτό τη βιοχημική τους σύσταση (βλ. Molina *et al.* 1991, Nassiri *et al.* 1996, Wikfors *et al.*, 1996, Qin *et al.* 1999, Shun-Shan *et al.* 2003, Olsen *et al.* 2006, Borghini *et al.* 2009, Laws *et al.* 2011, Vieira & Guilhermino 2012, Stachowski-Haberkorn *et al.* 2013, Fon Sing & Borowitzka 2016, Pereira *et al.* 2016, Carneiro *et al.* 2019). Οι αποκρίσεις αυτές δύνανται να επιδρούν στις μεταβολικές οδούς οι οποίες σχετίζονται με την παραγωγή χρωστικών, και ιδιαίτερα των καρωτενοειδών, στα κύτταρα, ώστε να ανταπεξέρχονται σε συνθήκες καταπόνησης (Otero & Fabregas 1997, D'Souza & Kelly 2000, Xu *et al.* 2013, Sharma *et al.* 2014, Fon-Sing & Borowitzka 2016, Pereira *et al.* 2016, Tsai *et al.* 2016). Στελέχη του γένους *Tetraselmis* έχει δειχθεί ότι αποκρίνονται σε οξειδωτική καταπόνηση (oxidative stress) - η οποία προκαλείται από την παρουσία ελευθέρων ριζών οξυγόνου (reactive

oxygen species, ROS) - με την αυξημένη παραγωγή καρωτενοειδών και η απόκριση αυτή σχετίζεται με την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων (Goes *et al.* 1994, Sathasivam & Ki, 2019a,b). Αυτό ισχύει γενικότερα για την παραγωγή καρωτενοειδών από τους φυτικούς οργανισμούς, χωρίς όμως να έχουν διασαφηνιστεί πλήρως οι εμπλεκόμενοι γενετικοί και μοριακοί μηχανισμοί (Baroli & Niyogi 2000). Άλλωστε, όπως είναι γνωστόν, τα καρωτινοειδή εμφανίζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, η οποία είναι πολύ μεγάλης σημασίας για την προστασία των κυττάρων από οξειδωτική καταπόνηση (βλ. Krinsky 1989, Tracowell *et al.* 2001, Guedes *et al.* 2011, Goiris *et al.* 2012, Domonkos *et al.* 2013, Gong & Bassi 2016, Minhas *et al.* 2016, Zuluaga *et al.* 2017, Young & Lowe 2018). Οι συνθήκες καλλιέργειας για όλα τα στελέχη ήταν πανομοιότυπες, συνεπώς μια τέτοια εξήγηση φαίνεται αρκετά απίθανη. Ωστόσο, δεν θα μπορούσε να απορριφθεί πλήρως η πιθανότητα παραγωγής ROS στις γηρασμένες καλλιέργειες, εξ αιτίας της αυξημένης αναπνοής (σε συνδυασμό με την ελάττωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας της καλλιέργειας), της διάρρηξης των γηραιότερων κυττάρων και της διάσπασης των κυτταρικών συστατικών τους κατά τη φάση θανάτου της καλλιέργειας (Vonshak 1986, Kovarova-Kovar & Egli, 1998, Klausmeier *et al.* 2004, Andersen & Kawachi 2005, De Pinto *et al.* 2006, Ruiz-Martinez *et al.* 2010, Lee *et al.* 2015). Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου έχουν συσχετιστεί άμεσα με την απόκριση των φωτοσυνθετικών οργανισμών σε συνθήκες καταπόνησης (Baroli & Niyogi 2000, Perez-Perez *et al.* 2012). Συνεπώς, η αυξημένη παραγωγή των καρωτινοειδών στις γηρασμένες καλλιέργειες των μελετηθέντων στελεχών ως απόκριση σε οξειδωτική καταπόνηση είναι μια πιθανότητα που αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Στο γένος *Tetraselmis* έχει ανιχνευθεί η παραγωγή διαφόρων καρωτινοειδών όπως η λουτεΐνη, η νεοξανθίνη, η βιολαξανθίνη και το β-καρωτένιο (Egeland *et al.* 1995, Latasa *et al.* 2004, Tsai *et al.* 2016, Schüller *et al.* 2020). Σε ανάλυση του περιεχομένου των μελετηθέντων στελεχών με φασματοφωτομετρική μέθοδο (χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις των Parsons *et al.* 1984), ανιχνεύθηκε ποσότητα της χρωστικής χλωροφύλλης-c, η οποία δεν θα μπορούσε να αποδοθεί σε σφάλμα των μετρήσεων (Χαντζηστρούντσιου, αδημοσίευτα δεδομένα). Είναι γνωστόν, όμως, ότι η χρωστική αυτή δεν εμφανίζεται στα χλωροφύκη (green algae), ενώ υπάρχει στα διάτομα, δινωμαστιγινά και φαιοφύκη (brown algae) (Dougherty *et al.* 1970, Latasa *et al.* 2004). Ωστόσο, οι Garrido *et al.* (2009) ανέφεραν την παρουσία στο γένος *Tetraselmis*, της ξανθοφύλλης λοροξανθίνης (loroxanthin), η οποία είναι μια χρωστική που ομοιάζει στη δομή με τη χλωροφύλλη c (c-like) και φαίνεται να συντίθεται στα κύτταρα του γένους όταν αυτά εκτίθενται σε χαμηλές εντάσεις φωτεινής ακτινοβολίας.

Μάλιστα η αύξηση της ποσότητας της λοροξανθίνης στο κύτταρο φαίνεται να συνοδεύεται με αντίστοιχη μείωση της λουτεΐνης, η οποία παράγεται σε μεγάλες ποσότητες όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε υψηλές φωτεινές εντάσεις (Garrido *et al.* 2009). Βάσει της παρατήρησης αυτής, ενδέχεται το λανθασμένο θετικό αποτέλεσμα (false positive) για χλωροφύλλη c στα μελετηθέντα στελέχη, να οφείλεται σε αυτήν τη χρωστική (Χαντζηστρούντσιου, 2011) ή σε κάποιο άλλο αντίστοιχο μόριο, το οποίο παράγεται όταν η καλλιέργεια παραμένει σε στατική φάση οπότε η σκίαση των κυττάρων (λόγω αυξημένης πυκνότητας) δεν ευνοεί την παραγωγή λουτεΐνης. Πάντως, ο πιθανός ρόλος της λοροξανθίνης στη φωτοσύνθεση δεν έχει ακόμη διασαφηνιστεί (Sansone *et al.* 2017).

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι στις καλλιέργειες των μελετηθέντων στελεχών παρατηρήθηκε ένα ακόμη ενδιαφέρον στοιχείο. Αν και το αιματόχρωμα συσσωρεύεται εντός των κυττάρων στα μεσαία στάδια της αύξησης της καλλιέργειας, σε μεταγενέστερο στάδιο, όπου η καλλιέργεια έχει πλέον τον ερυθρό χρωματισμό, η χρωστική αυτή φαίνεται να απελευθερώνεται με κάποιον τρόπο στο θρεπτικό μέσον της καλλιέργειας. Στην Εικόνα 41στ φαίνεται το διήθημα μιας νεαρής (πράσινης) και μιας γηραιότερης (ερυθρόχροης) καλλιέργειας, ενδεικτικά για το στέλεχος AthU-AI V 2-2. Το στερεό τμήμα της καλλιέργειας, δηλ. τα κύτταρα, τα οποία παρέμειναν στον ηθμό, είχαν πράσινο χρώμα και στις δύο περιπτώσεις. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι ο μεταβολίτης ο οποίος δίνει τον χρωματισμό αυτό στην καλλιέργεια, ενδεχομένως εκκρίνεται στο θρεπτικό μέσον σε κάποια από τις τελευταίες φάσεις ανάπτυξης της καλλιέργειας. Το κατά πόσον πρόκειται για το αιματόχρωμα που συσσωρεύεται στο εσωτερικό του κυττάρου ή για κάποιον άλλο μεταβολίτη, παραμένει ασαφές. Η συσσώρευση αιματοχρώματος στο εσωτερικό των κυττάρων έχει μελετηθεί εκτενώς για το είδος *Haematococcus pluvialis*, στο οποίο έχει δειχθεί ότι η συσσωρευόμενη χρωστική είναι κυρίως η ασταξανθίνη, και αυτό συνήθως συμβαίνει σε συνθήκες αυξημένης φωτεινής έντασης και αλατότητας αλλά και έλλειψης αζώτου (Goodwin *et al.* 1953, Droop 1954, Boussiba & Vonshak 1991, Orosa *et al.* 2005). Η χρωστική αυτή εμφανίζεται σε μικρές ποσότητες στο γένος *Tetraselmis*, όπου το πιο σύνηθες καρωτενοειδές είναι η λουτεΐνη (Egeland *et al.* 1995, Latasa *et al.* 2004, Binti Ibnu Rasid *et al.* 2014, Ahmed *et al.* 2015). Η παντελής έλλειψη στοιχείων για τη βιοχημεία και τον μεταβολισμό των καρωτενοειδών και των χρωστικών γενικότερα στη μορφή *T. verrucosa f. rubens*, για την οποία μάλιστα ο χρωματισμός της καλλιέργειας αποτελεί διαγνωστικό ταξινομικό γνώρισμα, ανοίγει μια πολύ ενδιαφέρουσα ερευνητική προοπτική. Ένα επιπρόσθετο κίνητρο προς αυτήν την κατεύθυνση είναι το έντονο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον για τη διερεύνηση των καρωτενοειδών των μικροφυκών,

την αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα, καθώς και τη δυνατότητα βιομηχανικής τους χρήσης (πρβ. Prasanna *et al.* 2007, Christaki *et al.* 2013, Ibañez & Cifuentes 2013, Sansone *et al.* 2017, Sathasivam & Ki 2018).

Τέλος, μία ακόμη ενδιαφέρουσα παρατήρηση σχετίζεται με τον χρωματισμό των καλλιεργειών των δύο στελεχών του Μεσολογγίου, AhtU-AI Mes 5 και Mes 17. Τα στελέχη αυτά απομονώθηκαν από την περιοχή των αλυκών Μεσολογγίου ((βλ. Πίνακα 1) και μάλιστα από τα σημεία κρυστάλλωσης του άλατος (“τηγάνια”). Συνεπώς, τα στελέχη αυτά προήλθαν από ένα σαφώς υπεράλμυρο περιβάλλον (~140‰ στο αρχικό δείγμα). Αρχικά καλλιεργήθηκαν σε υψηλή αλατότητα, αλλά στη συνέχεια εγκλιματίστηκαν σε χαμηλότερες τιμές και για αρκετό διάστημα είχαν καλλιεργηθεί σε αλατότητα 60‰, χωρίς να εμφανίσουν τον ερυθρό χρωματισμό στις γηραιότερες καλλιέργειες. Ωστόσο, μόνον όταν καλλιεργήθηκαν -μετά από εγκλιματισμό- σε αλατότητα 40‰, οι καλλιέργειες σε μεταγενέστερα στάδια ανάπτυξης άρχισαν να εμφανίζουν τον χαρακτηριστικό ερυθρό χρωματισμό (Εικόνα 41δ-ε). Αυτό ενδεχομένως υποδεικνύει ότι υπάρχει κάποιο περιβαλλοντικό ερέθισμα, το οποίο πυροδοτεί τη συσσώρευση αιματοχρώματος στα κύτταρα των στελεχών πιθανώς ως μια απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης. Ενδεχομένως για το στέλεχος αυτό, η θαλασσινή αλατότητα (40‰) θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μη ευνοϊκή συνθήκη, δηλ. πολύ χαμηλή, για ένα υπεράλμυρο στέλεχος προσαρμοσμένο σε αλατότητες >140‰ στο φυσικό του περιβάλλον. Ταυτοχρόνως, η παρατήρηση αυτή ενδέχεται να αποτελεί μια ένδειξη ότι α) το φυσικό περιβάλλον προέλευσης συνεχίζει να διαδραματίζει κάποιον ρόλο στις βιοχημικές αποκρίσεις των στελεχών, ακόμη και αν αυτά έχουν καλλιεργηθεί στο εργαστήριο για χιλιάδες γενεές (13 έτη για τα μελετηθέντα στελέχη), και β) η απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης η οποία υπαγορεύεται ως επί το πλείστον από τον γονότυπο, μπορεί να εκδηλώνεται με διαφορετικό τρόπο σε εργαστηριακούς από ό,τι στους φυσικούς πληθυσμούς (βλ. Lakeman *et al.* 2009).

4.1.3. Μοριακή Φυλογένεση

Η μορφολογική ομοιότητα που παρατηρήθηκε μεταξύ όλων των μελετηθέντων στελεχών με τη μορφή *T. verrucosa* f. *rubens* επιβεβαιώνεται μέσω της φυλογενετικής ανάλυσης. Τα μελετηθέντα στελέχη σχηματίζουν μία μονοφυλετική ομάδα, στην οποία συμπεριλαμβάνεται και το στέλεχος *T. verrucosa* f. *rubens* (Tetr_66_6 ή CCMP 66/6). Το φυλογενετικό δένδρο που παρουσιάζεται εδώ (Εικόνα 43) δεν έχει πλήρως επιλυθεί επί του παρόντος, αλλά υποστηρίζει σθεναρά την τοποθέτηση των

μελετηθέντων στελεχών εντός της μονοφυλετικής αυτής ομάδας, η οποία περιλαμβάνει και το τυπικό στέλεχος *T. verrucosa* f. *rubens*. Η πλήρης επίλυση του δέντρου απαιτεί επιπρόσθετα δεδομένα αλληλουχιών για όλα τα εμπλεκόμενα είδη και αυτό υπερβαίνει τους στόχους της Διατριβής. Τα δεδομένα μοριακής απόκλισης παρέχουν μια επιπλέον ένδειξη που υποστηρίζει την ταξινομική ταυτοποίηση των στελεχών βάσει μορφολογίας, και την ένταξή τους στη κλάση Chlorodendrophyceae, όπως είχε προταθεί από τους Massjuk & Lilitska (2006). Το εύρος των μέσων αποστάσεων των ζευγών βάσεων (γενετικές αποστάσεις) για αμφότερα τα γονίδια α) ανάμεσα σε διακριτά και σαφώς καθορισμένα είδη μικροφυκών, β) ανάμεσα στα μελετηθέντα στελέχη και το στέλεχος CCAP 66/6, και γ) ανάμεσα στην “ομάδα” *T. verrucosa* f. *rubens* και τα υπόλοιπα στελέχη του γένους *Tetraselmis*, είναι τέτοιο ώστε να επιβεβαιώνεται οριστικά η θέση των στελεχών εντός του είδους *T. verrucosa* διαχωρίζοντας αυτά από τις υπόλοιπες μορφολογικώς παρόμοιες ταξινομικές μονάδες. Τα δεδομένα αυτά διασαφηνίζουν οριστικά την ταξινομική θέση του στελέχους AthU-AI Mes 5.

Στο φυλογενετικό δέντρο της Εικόνας 43, τα μελετηθέντα στελέχη σχηματίζουν έναν ισχυρά υποστηριζόμενο κλάδο μαζί με τους υπόλοιπους αντιπροσώπους του γένους *Tetraselmis*, ο οποίος είναι αδελφικός κλάδος (sister clade) με εκείνον στον οποίο ανήκει η πλησιέστερη συγγενικά ταξινομική μονάδα του γένους, το γένος *Scherffelia*. Αν και το δέντρο που προέκυψε από την ανάλυση αυτή εμφανίζει ισχυρή υποστήριξη σε ορισμένους μεμονωμένους κλάδους, δεν έχει επαρκώς επιλυθεί, παρά το γεγονός ότι πρόκειται για ανάλυση δύο γονιδίων. Πέραν της επιβεβαίωσης της ταξινομικής θέσης των μελετηθέντων στελεχών, φαίνεται ότι υπάρχουν αρκετά αμφιλεγόμενα αποτελέσματα σε σχέση με τις μέχρι τώρα παρατηρήσεις που αφορούν στην τοπολογία του κλάδου των πρασινοφυκών (Leliaert *et al.* 2012, 2014). Ωστόσο, η θέση του κλάδου δεν υποστηρίζεται ισχυρά (τιμή bootstrap 0.89), υποδεικνύοντας ότι είναι απαραίτητη η αναζήτηση περισσότερων δεδομένων ώστε να επιτευχθεί μια ισχυρότερη τοπολογία. Ακόμη ένα ενδιαφέρον ζήτημα είναι η μονοφυλετικότητα των κλάσεων Trebouxiophyceae και Ulvophyceae καθώς και του κλάδου UTC συνολικά, η οποία έχει αμφισβητηθεί στο παρελθόν (Ruhfel *et al.* 2014, Fučíková *et al.* 2014a). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, αν και στην ανάλυσή μας υπάρχει σχετικά χαμηλή αντιπροσώπηση των ταξινομικών μονάδων που ανήκουν στα Ulvophyceae (όπως άλλωστε ισχύει και για την εργασία των Fučíková *et al.* 2014a), τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ συμφωνούν με την παρατήρηση ότι η μονοφυλετική προέλευση της κλάσης Ulvophyceae δεν υποστηρίζεται επαρκώς από τις μέχρι τώρα μελέτες. Για ακόμη μία φορά θα πρέπει να τονιστεί ότι το παρουσιαζόμενο δέντρο δεν έχει πλήρως

επιλυθεί, και τα όποια προκύπτοντα συμπεράσματα θα πρέπει να αξιολογούνται με προσοχή. Επιπρόσθετα δεδομένα και αναλύσεις είναι απαραίτητες ώστε να αποσαφηνιστούν οι απεικονιζόμενες εδώ φυλογενετικές σχέσεις.

Οι μοριακές μελέτες που σχετίζονται με τις φυλογενετικές σχέσεις εντός του γένους, είναι ελάχιστες, συνήθως περιλαμβάνουν αναλύσεις ενός γονιδίου, και δεν είναι επαρκείς ώστε να επιλύσουν τις ασάφειες ως προς το γένος, αλλά και ως προς τα Chlorodendrophyceae ως ομάδα γενικότερα (Lee & Hur 2009, Arora *et al.* 2013, González *et al.* 2015). Το ίδιο ισχύει και για την πλειονότητα των μελετών που σχετίζονται με τις φυλογενετικές σχέσεις των ευρύτερων χλωροφυκών (Nakayama *et al.* 1996, Daugbjerg *et al.* 1997, Guillou *et al.* 2004, Viprey *et al.* 2008, Marin 2012). Είναι εμφανές ότι η προσέγγιση με τη χρήση στην ανάλυση πολλών γονιδίων (multi-gene) σε έναν μεγάλο αριθμό ειδών, είναι απαραίτητη ώστε να καταλήξουμε σε αξιόπιστα συμπεράσματα, ιδιαίτερος όσον αφορά σε μια αρχέγονη ομάδα, όπως τα χλωροφύκη (green algae) σε αντιστοιχία με άλλες ομάδες οργανισμών (πρβ. Philippe & Telford 2006). Είναι ακόμη εμφανές ότι μια ανάλυση δύο γονιδίων δεν είναι επαρκής για την επίλυση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των βασικών χλωροφύτων (core chlorophytes) και των πρασινοφύτων. Στην πραγματικότητα, έχει δειχθεί ότι η απαιτούμενη ποσότητα της πληροφορίας για μια τέτοιου μεγέθους ανάλυση υπερβαίνει ακόμη και μια προσέγγιση οκτώ (8) γονιδίων (Fučíková *et al.* 2014a). Συνεπώς, επιπλέον δεδομένα που θα καλύπτουν έναν μεγαλύτερο αριθμό αντιπροσώπων και γενετικών δεικτών, είναι απαραίτητα ώστε να εκτιμηθούν οι φυλογενετικές σχέσεις σε ταξινομικό επίπεδο κατώτερο της κλάσης. Ωστόσο, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι φυλογενετικές σχέσεις εντός του φύλου Chlorophyta καθώς και η μονοφυλετικότητα του κλάδου UTC απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση.

Ένα σημαντικό πρόβλημα στη μοριακή προσέγγιση της ταξινομικής μελέτης του γένους *Tetraselmis* αποτελεί το γεγονός ότι η πλειονότητα των κατατεθειμένων αλληλουχιών σε τράπεζες μοριακών δεδομένων προέρχονται είτε από εργαστηριακούς πληθυσμούς, είτε από στελέχη απομονωμένα μεν από φυσικούς πληθυσμούς αλλά με ασαφή ταξινομική θέση. Τα στελέχη αυτά είναι κατατεθειμένα με κωδικούς όπως δόθηκαν από τους εκάστοτε ερευνητές, και στην πλειονότητα των περιπτώσεων η ταξινομική αναγνώριση αυτών είναι σε επίπεδο γένους. Σε αρκετές περιπτώσεις, η ίδια αλληλουχία μπορεί να είναι κατατεθειμένη με αρκετές διαφορετικές ονομασίες, πράγμα το οποίο περιπλέκει ακόμη περισσότερο τη διαδικασία της φυλογενετικής ανάλυσης και εισάγει σφάλματα με επιπτώσεις στην ποιότητα των παραγόμενων δεδομένων. Οι Lee & Hur (2009) πραγματοποίησαν μια σύγκριση αρκετών στελεχών του γένους *Tetraselmis* βασιζόμενοι σε δεδομένα

αλληλουχιών του γονιδίου 18S rDNA και σε δεδομένα μέσου κυτταρικού μεγέθους για κάθε στέλεχος. Αν και η μελέτη αυτή αποτελεί τη μοναδική στη βιβλιογραφία, η οποία επιχείρησε την αναλυτική διερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των διαφόρων στελεχών του γένους *Tetraselmis*, τα δεδομένα ήταν ανεπαρκή ώστε να παράσχουν οποιαδήποτε σαφή πληροφορία σχετικά με τη συστηματική του γένους και τη δυνατότητα συμβολής των μοριακών δεδομένων στην ταυτοποίηση των στελεχών του. Στα πλαίσια της Διατριβής αυτής, έγινε μια προσπάθεια χρήσης των μοριακών δεδομένων από δύο γονίδια, το 18S rDNA σε συνδυασμό με το rbcL (το τελευταίο προτείνεται από τους ανωτέρω συγγραφείς) για την ταυτοποίηση των μελετηθέντων στελεχών σε επίπεδο είδους καθώς και για τη διερεύνηση των σχέσεων των στελεχών με τις διάφορες ομάδες των ευρύτερων χλωροφυκών. Αν και, όπως προαναφέρθηκε, μια τέτοια ανάλυση δεν διασαφηνίζει πλήρως τις φυλογενετικές σχέσεις των ομάδων αυτών μεταξύ τους, προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για την ταξινομική θέση των στελεχών, και από την άποψη αυτή η χρήση των δεδομένων αυτών θεωρείται επιτυχής. Εν τούτοις θα πρέπει να σημειωθεί ότι η περιορισμένη διαθεσιμότητα μοριακών δεδομένων καλής ποιότητας για το γένος *Tetraselmis* αποτελεί μια μελλοντική πρόκληση, και τα δεδομένα αυτά θεωρείται ότι θα συνεισφέρουν όχι μόνο στην ταξινομική ταυτοποίηση αλλά και στη διασαφήνιση των φυλογενετικών σχέσεων του γένους και της ιδιαίτερης εξελικτικής σημασίας του κατά τον διαχωρισμό των βασικών χλωροφυτών (core chlorophyta) από τα πιο αρχέγονα πρασινοφύκη (prasinophytes) (Marin 2012).

4.1.4. Λιπιδικά Προφίλ

Τα βιοχημικά προφίλ των θαλασσίων μικροφυκών υπήρξαν αρκετά ασαφή κυρίως εξ αιτίας των μεταβολών στις βιοχημικές ιδιότητες των θαλασσίων μικροφυκών καθώς αυτά προσαρμόζονται στις συνθήκες του περιβάλλοντος. Επιπροσθέτως, η ανεπάρκεια αποτελεσματικών τεχνολογικών μεθοδολογιών για τη μελέτη των βιοχημικών αυτών προφίλ, οι ταξινομικές ασάφειες των περισσότερων αντιπροσώπων των μικροφυκών, καθώς και η έλλειψη προτύπων συνθηκών καλλιέργειας, είχαν καταστήσει στο παρελθόν αρκετά δυσχερή τη λήψη αξιόπιστων βιοχημικών δεδομένων (Chuecas & Riley 1969, Volkman *et al.* 1989, Dunstan *et al.* 1992). Ωστόσο, κατά τις τελευταίες δεκαετίες, το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα απαραίτητα λιπαρά οξέα, τα οποία συντίθενται *de novo* πρωτίστως από τα θαλάσσια μικροφύκη (πρβ. Ackman 1989, Viso & Marty 1993, Mansour *et al.* 2005, Atalah *et al.* 2007, Adarme-Vega *et al.* 2012, Siriwardhana *et al.* 2012, Solana *et al.* 2014), καθώς

και η αξιοποίηση των μικροφυκών στην παραγωγή βιοκαυσίμων, είχαν ως αποτέλεσμα έναν μεγάλο αριθμό σχετικών ερευνών (π.χ. Patil *et al.* 2007, Gouveia & Oliveira 2009, Lang *et al.* 2011, Liu *et al.* 2011, Griffiths *et al.* 2012, Hempell *et al.* 2012, Stansell *et al.* 2012, Nascimento *et al.* 2013, Mathimani & Pugazhendhi 2019). Η αξιολογή ποικιλία λιπαρών οξέων στα θαλάσσια μικροφύκη, η οποία περιλαμβάνει σημαντικές ποσότητες ω-3 πολυ-ακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), είναι ένας από τους λόγους για τη μεγάλη οικολογική και οικονομική σημασία των μικροφυκών.

Όπως έχει προαναφερθεί, αρκετές από τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε στελέχη του γένους *Tetraselmis* σχετίζονται με την παραγωγικότητα ως προς τη βιομάζα και το λιπιδικό περιεχόμενο αυτών και εστιάζουν στην απόκριση των κυττάρων σε συνθήκες περιβαλλοντικής καταπόνησης (stress) (Otero & Fabregas 1997, D'Souza & Kelly 2000, Xu *et al.* 2013, Sharma *et al.* 2014, Fon-Sing & Borowitzka 2016, Pereira *et al.* 2016, Tsai *et al.* 2016).

Αν και η ταξινομική και φυλογενετική αξία των λιπιδικών προφίλ των μικροφυκών, καθώς και η χρήση τους ως βιοδεικτών (biomarkers) έχουν διερευνηθεί (Pohl & Zurheide 1979, Mourente *et al.* 1990, Cohen *et al.* 1995, Mostaert *et al.* 1998, Lang *et al.* 2011, Sahu *et al.* 2013 Hemaiswarya *et al.* 2013, Cañavate *et al.* 2016), αντίστοιχες μελέτες για το γένος *Tetraselmis* είναι ελάχιστες, δεδομένου ότι η πλειονότητα των ερευνών επί των βιοχημικών αποκρίσεων των ειδών του γένους εστιάζει σε συγκεκριμένα στελέχη με βιομηχανική και οικονομική σημασία, όπως στελέχη των ειδών *T. chuii* και *T. suecica*, αλλά και μη ταξινομημένων στελεχών (Molina *et al.* 1991, Brown 2002, Papandroulakis *et al.* 2002, Meseck *et al.* 2005, Spolaore *et al.* 2006, Guzmán *et al.* 2010, Montero *et al.* 2011, Guedes & Malcata 2012, Bondioli *et al.* 2012, Go *et al.* 2012, Bong & Loh 2013, Khatoon *et al.* 2014, Kim *et al.* 2016). Επιπλέον, η πλειονότητα των μελετών δεν ασχολούνται με την ταξινόμηση των χρησιμοποιούμενων στελεχών, αλλά κυρίως με τις βιοχημικές τους ιδιότητες (π.χ. Molina *et al.* 1991, Grima *et al.* 1994, Adarme-Vega 2014, Custodio *et al.* 2014, Ferreira *et al.* 2016, Tsai *et al.* 2016, Sarpal *et al.* 2019). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα “μετατόπισης” (shift) του λιπιδικού προφίλ προς την κατεύθυνση της αύξησης της παραγωγής ορισμένων επιθυμητών λιπαρών οξέων, μεταβάλλοντας τις συνθήκες καλλιέργειας, -η οποία φαίνεται ότι ισχύει και στο γένος *Tetraselmis*- (βλ. Teo *et al.* 2014, Kim *et al.* 2017, Moussa *et al.* 2017, Han *et al.* 2018, Kumar *et al.* 2018, Park *et al.* 2018, Lari *et al.* 2019) ενδεχομένως περιορίζει τη χρησιμότητα των προφίλ αυτών σε ταξινομικές μελέτες του γένους, αν και η επίδραση αυτή είναι ποσοτική μάλλον παρά ποιοτική (Dunstan *et al.* 1992).

Τα μελετηθέντα στελέχη εμφάνισαν προφίλ λιπαρών οξέων που έχει δειχθεί στο παρελθόν ότι χαρακτηρίζουν γενικώς την παραφυλετική κλάση Prasinophyceae (Dunstan *et al.* 1992, Zhukova & Aizdaicher 1994). Η ομάδα αυτή χαρακτηρίζεται από λιπαρά μακράς αλυσίδας με 16 και 18 άτομα άνθρακα, ενώ σε αντίθεση με τα Chlorophyceae, φαίνεται να παράγει και λιπαρά οξέα με 20 (και ενίοτε 22) άτομα άνθρακα. Το βασικό λιπαρό οξύ (αυτό με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα) ήταν το 16:00, ενώ σε σημαντική περιεκτικότητα ανιχνεύθηκε και το 18:00 αλλά και τα 16:4(n-3), 18:3(n-3) και 18:4(n-3), τα οποία φαίνεται να χαρακτηρίζουν τόσο τα Chlorophyceae όσο και τα Prasinophyceae (Dunstan *et al.* 1992). Επιπλέον, σε όλα τα στελέχη ανιχνεύθηκαν λιπαρά οξέα με 20 άτομα άνθρακα και συγκεκριμένα το 20:1(n-9) και το 20:5(n-3) ή EPA, ενώ στο στέλεχος της Βατάσας (V 2-2) ανιχνεύθηκε και ένα λιπαρό οξύ με 22 άτομα άνθρακα [το 22:5(n-3)], κάτι μάλλον ασύνηθες για τα στελέχη του γένους *Tetraselmis*. Η περιεκτικότητα αυτή σε λιπαρά οξέα αλυσίδας 20 και 22 ατόμων άνθρακα είναι και εκείνη που φαίνεται να διαφοροποιεί τα στελέχη από την κλάση Chlorophyceae, στην οποία δεν εμφανίζονται συνήθως αυτά τα λιπαρά οξέα (Dunstan *et al.* 1992, Zhukova & Aizdaicher 1994). Ως συνέπεια, βάσει του λιπιδικού προφίλ, το γένος *Tetraselmis* φαίνεται να ομοιάζει περισσότερο στα πρασινοφύκη παρά στα χλωροφύκη. Μια τέτοια παραδοχή θα μπορούσε να είναι εσφαλμένη, αν αναλογιστεί κανείς ότι οι ανωτέρω μελέτες (Dunstan *et al.* 1992, Zhukova & Aizdaicher 1994) - οι μοναδικές που περιλαμβάνουν αναλυτικές περιγραφές των λιπιδικών προφίλ των δύο ομάδων (Chlorophyceae και Prasinophyceae) - είναι μεροληπτικές (biased). Αυτό συμβαίνει διότι στην ανάλυση των δεδομένων τους το γένος *Tetraselmis* συμπεριελήφθη εξ αρχής στα Prasinophyceae, δεδομένου ότι η τότε ταξινομική του θέση το ενέτασσε στην κλάση αυτή. Ωστόσο, η παρουσία λιπαρών οξέων με 20 και 22 άτομα άνθρακα στα γένη *Pyramimonas* και *Micromonas* (Dunstan *et al.* 1992) που είναι γνωστοί αντιπρόσωποι των πρασινοφυκών, ενισχύουν την παρατήρηση ότι τα λιπιδικά προφίλ του γένους είναι παρόμοια με εκείνα των Prasinophyceae.

Το “τυπικό” προφίλ λιπαρών οξέων των πρασινοφυκών επιβεβαιώθηκε για τα στελέχη του Μεσσολογγίου, τα οποία αναλύθηκαν στα πλαίσια της Διατριβής, καθώς και για τα στελέχη της Ροδιάς (AthU-AI R 9-2, R 9-3), τα προφίλ των οποίων είχαν αναλυθεί προηγουμένως από τους Tzovenis *et al.* (2009). Το στέλεχος της Βατάσας (AthU-AI V 2-2) παρουσίασε ένα προφίλ σχετικά διαφοροποιημένο σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη, καθώς φαίνεται να παράγει μεγαλύτερα ποσοστά πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (60,55%) αλλά και αξιοσημείωτη ποσότητα του λιπαρού οξέος εικοσι-πεντα-ενοϊκού οξέος ή EPA (περίπου 6%), το οποίο σημειωτέον είναι ένα από

τα απαραίτητα λιπαρά οξέα για τη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων. Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, είναι το μόνο στελεχος όπου ανιχνεύθηκε λιπαρό οξύ 22 ατόμων άνθρακα. Παρά τις ομοιότητες στα λιπαρά προφίλ όλων των μελετηθέντων στελεχών, παρατηρούνται και αρκετές μικρές διαφοροποιήσεις, οι οποίες θα μπορούσαν να αποδοθούν στην ποσοτική ανίχνευση της μεθόδου (π.χ. για κάποιο λιπαρό οξύ που ήταν σε ελάχιστες ποσότητες και η περιεκτικότητά του εμφανίζεται ως μηδενική). Ωστόσο, παρατηρώντας την ανάλυση ομαδοποίησης Bray-Curtis (Εικόνα 44) φαίνεται ότι τα στελέχη εμφανίζουν κάποιο μοτίβο ομαδοποίησης. Συγκεκριμένα, τα στελέχη ίδιας προέλευσης ομαδοποιούνται μαζί.

Δεδομένου ότι η διασαφήνιση των προφίλ λιπαρών οξέων στα μικροφύκη είναι ακόμη σε πρωταρχικό στάδιο και υπάρχει σημαντική έλλειψη αξιόπιστων δεδομένων αντίστοιχων προφίλ για την πλειονότητα των υπαρχόντων ειδών και στελεχών μικροφυκών, οποιαδήποτε έρευνα ακόμη και επί στελεχών τα οποία έχουν αναλυθεί προηγουμένως, είναι πολύ σημαντική. Τα προφίλ λιπαρών οξέων που είναι διαθέσιμα επί του παρόντος περιορίζονται σε λίγους μόνο αντιπροσώπους μικροφυκών, και συγκεκριμένα σε οικονομικής σημασίας στελέχη, γεγονός που οδηγεί σε μια μη αντιπροσωπευτική εικόνα ελαττώνοντας την πιθανή ταξινομική αξία των βιοχημικών δεδομένων. Στην εργασία αυτή, παρουσιάζουμε 3 (τρία) νέα προφίλ για το γένος *Tetraselmis*, και συγκεκριμένα των στελεχών [AthU-AI Mes 5, Mes 17 και V 2 2] συνοδευόμενα από την πλήρη ταξινομική περιγραφή αυτών. Επίσης παρουσιάζουμε την περιγραφή δύο ακόμη στελεχών [AthU-AI R 9 2 και R 9 3], τα λιπιδικά προφίλ των οποίων έχουν παρουσιαστεί προηγουμένως (Tzovenis *et al.* 2009). Η συνεισφορά αυτή στη διασαφήνιση της ποικιλότητας του περιεχομένου των μικροφυκών σε λιπαρά οξέα ακόμη και εντός του ιδίου είδους και μεταξύ στελεχών της ίδιας προέλευσης, δύναται να έχει όχι μόνο βιομηχανική αλλά και ταξινομική αξία, δεδομένου ότι η αυξανόμενη εκτίμηση και καταγραφή των προφίλ λιπαρών οξέων θα μπορούσε να οδηγήσει στη χρήση τους ως επιπρόσθετων ταξινομικών δεικτών. Επιπλέον, οι βιβλιογραφικές καταγραφές για τα λιπαρά οξέων των διαφόρων ομάδων μικροφυκών και ιδιαιτέρως των πρασινοφυκών, είναι αρκετά αντιφατικές, δεδομένων των συστηματικών ανακατατάξεων εντός του φύλου Chlorophyta, με αποτέλεσμα να απαιτείται μια εκ νέου διερεύνηση και αξιολόγηση των υπαρχόντων δεδομένων σε συνδυασμό νέες μελέτες, ώστε οι πληροφορίες αυτές να αποκτήσουν ουσιαστική ταξινομική και συστηματική σημασία.

4.1.5. Ενδοειδική Ποικιλομορφία

Τα αποτελέσματα της Διατριβής αναδεικνύουν μια ενδιαφέρουσα ενδο-ειδική ποικιλομορφία εντός του γένους *Tetraselmis*, η οποία φαίνεται να εκτείνεται ακόμη και σε ταξινομικά επίπεδα κατώτερα του γένους και μάλιστα εν προκειμένω, σε επίπεδο μορφής. Τα μελετηθέντα στελέχη ανήκουν όλα στην ίδια μορφή, βάσει τόσο μορφολογικών όσο και μοριακών δεδομένων, αλλά ταυτόχρονα, εμφανίζουν και μια ποικιλομορφία, η οποία αποκαλύπτεται μέσω της ενδελεχούς, πολυπαραγοντικής διερεύνησης τόσο της μορφολογίας τους όσο και της βιοχημικής τους συμπεριφοράς. Η ποικιλομορφία αυτή φαίνεται σε ορισμένες περιπτώσεις να σχετίζεται με την προέλευση των στελεχών, κάτι το οποίο παρουσιάζει αρκετό ενδιαφέρον. Για τη δικαιολόγηση μιας τέτοιας υπόθεσης, θα πρέπει να τονιστεί ότι τα στελέχη έχουν απομονωθεί από διαφορετικά παράκτια συστήματα και έχουν καλλιεργηθεί στο εργαστήριο για περίπου 13 έτη. Η λιμνοθάλασσα της Βατάσας είναι μια σχετική ανοιχτή λιμνοθάλασσα με τιμές αλατότητας παρόμοιες με αυτές της θάλασσας, η λιμνοθάλασσα της Ροδιάς είναι μια κλειστή λιμνοθάλασσα με σχετικά χαμηλή αλατότητα, και οι αλυκές Μεσολογίου είναι ένα υπεράλμυρο ενδιαίτημα που παρουσιάζει πολύ ιδιαίτερες συνθήκες σε σχέση τις τυπικές λιμνοθάλασσες (βλ. Εικόνες 28-30, Κεφάλαιο 3.1. και Παραρτήματα 3-4). Τα φυσικά αυτά περιβάλλοντα εμφανίζουν λοιπόν το καθένα ιδιαίτερες συνθήκες με πιθανή επίδραση στη συμπεριφορά των εργαστηριακών πληθυσμών που προέρχονται από αυτά. Οι εμπλεκόμενοι προσαρμοστικοί μηχανισμοί απαιτούν εκτενή μελέτη, κάτι που δεν αποτελεί στόχο της Διατριβής. Μολονότι, όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 1.7, είναι επισφαλές να θεωρείται ότι οι εργαστηριακοί πληθυσμοί που προέρχονται από φυσικά απομονωμένα στελέχη αντικατοπτρίζουν πλήρως τα γνωρίσματα των φυσικών πληθυσμών, βάσει των αποτελεσμάτων μας, θεωρούμε επίσης αντιστοίχως εσφαλμένο να αγνοηθεί η πιθανή επίδραση του ενδιαιτήματος προέλευσης στη συμπεριφορά των εργαστηριακών πληθυσμών ακόμη και μετά από τον πλήρη εγκλιματισμό τους στις συνθήκες εργαστηρίου (βλ. και Gould & Lewontin 1979, Brand 1984, Rodriguez-Valera 2004, Lynch 2007, Lakeman *et al.* 2009).

Οι συνθήκες καλλιέργειας ήταν πανομοιότυπες για όλα τα μελετηθέντα στελέχη και όλα συντηρούνται σε ειδικό θάλαμο υπό σταθερές συνθήκες. Ωστόσο, όπως φάνηκε και στην ανάλυση των λιπαρών οξέων αλλά και στις μορφολογικές παρατηρήσεις, τα στελέχη έχουν ορισμένες λεπτές αλλά αξιοπρόσεκτες διαφορές. Η πιο αξιοσημείωτη περίπτωση είναι εκείνη του στελέχους AthU-AI V 2-2, το οποίο παρουσιάζει διαφοροποίηση τόσο στη μορφολογία όσο και στη βιοχημεία του. Το μέγεθος και ο βιο-όγκος του είναι σημαντικά μικρότερα σε σχέση με αυτά των υπολοίπων στελεχών,

η οφθαλμική του κηλίδα είναι ευμεγέθης και εμφανής σε όλα τα παρατηρηθέντα κύτταρα (κάτι που δεν ισχύει πάντα για τα άλλα στελέχη), ενώ και το λιπιδικό του προφίλ είναι διακριτό.

Άλλη μία σημαντική διαφοροποίηση είναι εκείνη που προαναφέρθηκε για τα στελέχη του Μεσολογγίου (AthU-AI Mes 5, Mes 17), τα οποία εμφανίζουν διαφορετικό χρωματισμό, όταν καλλιεργούνται σε διαφορετικές αλατότητες. Αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει ένδειξη εγκλιματισμού σε συνθήκες εργαστηρίου ή το αντίθετο, δηλ. ότι οι συνθήκες αυτές δεν είναι ευνοϊκές για τα πιθανώς αλόφιλα αυτά στελέχη, κάτι το οποίο χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Μια τέτοια παρατήρηση θα ενέτασσε την ταξινομική μονάδα *T. verrucosa* f. *rubens* στα ευρύαλα είδη του γένους *Tetraselmis*, ενισχύοντας την πιθανή αξία του σε οικολογικές μελέτες αλλά και σε βιομηχανικές εφαρμογές.

Βάσει τόσο των μοριακών αλλά και των βιοχημικών αποτελεσμάτων, τα ζεύγη στελεχών κοινής προελεύσεως δηλ. τα δύο στελέχη της Ροδιάς (AthU-AI R 9-2 και R 9-3) και τα δύο στελέχη του Μεσολογγίου (AthU-AI Mes 5, Mes 17), φαίνεται να είναι πανομοιότυπα μεταξύ τους. Δεν εμφανίζουν καμία διαφοροποίηση βάσει των γενετικών αποστάσεων για τα μελετηθέντα γονίδια (Πίνακες 7-10) ενώ ομαδοποιούνται και βάσει των λιπιδικών τους προφίλ (Εικόνα 44). Ιδιαίτερος τα στελέχη του Μεσολογγίου δεν φαίνεται να εμφανίζουν καμία σημαντική διαφορά Σαφώς και απαιτούνται περισσότερα δεδομένα ώστε να διασαφηνιστεί κατά πόσον τα στελέχη αυτά είναι πανομοιότυπα, αλλά βάσει των παρατηρήσεών μας δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο αυτό, παρότι πρόκειται για πληθυσμούς που έχουν απομονωθεί και αναπτυχθεί ξεχωριστά. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με τα στοιχεία επί της ενδοειδικής ποικιλομορφίας των καλλιεργούμενων πληθυσμών υποδεικνύουν την πολυπλοκότητα των διεργασιών που διέπουν τους πληθυσμούς αυτούς και ταυτόχρονα την αβεβαιότητα και τη δυσκολία πρόβλεψης της εξελικτικής πορείας ενός καλλιεργούμενου στελέχους από τη στιγμή της απομόνωσής του από το φυσικό περιβάλλον.

4.2. ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Dunaliella salina*

4.2.1. Ενδιαίτημα και Εξάπλωση

Το γένος *Dunaliella* εμφανίζει παγκόσμια εξάπλωση. Αν και εμφανίζεται τόσο σε γλυκά όσο και σε υφάλμυρα ύδατα, το ενδιαφέρον εστιάζεται στα είδη που ευδοκιμούν κυρίως σε υπεράλμυρα περιβάλλοντα όπως αλμυρές λίμνες και αλυκές. Το γένος αυτό έχει καταγραφεί στη Β. Αμερική και τον Καναδά (Stephens & Gillespie 1976, Rushforth & Felix 1982, Hammer *et al.* 1983, Kirkwood & Henley 2006), στη Ν. Αμερική (Cifuentes *et al.* 1992, 2001, Guevara *et al.* 2005), σε διάφορες περιοχές της Ευρώπης [όπως Βρετανία (Butcher, 1959), Ισπανία (Garcia *et al.* 1997, López-González *et al.* 1998, Mendoza *et al.* 2008, Guzmán *et al.* 2012), Γαλλία (Guzmán *et al.* 2012), Ιταλία (Alfinito *et al.* 1990), Βουλγαρία (Pavlova *et al.* 1998, Stoynova-Bakalova & Toncheva-Panova 2003) και φυσικά στη Ρουμανία από όπου και έχει περιγραφεί για πρώτη φορά (Teodoresco 1905), καθώς επίσης μεταξύ άλλων (βλ. και Oren 2014, Polle *et al.* 2019) στην Αυστραλία (Borowitzka & Siva 2007) και την Ασία (Wen & Zhi-Hui 1999, Preetha *et al.* 2012, Vo & Tran 2014). Στην Ελλάδα, οι μόνες μέχρι σήμερα ταξινομικές και οικολογικές καταγραφές του είδους αναφέρονται από τον Δολαψάκη (Dolapsakis *et al.* 2005, Δολαψάκης 2008) σε *in situ* καλλιέργειες εμπλουτισμού από τις Αλυκές του Μεγάλου Εμβόλου (Αγγελοχώρι Θεσσαλονίκης) και από την Καρλοβασίτη (Καρλοβασίτη, 2015) στην Αλυκή της Σάμου. Στην παρούσα Διατριβή, αναφέρεται για πρώτη φορά στη λιμνοθάλασσα Μεσολογγίου η εμφάνιση του γένους *Dunaliella* και του είδους *D. salina*, πλην μιας πρόσφατης -μη επιβεβαιωμένης από άποψη συστηματικής- αναφοράς (Χώτος 2019). Όλα τα στελέχη που έχουν απομονωθεί στις εργασίες αυτές από το Μεγάλο Έμβολο, το Μεσολόγγι και τη Σάμο, είναι κατατεθειμένα στην Τράπεζα Στελεχών AthU-AI (Πίνακας 1).

4.2.2. Μορφολογία και Βιοχημεία

Μετά από παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο, τα περισσότερα μελετηθέντα στελέχη εμφάνισαν μορφολογική συνάφεια με το είδος *Dunaliella salina* Teodoresco, όπως αυτό έχει περιγραφεί από τους Massjuk 1979, Preisig 1992, González *et al.* 2001, 2019, Cifuentes *et al.* 2001, Borowitzka & Siva 2007. Τα στελέχη AthU-AI Dun 2-8 έχουν περιγραφεί από μορφολογική και μοριακή άποψη προηγουμένως (Δολαψάκης 2008), ενώ τα στελέχη AthU-AI Dun 21-32 και Dun 35-39 περιγράφονται μορφολογικά στην παρούσα Διατριβή. Σύμφωνα με την περιγραφή των στελεχών AthU-AI Dun 2-8

κατά Δολαψάκη (2008), τα στελέχη εμφανίζουν όλα τα βασικά γνωρίσματα του είδους, συμπεριλαμβανομένης της μη ευδιάκριτης οφθαλμικής κηλίδας, του ωοειδούς σχήματος του κυττάρου (σε κανονικές συνθήκες αλατότητας) και της ευνοϊκής ανάπτυξης σε αλατότητες 80-100‰. Στην παρούσα Διατριβή παρουσιάζονται επιπλέον και βιοχημικά δεδομένα σχετικά με την παραγωγή β-καρωτενίου στα στελέχη AthU-AI Dun 2-8, Dun 29-32 και Dun 35.

Η πλειονότητα των ερευνηθέντων στελεχών εμφάνισαν μια αξιοσημείωτη δυναμική στην παραγωγή β-καρωτενίου. Η επίδραση της αλατότητας στην παραγωγή β-καρωτενίου στα στελέχη του είδους *D. salina* αναφέρεται εκτενώς στη βιβλιογραφία (π.χ. Ben-Amotz & Avron 1982, 1983, Loeblich 1982, Borowitzka *et al.* 1990, Cifuentes *et al.* 1996, Heidari *et al.* 2000, Gómez *et al.* 2003, Pisal & Lele 2004, Abu Sara *et al.* 2011, Mishra & Jha 2011, Narvaez-Zapata 2011, Pasqualetti *et al.* 2011, Hamed *et al.* 2017). Αν και είναι σαφές από τα παρουσιαζόμενα στη Διατριβή αποτελέσματα, ότι η αλατότητα επιδρά στην παραγωγή β-καρωτενίου, δεν εμφανίζεται κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο απόκρισης των στελεχών, το οποίο θα μπορούσε να γενικευθεί για το είδος. Βάσει της περιεκτικότητας των στελεχών σε β-καρωτένιο στο % του ξηρού βάρους του κυττάρου, διακρίνονται 2 ομάδες: α) τα στελέχη που παράγουν β-καρωτένιο σε ποσοστά <10% του ξηρού βάρους του κυττάρου (στελέχη AthU-AI Dun 3-4, Dun 7-8, Dun 29, Dun 35. “μορφότυπος” 3) και β) τα στελέχη που παράγουν β-καρωτένιο σε ποσοστά >10% του ξηρού βάρους του κυττάρου (AthU-AI Dun 2, Dun 5-6, Dun 30-32, “μορφότυποι” 2, 4 και 5). Συνεπώς, τα βιοχημικά δεδομένα φαίνεται αντικατοπτρίζουν σε κάποιον βαθμό τη μορφολογική διαφοροποίηση. Τα στελέχη εμφάνισαν επίσης διαφοροποιημένη απόκριση όσον αφορά στην επιβίωση των κυττάρων σε διαφορετικές αλατότητες, γεγονός που υποδεικνύει ότι κάθε στέλεχος μπορεί να εμφανίζει διαφορετικά βέλτιστα ανάπτυξης. Η παραγωγικότητα σε β-καρωτένιο φαίνεται να επηρεάζεται και από τις ειδικές πειραματικές συνθήκες όπως ο αερισμός. Οι αεριζόμενες καλλιέργειες της δεύτερης, διερευνητικής (screening) σειράς πειραμάτων παρουσίασαν μεγαλύτερες περιεκτικότητες β-καρωτενίου και αύξηση βιομάζας, πιθανώς λόγω καλύτερης ανάδευσης των αερίων και κυρίως του CO₂ (βλ. και Suh & Lee 2003, Mohsenpour & Willoughby 2016, Cheng *et al.* 2019, Magdaong *et al.* 2019), με αποτέλεσμα την αυξημένη διαθεσιμότητα άνθρακα σε σχέση με τις στατικές καλλιέργειες του προκαταρκτικού πειράματος. Ωστόσο, ορισμένα στελέχη εμφάνισαν ιδιαιτερότητες: το στέλεχος AthU-AI Dun 30 επιβίωσε σε αλατότητα 220‰ αλλά όχι σε αλατότητα 200‰, και αντιστοίχως το AthU-AI Dun 5 επιβίωσε σε αλατότητα 180‰ ενώ κατέρρευσε σε αλατότητες 140-160‰. Το στέλεχος AthU-AI Dun 8 εμφάνισε τη βέλτιστη παραγωγή

βιομάζας και β-καρωτενίου σε αλατότητα 40‰, η οποία θεωρείται χαμηλή για το είδος *D. salina* (Borowitzka & Siva 2007). Ιδιάζουσα περίπτωση είναι το στελεχος AthU-AI Dun 35, το οποίο ενώ φάνηκε ότι παρήγαγε σημαντικά ποσά β-καρωτενίου στο προκαταρκτικό πείραμα (10 mL), κατέρρευσε εντελώς σε όλες τις επαναλήψεις του διερευνητικού πειράματος (250 mL). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η επιβίωση των καλλιέργειών είχε διαφορετική εικόνα στο προκαταρκτικό πείραμα, όπου ελάχιστες από τις μη αεριζόμενες καλλιέργειες κατέρρευσαν σε σχέση με τις αεριζόμενες καλλιέργειες του διερευνητικού πειράματος. Το γεγονός ότι αρκετές από τις καλλιέργειες κατέρρευσαν, ενδεχομένως οφείλεται α) σε αδυναμία εγκλιματισμού των στελεχών στις εκάστοτε συνθήκες καλλιέργειας, β) στο μέγεθος του εμβολίου και στο αναπτυξιακό στάδιο από το οποίο προήλθε (ενίοτε κάποιες καλλιέργειες εισέρχονται στη στατική φάση ταχύτερα από το αναμενόμενο) ή ακόμη γ) στην καθυστέρηση έναρξης των μηχανισμών προστασίας του κυττάρου (βλ. και Leroi *et al.* 1994, Andersen 2005, Thamatrakoln *et al.* 2012). Η απότομη μεταβολή της αλατότητας ενδέχεται επίσης να προκαλεί πρόωρο θάνατο των κυττάρων σε εργαστηριακές καλλιέργειες (βλ. Hashemi *et al.* 2020). Άλλη μια πιθανή εξήγηση, η οποία θα δικαιολογούσε και τη μειωμένη επιβίωση των αεριζόμενων καλλιέργειών σε σχέση με τις στατικές, είναι η λεγόμενη “τάση διάτμησης” (shear stress), η οποία προκύπτει από τη μηχανική πίεση που ασκούν οι φυσαλίδες αέρα στα κύτταρα και μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη διάρρηξη των κυττάρων (Barbosa *et al.* 2003, Leupold *et al.* 2013). Αν και τα χλωροφύκη (green algae) είναι η ομάδα των μικροφυκών, η οποία εμφανίζει τη μεγαλύτερη ανοχή σε τέτοιου είδους πιέσεις (Wang & Lan 2018), η έλλειψη κυτταρικού τοιχώματος καθιστά τα κύτταρα του γένους *Dunaliella* αρκετά ευάλωτα σε διάρρηξη εξ αιτίας της τάσης διάτμησης (Kokkinos *et al.* 2016, Wijffels *et al.* 2019). Η αυξημένη θνησιμότητα των κυττάρων στα πρώτα στάδια των καλλιέργειών θα μπορούσε να έχει προκαλέσει την πρόωρη κατάρρευσή τους, και συνεπώς θα πρέπει δοθεί στο θέμα αυτό η δέουσα προσοχή σε μελλοντικά πειράματα. Εν τούτοις, η ανομοιογενής αυτή συμπεριφορά ως προς την επιβίωση και παραγωγικότητα των στελεχών, υποδεικνύει ότι οι μηχανισμοί που σχετίζονται με την απόκριση στην αλατότητα είναι πολύπλοκοι (βλ. Hellebust 1985, Chen & Jiang 2009, Mishra & Jha 2011).

4.2.3 Ενδο-ειδική Ποικιλότητα

Όσον αφορά στην ενδο-ειδική ποικιλότητα που παρατηρείται μεταξύ των στελεχών, υιοθετήθηκε στη Διατριβή αυτή το σύστημα των 4 “μορφοτύπων” του γένους

Dunaliella sensu Δολαψάκη (2008). Επιπροσθέτως, η παρούσα διατριβή συνέβαλε στην επέκταση του συστήματος αυτού με την προσθήκη ενός ακόμη “μορφοτύπου” (μορφότυπος 5), ο οποίος αναφέρεται στα στελέχη που παρουσιάζουν ιδιαιτέρως αυξημένα ποσοστά β-καρωτενίου και σκουρόχρωμη εμφάνιση κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο, οπότε και δεν εμπίπτουν σε κανέναν από τους ήδη περιγραφέντες “μορφοτύπους”.

Βάσει των στατιστικών αναλύσεων (βλ. Κεφάλαιο 3.5.3), οι οποίες αναφέρονται σε παραμέτρους δυναμικής της καλλιέργειας (κυτταρική πυκνότητα, βιομάζα σε ξηρό βάρος, περιεκτικότητα κυττάρων σε β-καρωτένιο, παραγωγικότητα β-καρωτενίου), διαπιστώθηκε ότι οι δύο βασικοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση της συμπεριφοράς των καλλιεργειών στα πειράματα καταπόνησης, δηλ. οι παράγοντες “στέλεχος” και “αλατότητα”, φαίνεται να αλληλεπιδρούν. Η απόκριση του κάθε στελέχους στην καταπόνηση λόγω αυξημένης αλατότητας (salinity stress) φαίνεται να είναι διαφορετική. Οι διαφορές που παρατηρούνται τόσο στην περιεκτικότητα του κυττάρου όσο και στην παραγωγικότητα της καλλιέργειας σε υποδεικνύουν ότι η αλατότητα δεν πυροδοτεί τον μηχανισμό παραγωγής και συσσώρευσης β-καρωτενίου στο είδος *D. salina* αλλά μάλλον ενισχύει το ενυπάρχον δυναμικό παραγωγής του μεταβολίτη στα κύτταρα. Η απόκριση του είδους *D. salina* στην αλατότητα έχει συσχετιστεί με ορμονικές αλληλεπιδράσεις όπως ο μεταβολισμός του αμπισικού οξέος (ABA) -ενός λιπαρού οξέας που έχει φυτο-ορμονική δράση- και ο ρόλος αυτού στην αύξηση και τον μεταβολισμό των κυττάρων *D. salina* (Cowan & Rose 1991, Cowan *et al.* 1992, Sarmad *et al.* 2007, Yan-Xia *et al.* 2007, Lv *et al.* 2019). Μία τέτοιου τύπου μεταβολική διεργασία θα μπορούσε ίσως να εξηγήσει τις διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται στην επίδραση της αλατότητας επί της αύξησης και του μεταβολισμού του β-καρωτενίου στα διαφορετικά στελέχη *D. salina*. Από την πολυπαραγοντική ανάλυση προκύπτει ότι η τελική συμπεριφορά της καλλιέργειας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ιδιαιτερότητα του εκάστοτε στελέχους. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την πολυμορφική φύση του γένους (Borowitzka & Siva 2007) και αναδεικνύουν την αναγκαιότητα περαιτέρω διερεύνησης των διάφορων στελεχών του και τη σημασία της εκτίμησης της ενδο-ειδικής διαφοροποίησης, με ταυτόχρονη εστίαση στη συστηματική και την οικολογία. Η ενδο-ειδική ποικιλομορφία των στελεχών του είδους *D. salina* έχει επισημανθεί και μελετηθεί σε επίπεδο μορφολογίας, βιοχημείας αλλά και γενετικής, κυρίως σε υπεράλμυρα περιβάλλοντα, ενώ κατά τις τελευταίες δεκαετίες έχει ενταθεί η απομόνωση τοπικών στελεχών κυρίως λόγω της αξιοποίησής τους στη βιομηχανία παραγωγής καρωτενοειδών αλλά και βιοκαυσίμων (Lerche 1937, Massjuk

1973, Preisig 1992, Phadwal & Singh 2003, Dolapsakis *et al.* 2005, Guevara *et al.* 2005, Borowitzka & Siva 2007, González *et al.* 2001, 2019, Gómez & González 2004, Guzmán *et al.* 2012, Preetha *et al.* 2012, Vo & Tran 2014, Hejazi *et al.* 2016, Byrd *et al.* 2017). Τα αποτελέσματα της Διατριβής επιβεβαιώνουν ότι μορφολογικές και βιοχημικές διαφοροποιήσεις παρατηρούνται μεταξύ των στελεχών AthU-AI *Dunaliella salina* ίδιας προέλευσης. Αντίστοιχη ποικιλομορφία παρατηρείται και σε άλλες περιοχές, όπου στελέχη απομονωμένα από το ίδιο ενδιαίτημα εμφανίζουν διαφοροποιήσεις (π.χ. Χιλή, González *et al.* 2001, Βιετνάμ, Vo & Tran 2014, Βενεζουέλα, Guevara *et al.* 2005, Ινδία, Preetha *et al.* 2012). Ο Δολαψάκης (2008) υπέθεσε ότι οι μηχανισμοί που σχετίζονται με την ποικιλομορφία αυτή ενδεχομένως παρουσιάζουν ομοιότητες με τους μηχανισμούς συμπάτριας ειδογένεσης, δηλ. ότι απουσία συνθηκών που απομονώνουν γεωγραφικά τα στελέχη, συγγενικά στελέχη διαφοροποιούνται ούτως ώστε να συνυπάρχουν στον ίδιο βιότοπο, με ταυτόχρονη αναπαραγωγική απομόνωση (Mayr 1963, Coyne & Orr 2004). Ωστόσο, μια τέτοια υπόθεση στερείται ερεισμάτων, δεδομένου ότι οι γνώσεις σχετικά με τους μηχανισμούς ειδογένεσης στα μικροφύκη είναι εξαιρετικά περιορισμένες (Yamamoto *et al.* 2003, Sharma & Rai 2011, Ryšánek *et al.* 2016). Μολονότι το είδος *D. salina* εμφανίζει εγγενή αναπαραγωγή -συνθήκη απαραίτητη για να εξετασθεί ακόμη και η πιθανότητα να πρόκειται για κάποιον τέτοιου τύπου μηχανισμό- δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με την αναπαραγωγική συμβατότητα των μελετηθέντων στελεχών. Αν και οι περιβαλλοντικές συνθήκες φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιον ρόλο στη γενετική απόκλιση των συμπάτριων πληθυσμών στα μικροφύκη (Parke *et al.* 2003, Ryšánek *et al.* 2016), δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι τα στελέχη *D. salina* καταλαμβάνουν διαφορετικές “θέσεις” εντός του ενδιαίτηματος προέλευσης. Μια τέτοιου τύπου διαφοροποίηση θα εξηγούσε ενδεχομένως τις διαφορετικές αποκρίσεις των ελληνικών στελεχών στην αλατότητα και το διαφορετικό δυναμικό παραγωγής β-καρωτενίου παρά την κοινή τους προέλευση. Εν τούτοις, τα μέχρι σήμερα συλλεγόμενα δεδομένα για τα στελέχη παραπέμπουν σε ενδο-ειδική ποικιλότητα, συνεπώς ο όρος “ειδογένεση” δεν αντικατοπτρίζει τον βαθμό διαφοροποίησης των στελεχών, αφού προϋποθέτει αναπαραγωγική απομόνωση. Για να εξεταστεί ένα τέτοιο σενάριο απαιτείται η συλλογή μιας πληθώρας δεδομένων, μοριακών, οικολογικών και φυσιολογικών, καθώς και δεδομένων αναπαραγωγικής συμβατότητας μεταξύ των διαφορετικών στελεχών, κάτι το οποίο υπερβαίνει τους στόχους της Διατριβής αυτής, αλλά αποτελεί μια ενδιαφέρουσα προοπτική για μελλοντικές έρευνες.

4.2.4 Σχόλια επί της ταξινόμησης του είδους *Dunaliella salina* Teodoresco

Σύμφωνα με τους Borowitzka & Siva (2007), η αλατότητα του μέσου όπου αναπτύσσονται βέλτιστα τα είδη του γένους *Dunaliella* αποτελεί το πρώτο κριτήριο διάκρισής τους, ενώ η περιεκτικότητα σε β-καρωτένιο αποτελεί το κύριο μορφολογικό γνώρισμα διάκρισης μεταξύ των ειδών *Dunaliella salina* Teodoresco και *Dunaliella parva* W. Lerche σε συνδυασμό με την εμφάνιση ή όχι διακριτής οφθαλμικής κηλίδας sensu Borowitzka & Siva 2007. Η εφαρμογή αυτής της «κλείδας» για την ταξινόμηση των στελεχών AthU-AI δημιουργεί αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, το στέλεχος AthU-AI Dun 7 - το οποίο ταυτοποιήθηκε ως *D. salina* και επιβεβαιώθηκε με μοριακά δεδομένα των γονιδίων LSU, ITS1, και ITS2 (Δολαφάκης 2008), και του γονιδίου rbcL (Χαντζηστρούντσιου αδημοσίευτα αποτελέσματα) - καθώς και τα στελέχη AthU-AI Dun 29 και Dun 35 - τα οποία ταυτοποιήθηκαν επίσης ως *D. salina* στα πλαίσια της Διατριβής μας -, εμφανίζουν βέλτιστη ανάπτυξη σε αλατότητες 100-140‰, γεγονός που τα κατατάσσει στα αλόφιλα είδη sensu Borowitzka & Siva. Ωστόσο, τα στελέχη αυτά δεν παρήγαγαν β-καρωτένιο σε περιεκτικότητα >5% του ξηρού βάρους του κυττάρου σε καμία από τις αλατότητες όπου καλλιεργήθηκαν, με αποτέλεσμα να μην πληρούν το βασικό διαγνωστικό κριτήριο για την ένταξή τους στο είδος *D. salina* σύμφωνα με τους Borowitzka & Siva. Το ίδιο ισχύει και για τα στελέχη CCAP 19/25 και SAG 42.88, τα οποία επίσης παρουσίασαν χαμηλές περιεκτικότητες σε β-καρωτένιο, αν και αποτελούν αυθεντικά στελέχη *D. salina* κατατεθειμένα σε διεθνείς συλλογές. Το στέλεχος SAG 42-88 μάλιστα είναι το αυθεντικό στέλεχος *D. bardawil* Ben-Amotz et Avron nom. nud. (συνώνυμο πλέον με το *D. salina*), το οποίο απομονώθηκε από τους Ben-Amotz & Avron (1982) και αποτελεί ένα από τα πρότυπα στελέχη για τη μελέτη της καρωτενο-γένεσης στο είδος *Dunaliella salina*. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ίδιοι ερευνητές Ben-Amotz & Avron (1982) παρατήρησαν ότι σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας και σε σχετικά υψηλή αλατότητα (>100‰) το στέλεχος αυτό παρουσιάζει περιεκτικότητα σε β-καρωτένιο της τάξης του 0,5%, με αποτέλεσμα να μη διακρίνεται από τα υπόλοιπα χλωροφύκη, ενώ όταν αυξήθηκε η φωτεινή ένταση η περιεκτικότητά του σε β-καρωτένιο αυξήθηκε σε >10%. Τα αποτελέσματα της Διατριβής υποδεικνύουν ότι η αύξηση της αλατότητας δεν είχε ως αποτέλεσμα την αναμενόμενη αύξηση στην παραγωγή β-καρωτενίου για τα στελέχη αυτά, είναι δε σαφές ότι η απόκριση των κυττάρων του εκάστοτε στελέχους στην καταπόνηση διαφοροποιείται κατά περίπτωση, όπως προαναφέρθηκε. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι γηραιότερες καλλιέργειες των στελεχών AthU-AI Dun 7, Dun 29, CCAP 19/25 και SAG 42.88 εμφάνισαν έναν πρασινοκίτρινο χρωματισμό (μορφότυπος 3), αλλά δεν εμφάνισαν κιτρινέρυθρο έως ερυθρό χρωματισμό. Θα

πρέπει ακόμη να αναφερθεί ότι το στέλεχος AthU-AI Dun 2 -επίσης ταυτοποιημένο ως *D. salina*-, το οποίο παρουσίασε αρκετά αυξημένη παραγωγή β-καρωτενίου στα διερευνητικά πειράματα, παρουσίασε βέλτιστη αύξηση σε αλατότητα 40‰, κάτι το οποίο δεν συνάδει με την ταξινόμησή του στα αλόφιλα είδη *Dunaliella* βάσει των κριτηρίων κατά Borowitzka & Siva.

Τα αποτελέσματα αυτά εγείρουν ερωτήματα σχετικά με την αποτελεσματικότητα του συστήματος κλασικής ταξινόμησης των ειδών του γένους *Dunaliella* βάσει καθαρά βιοχημικών κριτηρίων και ιδίως της περιεκτικότητας σε β-καρωτένιο. Όπως είναι γνωστόν και αναφέρθηκε άλλωστε και στο Κεφάλαιο 1.11, η παραγωγή του β-καρωτενίου στα κύτταρα *D. salina* φαίνεται να πυροδοτείται ως απόκριση στην καταπόνηση. Ο μηχανισμός φαίνεται να σχετίζεται πρωτίστως με την απόκριση στην φωτο-οξειδωση που προκαλείται από τις υψηλές εντάσεις φωτεινής ακτινοβολίας, με σκοπό την προστασία της φωτοσυνθετικής συσκευής και γενικότερα την προστασία του κυττάρου από οξειδωτική καταπόνηση (πρβ. Loeblich 1982, Ben-Amotz & Avron 1983, 1989, Ben-Amotz *et al.* 1989, Lers 1990, 1991, Lamers 2001, Salguero *et al.* 2003, Hejazi *et al.* 2004). Εν τούτοις, ο μηχανισμός που πυροδοτεί τη διαδικασία της καρωτενο-γένεσης παραμένει ασαφής, αν και έχει δειχθεί ότι σχετίζεται μάλλον με την οξειδο-αναγωγική κατάσταση της φωτοσυνθετικής αλυσίδας (Lamers 2001). Δεδομένου ότι ο μηχανισμός αυτός φαίνεται να σχετίζεται με τη μείωση του ρυθμού αύξησης που προκαλείται από την καθυστέρηση στον διπλασιασμό των κυττάρων, είναι αναμενόμενο ότι οποιαδήποτε συνθήκη επιδρά επί της διαδικασίας αυτής, δηλ. προκαλεί μείωση του ρυθμού αύξησης, μπορεί να πυροδοτεί τον ίδιο αυτόν μηχανισμό ο οποίος οδηγεί στην αυξημένη συσσώρευση β-καρωτενίου στα κύτταρα (Ben-Amotz & Avron 1983, Stoynova-Bakalova & Toncheva-Panova 2003). Αυτό δεν ισχύει για τον παράγοντα «φωτεινή ένταση», αφού η αύξηση αυτής επιταχύνει την κυτταρική διαίρεση αντί να την επιβραδύνει, και στην περίπτωση αυτή η συσσώρευση του β-καρωτενίου ενδεχομένως χρησιμεύει στην απορρόφηση της επιπλέον φωτεινής ακτινοβολίας, η οποία δεν δύναται να χρησιμοποιηθεί κατά τη φωτοσύνθεση (Ben-Amotz & Avron 1982, 1983a, Ben-Amotz *et al.* 1989, Vorst *et al.* 1994). Είναι λοιπόν εμφανές, ότι πρόκειται για μια ιδιαίτερος πολύπλοκη φυσιολογική διαδικασία, η οποία μπορεί να ρυθμίζεται από πολλούς παράγοντες και το αποτέλεσμα, η περιεκτικότητα δηλ. των κυττάρων σε β-καρωτένιο, μπορεί να ποικίλλει σημαντικά ακόμη και για το ίδιο στέλεχος ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος ή της καλλιέργειας. Η επιλογή χρήσης της βιοχημικής αυτής παραμέτρου (περιεκτικότητα β-καρωτενίου ως % ποσοστό επί του ξηρού βάρους του κυττάρου) για τη διάκριση μεταξύ διαφορετικών ειδών του γένους *Dunaliella* (και ειδικότερα των ειδών *D. salina*

και *D. parva*), η οποία υιοθετήθηκε από τους Borowitzka & Siva (2007), ενισχύθηκε από τα αποτελέσματα των Cifuentes *et al.* (2001). Οι τελευταίοι επεσήμαναν ότι η φυσιολογία των κυττάρων είναι ικανό κριτήριο για τη διάκριση μεταξύ των ειδών του γένους. Ωστόσο, κατά την τελευταία δεκαετία, η έρευνα επί των φυσιολογικών μηχανισμών παραγωγής β-καρωτενίου από στελέχη *Dunaliella* έχει εντατικοποιηθεί. Η ραγδαία συσσωρευόμενη βιβλιογραφία υποδεικνύει την τεράστια δυνατότητα για “διαχείριση” των μεταβολικών μηχανισμών και των βιοχημικών αποκρίσεων στα κύτταρα του γένους, και ιδιαίτερος των καρωτενο-παραγωγών ειδών όπως το *D. salina* με την ελεγχόμενη μεταβολή των συνθηκών καλλιέργειας (π.χ. Lamers *et al.* 2010, Takaichi 2011, Markou & Nerantzis 2013, Shumskaya & Wurtzel 2013, Akter *et al.* 2016, Minhas *et al.* 2016, Nguyen *et al.* 2016, Singh *et al.* 2016, Solovchenko & Neverov 2017, Vo *et al.* 2017, Einali 2018, Hermawan *et al.* 2018, Ben-Amotz 2019, Wijffels *et al.* 2019, Wongsnansilp *et al.* 2019, Hashemi *et al.* 2020). Υπό το φως αυτών των ερευνών, και βάσει των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται εδώ, θεωρούμε ότι η % περιεκτικότητα των κυττάρων σε β-καρωτένιο είναι ικανό και απαραίτητο κριτήριο για την ενδο-ειδική διάκριση των διαφόρων στελεχών του είδους *D. salina*, αλλά δεν αποτελεί ισχυρό διαγνωστικό κριτήριο για την αδιαμφισβήτητη ταξινομική διάκριση του είδους *D. salina* από τα υπόλοιπα είδη του γένους. Είναι λοιπόν σαφές ότι η ταξινόμηση του γένους θα πρέπει να βασίζεται σε έναν συνδυασμό μορφολογικών, βιοχημικών και μοριακών δεδομένων. Βάσει των παρατηρήσεων αυτών, προτείνεται όλα τα στελέχη AthU-AI τα οποία προηγουμένως είχαν κατατεθεί ως *Dunaliella salina* να μετονομαστούν σε *Dunaliella cf. salina* έως ότου υπάρχουν αρκετά δεδομένα για τη σαφέστερη ταξινόμηση αυτών.

4.3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ

Παρά τη σημαντική επιστημονική πρόοδο των τελευταίων δεκαετιών, η συστηματική των χλωροφυκών (green algae) παραμένει ως επί το πλείστον ασαφής (Leliaert *et al.* 2012). Όσον αφορά στην ομάδα των πρασινοφύτων (prasinophytes), αρκετοί ερευνητές έχουν εξετάσει τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των διαφόρων ταξινομικών επιπέδων, εστιάζοντας στις μοριακές τεχνικές σε συνδυασμό με τις παραδοσιακές μεθόδους ταξινόμησης (κυρίως μορφολογία), με αποτέλεσμα σημαντικές συστηματικές διασαφήσεις και ανακατατάξεις (π.χ. Massjuk 2006, Massjuk & Lilitska 2006, Leliaert *et al.* 2012, Fučíková *et al.* 2014a, Lee *et al.* 2015, Finkel *et al.* 2016).

Στη πλαίσια της Διατριβής αυτής, αναλύθηκαν 5 στελέχη των παράκτιων λιμνοθαλασσών της Δυτικής Ελλάδος, τα οποία ανήκουν στο γένος *Tetraselmis*. Το γένος αυτό αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα γένη που παραδοσιακά είχε ενταχθεί στα πρασινοφύκη (Prasinophyceae) και ένα από τα πλέον ευέλικτα γένη όσον αφορά στην ανοχή τους σε μεταβολές περιβαλλοντικών παραμέτρων. Η μορφολογική ομοιότητα των μελετηθέντων στελεχών με τη μορφή *T. verrucosa* f. *rubens* επιβεβαιώθηκε μέσω φυλογενετικής ανάλυσης. Εκτός από την κλασική ταξινομική ταυτοποίηση του γένους βάσει μορφολογίας, η οποία εντάσσει τα στελέχη εντός της προαναφερθείσας ταξινομικής μονάδας, τα μοριακά δεδομένα που προέκυψαν, αποτελούν μια επιπλέον συνεισφορά στη διαλεύκανση των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των διαφόρων εξελικτικών γραμμών των χλωροφυκών (green algae) με δεδομένα των γονιδίων *rbcL* και 18S rRNA. Τα δεδομένα αλληλουχίας του γονιδίου *rbcL*, τα οποία παρατίθενται εδώ, αποτελούν την πρώτη διαθέσιμη καταγραφή για το γονίδιο αυτό, από την ταξινομική μονάδα *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens*. Τα παρουσιαζόμενα βιοχημικά δεδομένα, και συγκεκριμένα τα προφίλ λιπαρών οξέων, κατατίθενται εδώ ως πιθανοί συμπληρωματικοί ταξινομικοί δείκτες που συμβάλλουν στην κατανόηση της ενδο-ειδικής ποικιλομορφίας των ειδών του γένους *Tetraselmis*, όπως έχει συμβεί στο παρελθόν και με άλλες ομάδες μικροφυκών (Pohl & Zurheide 1979, Mourente *et al.* 1990, Cohen *et al.* 1995, Mostaert *et al.* 1998, Dunstan *et al.* 1992, Zhukova & Aizdaicher 1994, Lang *et al.* 2011, Sahu *et al.* 2013, Christodoulou *et al.* 2015, Cañavate *et al.* 2016).

Στα πλαίσια της Διατριβής μελετήθηκαν επίσης 25 στελέχη του είδους *Dunaliella salina*, τα οποία έχουν απομονωθεί από αλυκές της Ελλάδος, είναι κατατεθειμένα στην Τράπεζα στελεχών AthU-AI του Πανεπιστημίου Αθηνών (Πίνακας 1) και αποτελούν τις μόνες καταγραφές του είδους σε υπεράλμυρα περιβάλλοντα της Ελλάδας. Το είδος *D. salina* αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα είδη των υπεράλμυρων ενδαιτημάτων παγκοσμίως, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην πρωτογενή παραγωγή των τροφικών πλεγμάτων στα περιβάλλοντα αυτά (Oren 2014). Παράλληλα, αποτελεί ένα από τα πλέον ελκυστικά είδη για βιοχημικές και βιοτεχνολογικές μελέτες που σχετίζονται με την παραγωγή καρωτενοειδών και β-καρωτενίου, ενός μεταβολίτη με μεγάλη οικονομική σημασία παγκοσμίως (Borowitzka 1990, Curtain 2000, Ben-Amotz 2019). Οι μορφολογικές παρατηρήσεις σε συνδυασμό με τη μελέτη της βιοχημικής απόκρισης ορισμένων από τα μελετηθέντα στελέχη (AthU-AI Dun 2, Dun 5-6 και Dun 30-32) στην αλατότητα του μέσου καλλιέργειας επιβεβαίωσαν τη συγγένεια αυτών με το είδος *D. salina*. Ταυτοχρόνως ανέδειξαν την σημαντική ενδο-ειδική ποικιλότητα που μπορεί να εμφανίζεται σε

πληθυσμούς του ίδιου είδους και ίδιας προέλευσης αλλά και τη μεγάλη βιοχημική και μορφολογική ποικιλομορφία που εμφανίζει το είδος *D. salina*, όπως έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες (González & Gómez 1998, González *et al.* 2001, Gómez & González 2004, Borowitzka & Siva 2007, Mendoza *et al.* 2008, Assunção *et al.* 2012). Επιπροσθέτως, επιχειρήθηκε μια εκτίμηση των μεθόδων κλασικής ταξινόμησης του γένους *Dunaliella* με έμφαση στο είδος *D. salina* και προτάθηκε η πολυπαραγοντική ανάλυση ως βέλτιστη προσέγγιση για τη συστηματική μελέτη του γένους.

Τέλος, η εργασία αυτή συνέβαλε στη γνώση επί της ποικιλομορφίας του λιμνοθαλάσσιου φυτοπλαγκτού στην Ελλάδα και μπορεί να αποτελέσει παράδειγμα για μελλοντικές πολυπαραγοντικές συστηματικές προσεγγίσεις και άλλων, ανεπαρκώς μελετημένων αντιπροσώπων των μικροφυκών.

4.4. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Τα μεταβατικά συστήματα είναι ανάμεσα στα πλέον ενδιαφέροντα οικοσυστήματα παγκοσμίως και τα είδη που επιβιώνουν εκεί εμφανίζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον από άποψη συστηματικής, αλλά και πιθανής οικονομικής αξιοποίησης. Τα είδη αυτά μπορεί να επιβιώνουν και να ευδοκιμούν σε ένα εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών, ακόμη και σε ακραίες συνθήκες, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζουν ιδιαίτερα βιοχημικά γνωρίσματα και παράγουν βιοδραστικές ουσίες υψηλής αξίας. Η μελέτη απομονωμένων στελεχών μικροφυκών από μεταβατικά συστήματα μέσω πολυπαραγοντικής προσέγγισης συμβάλλει στην ενδελεχή κατανόηση των οργανισμών αυτών και των ιδιομορφιών τους, ενώ η ανάπτυξη και διαχείριση εργαστηριακών καλλιεργειών από φυσικούς πληθυσμούς δίνει τη δυνατότητα μελέτης, οργανισμών που δύσκολα μελετώνται στο πεδίο. Ταυτόχρονα, μέσω τέτοιων μελετών αποκαλύπτονται φυλογενετικές σχέσεις και διαφοροποιήσεις σε επίπεδο είδους ή ακόμη και κατώτερης ταξινομικής ιεράρχησης. Η παρούσα Διατριβή, υιοθετεί μια τέτοια προσέγγιση, με σκοπό να δώσει έναυσμα για περαιτέρω έρευνες σχετικά με τον πλήρη χαρακτηρισμό ομάδων του φυτοπλαγκτού από μεταβατικά συστήματα.

Η ενδο-ειδική ποικιλομορφία των μικροφυκών αποτελεί ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον αντικείμενο για μελλοντικές έρευνες. Ο ρόλος του περιβάλλοντος απομόνωσης, η επίδραση του εγκλιματισμού σε συνθήκες καλλιέργειας, η επίδραση των περιβαλλοντικών παραμέτρων και των παραμέτρων καλλιέργειας στη βιοχημική και

μορφολογική απόκριση των κυττάρων, καθώς και οι γενετικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση σε επίπεδο στελεχών αλλά και στη διαφοροποίηση των εργαστηριακών από τους φυσικούς πληθυσμούς, αξίζει να διερευνηθούν περαιτέρω. Οι ταξινομικές και οικολογικές θεωρήσεις αρκετών ομάδων μικροφυκών είναι ασαφείς και αυτό δυσχεραίνει επιπλέον τη μελέτη τους, συνεπώς ένας από τους βασικούς άξονες των μελλοντικών ερευνών θα πρέπει να είναι η διασαφήνιση της συστηματικής και της φυλογένεσης των μικροφυκών. Ταυτοχρόνως, η αναθεώρηση, αξιολόγηση και διόρθωση των εσφαλμένων δεδομένων, τα οποία ενίοτε αναπαράγονται από τη βιβλιογραφία, θα πρέπει να είναι επίσης στο επίκεντρο και η μελέτη της ενδοειδικής ποικιλομορφίας των μικροφυκών θα συμβάλει επίσης προς αυτήν την κατεύθυνση. Η Διατριβή αυτή ενθαρρύνει περαιτέρω βιοχημικές και μοριακές αναλύσεις που θα εστιάζουν στις μεταβολικές αποκρίσεις των μικροφυκών σε διάφορες περιβαλλοντικές παραμέτρους και στους μοριακούς μηχανισμούς που τις διέπουν (metabolomics). Τέτοιες έρευνες ενδέχεται να συμβάλουν όχι μόνο στη διασαφήνιση της συστηματικής των μελετούμενων οργανισμών αλλά και στη βέλτιστη αξιοποίηση αυτών σε διάφορους τομείς της βιοτεχνολογίας και της βιομηχανίας.

Η βιομηχανική εκμετάλλευση των μικροφυκών, αν και ξεκίνησε πολύ παλαιότερα, γνωρίζει ιδιαίτερη ανάπτυξη τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Οι προοπτικές χρήσης των μικροφυκών στη βιομηχανία και τη βιοτεχνολογία ενέχουν τόσο πλεονεκτήματα όσο και προκλήσεις. Η πλειονότητα των σχετικών ερευνών εστιάζει στη βιοχημική διερεύνηση των μελετούμενων στελεχών, δίνοντας μικρότερη έμφαση στην οικολογία και την ταξινόμηση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικής πληροφορίας, η οποία θα μπορούσε να συμβάλει στην ευρύτερη βασική έρευνα επί των μικροφυκών, αλλά και να επιτρέψει τη βέλτιστη αξιοποίηση των διαφόρων στελεχών, μέσω του πλήρους χαρακτηρισμού τους σε ταξινομικό, μοριακό, βιοχημικό και οικολογικό επίπεδο. Προς την κατεύθυνση αυτή κινήθηκε και η παρούσα Διατριβή, πραγματοποιώντας μια πολυπαραγοντική μελέτη των αντιπροσώπων δύο σημαντικών ομάδων μικροφυκών από ελληνικά μεταβατικά συστήματα, με την προοπτική να πραγματοποιηθούν αντίστοιχες μελέτες και με τα υπόλοιπα στελέχη που είναι κατατεθειμένα στην Τράπεζα AthU-AI, αλλά και με στελέχη ακόμη περισσότερων ομάδων του φυτοπλαγκτού που θα εμπλουτίσουν στο μέλλον την Τράπεζα. Οι βιοχημικές αναλύσεις αποκάλυψαν επιπλέον, τις δυνατότητες χρήσης των μελετηθέντων στελεχών σε εφαρμοσμένο επίπεδο.

Το στέλεχος *Tetraselmis* V 2-2 παρουσίασε ενδιαφέρον προφίλ λιπαρών οξέων με σημαντικότερο στοιχείο την παραγωγή του απαραίτητου λιπαρού οξέος EPA. Το στέλεχος αυτό αποτελεί λοιπόν έναν κατάλληλο υποψήφιο προς χρήση στη

βιομηχανία τροφίμων και θα είχε ενδιαφέρον στο μέλλον, η προσπάθεια διαχείρισης της καλλιέργειας αυτού, με μεταβολή των συνθηκών με σκοπό την αύξηση της παραγωγής EPA. Επίσης, όλα τα στελέχη παρουσίασαν ενδιαφέρον από βιοχημικής απόψεως, και η περαιτέρω διερεύνηση των καρωτενοειδών τους ενδέχεται να οδηγήσει στην ανακάλυψη και άλλων πιθανών βιομηχανικών εφαρμογών.

Ορισμένα από τα ελληνικά στελέχη *Dunaliella salina* που παρουσιάζονται στα πλαίσια της Διατριβής εμφανίζουν μια ποικιλία ιδιοτήτων που τα καθιστά κατάλληλα προς χρήση στη βιομηχανία παραγωγής φυσικού β-καρωτενίου. Συγκεκριμένα, εμφανίζουν ικανοποιητική επιβίωση σε ένα εύρος αλατοτήτων, καθώς και σημαντική παραγωγικότητα σε β-καρωτένιο με τη χρήση συμβατικών και χαμηλού κόστους τεχνικών καλλιέργειας. Αξίζει να σημειωθεί ότι από τη διερευνητική αυτή διαδικασία (screening), επιλέχθηκαν ορισμένα στελέχη βάσει της παραγωγικότητας σε β-καρωτένιο και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε δοκιμές βελτιστοποίησης (optimisation trials). Στις δοκιμές αυτές εκτιμήθηκε η επίδραση διαφόρων παραμέτρων καλλιέργειας με σκοπό την ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου προς εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα (Chantzistrountsiou, Ntzouvaras, Tzovenis, Papadaki, Fountoulaki & Economou-Amilli, δημοσίευση σε εξέλιξη).

Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές α) σε διάφορα θρεπτικά διαλύματα, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων λιπασμάτων χαμηλού κόστους, διαθέσιμων στο εμπόριο (NutriLeaf), β) σε συνθήκες απότομης αύξησης αλατότητας (καταπόνηση), όπου τα στελέχη μεταφέρθηκαν από χαμηλότερη σε υψηλότερη αλατότητα κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης και γ) σε συνθήκες στέρησης αζώτου (N-stress), όπου τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσον περιεκτικότητα σε άζωτο (νιτρικά άλατα) 100%, 75%, 50%, 25% και 0% σε σχέση με την αρχική συνταγή του θρεπτικού διαλύματος. Από τα πειράματα αυτά προέκυψε ότι η παραγωγικότητα των στελεχών *D. salina* σε β-καρωτένιο ενισχύεται σημαντικά σε συνθήκες έλλειψης αζώτου (0% στο μέσον καλλιέργειας), κάτι το οποίο έχει αναφερθεί προηγουμένως για το είδος αυτό (Ben-Amotz 1987, Marin *et al.* 1998, Phadwal & Singh 2003, Coesel *et al.* 2008, Lamers *et al.* 2012, Chen *et al.* 2015). Επίσης τα στελέχη αυτά εμφάνισαν τις μέγιστες τιμές βιομάζας όταν καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσον του εμπορίου, κάτι το οποίο περιορίζει σημαντικά το κόστος παραγωγής σε βιομηχανική κλίμακα (Ντζουβάρας 2018). Από τη διαδικασία της βελτιστοποίησης προέκυψε ότι τα στελέχη Dun 30 και Dun 31 με παραγωγικότητες σε β-καρωτένιο 1,67 και 1,76 mg/L/day αντιστοίχως, τιμές συγκρίσιμες με αυτές της αντίστοιχης βιβλιογραφίας (Ben-Amotz & Avron 1983b, Ben-Amotz 1995, Garcia-González *et al.* 2003, 2005, Lamers *et al.* 2010, Abu Sara *et al.* 2011, Rad *et al.* 2011, Pisal & Lele 2011, Emeish 2012, Taha *et*

al. 2012, Nguyen *et al* 2014, Πίνακας 21), αποτελούν κατάλληλους υποψηφίους προς χρήση στη βιομηχανία παραγωγής φυσικού β-καρωτενίου.

Πίνακας 21. Βιβλιογραφική ανασκόπηση τιμών κυτταρικής παραγωγής (cell density) και περιεχομένου β-καρωτενίου (b-carotene) σε στελέχη *D. salina*.

Reference	Strain	Conditions	Medium	Cell density cells/ml	b-carotene mg/L
Ben Amotz & Avron (1983)	<i>D. salina</i>	Salinity 210 ‰ Continuous light (5-550 kergs/cm s)	Custom(?)	4,4 x 10 ⁴	4,92
Rad et al (2011)	<i>D. salina</i> (from Lake Urmia)	Salinity 60‰, 120‰, 180‰ 100 μmol photons/m.s 25°C	Modified Johnson's	1,68 x 10 ⁶	15,02
Emeish (2012)	<i>D. salina</i> (from Dead Sea)		Modified Johnson's	5 x 10 ⁵	
AbuSara et al (2011)	<i>D. salina</i> isolates from Dead Sea	Salinity 250‰ 61 μmol photons/m.s 25°C	Custom (M1)	6,5 x 10 ⁶	5,20
Trung & Tran (2014)	<i>D. salina</i> 19/18 CCAP	Salinity 90‰ 120‰ 50 μmol photons/m.s 25°C	Custom (MD4)	~ 9 x 10 ⁵	5,00
Taha et al (2012)	<i>D. salina</i> strains from Egypt wet-lands	Salinity 150‰ 22,5 x 10 ³ Lux 28°C	MH medium	10 ⁵	2,46
Pisal & Lele (2011)	<i>D. salina</i> 19.3 SAG	Salinity 150‰ 2300 Lux 25°C	Custom	1,91 x 10 ⁶	5,20

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Δανιηλίδης, Δ. (1991).** Συστηματική και οικολογική μελέτη των διατόμων των λιμνοθαλασσών Μεσολογίου, Αιτωλικού και Κλείσοβας (Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα). Ανακτήθηκε από: <https://www.didaktorika.gr/eadd/>
- Δολαφάκης, Ν. Π. (2008).** Συστηματική και οικολογία μικροφυκών. (Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα). Ανακτήθηκε από: Βιβλιοθήκη του Τομέα Οικολογίας και Ταξινόμησης, ΕΚΠΑ.
- Ευρωπαϊκό Οικολογικό Δίκτυο Natura 2000. (2019).** Υπουργείο Περιβάλλοντος και Ενέργειας. <http://www.ypeka.gr/Default.aspx?tabid=432&language=el-GR> (Accessed on 9 March , 2020).
- Καρλοβασίτη, Π. (2015).** Μελέτη της φωτοσυνθετικής μικροχλωρίδας από την Αλυκή της νήσου Σάμου. (Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα). Ανάκτηση από: https://www.openarchives.gr/aggregator-openarchives/edm/pergamos/000005- uoa_dl_object_uoadl%3A1318717
- Ντζουβάρας, Α. (2018).** Καλλιέργεια Ελληνικών στελεχών *Dunaliella* sp. σε φωτοβιοαντιδραστήρες για τη μεγιστοποίηση παραγωγής καρωτενοειδών. (Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα). Ανάκτηση από: <https://pergamos.lib.uoa.gr/uoa/dl/frontend/el/browse/2838461>
- Σεφερλής, Μ. (2012).** Ευτροφισμός και επίδραση βαρέων μετάλλων στα θαλάσσια μακρόφυτα του Θερμαϊκού κόλπου. (Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη). Ανακτήθηκε από: https://www.openarchives.gr/aggregator-openarchives/edm/IKEE_AUT/000097- 129522
- Χαντζητρούντσιου, Ξ. (2011).** Μικροοργανισμοί σε λιμναίο/θαλάσσιο περιβάλλον: Ταξινόμηση μελέτη στελεχών του γένους *Tetraselmis* STEIN (Prasinophyceae) από λιμνοθάλασσες της δυτικής Ελλάδας. (Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα).
- Χαντζητρούντσιου, Ξ. (2014).** Συστηματική ανάλυση στελεχών του γένους *Tetraselmis* STEIN (Chlorodendrophyceae) από λιμνοθάλασσες της Δυτικής Ελλάδας με τη χρήση μικροσκοπικών, μοριακών και βιοχημικών μεθόδων. (Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα). Ανάκτηση από: <https://pergamos.lib.uoa.gr/uoa/dl/frontend/el/browse/1319871>
- Χώτος, Γ. (2019).** *Dunaliella*, το θαυμαστό φύκος των αλυκών. Τμήμα Τεχνολογίας, Αλιείας, Υδατοκαλλιεργειών, ΤΕΙ Δυτικής Ελλάδος. Ανακτήθηκε από: <http://www.tay.teiwest.gr/ghotos/?p=956> (Accessed on 3 March, 2020).
- Abe, K., Hattori, H., & Hirano, M. (2007).** Accumulation and antioxidant activity of secondary carotenoids in the aerial microalga *Coelastrella striolata* var. *multistriata*. *Food Chemistry*, 100(2), 656-661.
- Aberoumand, A. (2011).** A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 6(1), 71-78.
- Abomohra, A. E. F., El-Sheekh, M. & Hanelt, D. (2017).** Screening of marine microalgae isolated from the hypersaline Bardawil lagoon for biodiesel feedstock. *Renewable Energy*, 101, 1266-1272.
- Abrams, P. A., & Chen, X. (2002).** The evolution of traits affecting resource acquisition and predator vulnerability: character displacement under real and apparent competition. *The American Naturalist*, 160(5), 692-704.
- Abu-Rezq, T. S., Al-Hooti, S., Jacob, D., Al-Shamali, M., Ahmed, A. & Ahmed, N. (2010).** Induction and extraction of β -carotene from the locally isolated *Dunaliella salina*. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 1(4), 58-83.
- Abu Sara, N. F., Emeish, S., & Sallal, A. K. J. (2011).** The effect of certain environmental factors on growth and β -carotene production by *Dunaliella* sp. isolated from the Dead Sea. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 147(614), 1-14.
- Ackman, R. G. (1989).** Nutritional composition of fats in seafoods. *Progress in Food & Nutrition Science*, 13(3-4), 161-289.
- Adam, S., Kumar, P. S., Santhanam, P., Kumar, S. D. & Prabhavathi, P. (2015).** Bioremediation of tannery wastewater using immobilized marine microalga *Tetraselmis* sp.: experimental studies and pseudo-second order kinetics. *Journal of Marine Biology and Oceanography*, 4 (1), 2.
- Adarme-Vega, T. C., Lim, D. K., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y. & Schenk, P. M. (2012).** Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 96.
- Adarme-Vega, T. C., Thomas-Hall, S. R., Lim, D. K. & Schenk P. M. (2014).** Effects of long chain fatty acid synthesis and associated gene expression in microalga *Tetraselmis* sp. *Marine drugs*, 12(6), 3381-3398.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., le Gall, L., Lynn, D. H.,**

- McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. & Spiegel, F. W. (2012). The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59, 429-514.
- Ahmed, F., Fanning, K., Netzel, M., Turner, W., Li, Y. & Schenk, P. M. (2014). Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food Chemistry*, 165, 300-306.
- Akter, R., Hossain, S. M. M., Zhe, W., Kermanee, P. & Juntawong, N. (2016). Enhanced lipid production in *Dunaliella salina* grown under high light intensity by shifting the culture from high to low nitrogen concentration. *Advances in Environmental Biology*, 10(7), 18-29.
- Alfinito, S., Iberite, M. & Fumanti, B. (1990). The algal microflora of the salt works of Tarquinia (Italy). *Hydrobiologia*, 203(3), 137-146.
- Ali, A. B., De Baere, R., Van der Auwera, G., De Wachter, R. & Van de Peer, Y. (2001). Phylogenetic relationships among algae based on complete large-subunit rRNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 737-749.
- Alsull, M., & Omar, W. M. W. (2012). Responses of *Tetraselmis* sp. and *Nannochloropsis* sp. isolated from Penang National Park coastal waters, Malaysia, to the combined influences of salinity, light and nitrogen limitation. In: *International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences* (ICCEES 2012, Singapore), 142-145.
- Álvarez, M., Zarco, J., & Lechado, J. (1989). Lipids in Microalgae. A review I. Biochemistry. *Grasas y Aceites*, 40(2), 118-145.
- Amengual, J. (2019). Bioactive Properties of Carotenoids in Human Health. *Nutrients*, 11(10), 2388.
- Andersen, R. A. (1992). Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity & Conservation*, 1(4), 267-292.
- Andersen, R. A. (Ed.) (2005). Algal culturing techniques. Elsevier, Cambridge.
- Andersen, R. A. & Kawachi, M. (2005). Traditional Microalgae isolation techniques, in: Andersen, R. A. (Ed.), Algal culturing techniques. Elsevier, Cambridge, pp. 83-100.
- Anderson, M. (2001). Method of inhibiting 5 α -reductase with astaxanthin. U.S. Patent No. 6,277,417. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Anderson, O. R., Swanberg, N. R., & Bennett, P. (1983). Assimilation of symbiont-derived photosynthates in some solitary and colonial radiolaria. *Marine Biology*, 77(3), 265-269.
- Andreotti, V., Chindris, A., Brundu, G., Vallainc, D., Francavilla, M., & García, J. (2017). Bioremediation of aquaculture wastewater from *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) with different microalgae species. *Chemistry and Ecology*, 33(8), 750-761.
- Andreotti, V., Solimeno, A., Chindris, A., Marazzi, F. & García, J. (2019). Growth of *Tetraselmis suecica* and *Dunaliella tertiolecta* in aquaculture wastewater: Numerical Simulation with the BIO_ALGAE Model. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230(3), 60.
- APHA (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd edition, Rice, E. W., Baird, R. B., Eaton, A. D. & Clesceri, L. S. . American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF), Washington, D.C., USA.
- Aquaculture development in Greek lagoons: 2. Workplan. (1987).**
<http://www.fao.org/3/S5456E/S5456E02.htm> (Accessed on 12 February, 2020).
- Arora, M. (2016). *Tetraselmis*: An introduction. *The Botanica*, 174(1), 155-175.
- Arora, M., Anil, A. C., Leliaert, F., Delany, J. & Mesbahi, E. (2013). *Tetraselmis indica* (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta), a new species isolated from salt pans in Goa, India. *European Journal of Phycology*, 48(1), 61-78.
- Arora, M., Anil, A. C., Burgess, K., Delany, J. & Mesbahi, E. (2015). Asymmetric cell division and its role in cell fate determination in the green alga *Tetraselmis indica*. *Journal of Biosciences*, 40(5), 921-927.
- Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S., & Collins, M. D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*, 13(4), 202-206.
- Assunção, P., Jaén-Molina, R., Caujapé-Castells, J., de la Jara, A., Carmona, L., Freijanes, K. & Mendoza, H. (2012). Molecular taxonomy of *Dunaliella* (Chlorophyceae), with a special focus on *D. salina*: ITS2 sequences revisited with an extensive geographical sampling. *Aquatic Biosystems*, 8(1), 2.
- Assunção, P., Jaén-Molina, R., Caujapé-Castells, J., Wolf, M., Buchheim, M. A., de la Jara, A., Freijanes, K., Carmona, L. & Mendoza, H. (2013). Phylogenetic analysis of ITS2 sequences suggests the taxonomic re-structuring of *Dunaliella viridis* (Chlorophyceae, Dunaliellales). *Phycological Research*, 61(2), 81-88.
- Atalah, E., Cruz, C. H., Izquierdo, M. S., Rosenlund, G., Caballero, M. J., Valencia, A. & Robaina, L. (2007). Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricoratum* as alternative

- source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 270(1-4), 178-185.
- Austin, B., Baudet, E. & Stobie, M. (1992).** Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *Journal of Fish Diseases*, 15(1), 55-61.
- Avramidis, P., Bekiari, V., Tsiotsis, E. & Kalimani, E. (2010).** Seasonal variation of nutrients, COD and BOD5 in Klisova lagoon channels (SE Mesolonghi–Aetoliko lagoon complex), W. Greece. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19, 3242-3248.
- Avron, M. & Ben-Amotz, A. (Eds.). (1992).** *Dunaliella*: Physiology, biochemistry and biotechnology. CRC Press, Boca Raton.
- Azma, M., Mohamad, R., Rahim, R. A. & Ariff, A. B. (2010).** Improved protocol for the preparation of *Tetraselmis suecica* axenic culture and adaptation to heterotrophic cultivation. *The Open Biotechnology Journal*, 4(1), 36-46.
- Baas-Becking, L. G. M. (1934).** Geobiologie; of inleiding tot de milieukunde. WP Van Stockum & Zoon NV.
- Bafeel, S. O., Alaklabi, A., Arif, I. A., Khan, H. A., Alfarhan, A. H., Ahamed, A., Tomas, J. & Bakir, M. A. (2012).** Molecular characterization of regionally endangered tree species *Mimusops laurifolia* (Forssk.) Friis (Sapotaceae). *International Journal of Biology*, 4(3), 29.
- Bai, V. D. M. & Krishnakumar, S. (2013).** Evaluation of antimicrobial metabolites from marine microalgae *Tetraselmis suecica* using gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 17-23.
- Barberena L, C. E. & Montoya T, H. (2009).** Culture and life strategies of the microalga *Tetraselmis contracta* (N. Carter) Butcher at the central coastal lagoons in Lima, Peru. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 30(8), 1293-1297.
- Barbone, E. & Basset, A. (2010).** Hydrological constraints to macrobenthic fauna biodiversity in transitional waters ecosystems. *Rendiconti Lincei*, 21(4), 301-314.
- Barbosa, M. J., Albrecht, M. & Wijffels, R. H. (2003).** Hydrodynamic stress and lethal events in sparged microalgae cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(1), 112-120.
- Barclay, W., Abril, R., Abril, P., Weaver, C. & Ashford, A. A. (1998).** Production of docosahexaenoic acid from microalgae and its benefits for use in animal feeds. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 83, 61-76.
- Bardach, J. E., Ryther, J. H. & McLarney, W. O. (1972).** *Aquaculture. The farming and husbandry of freshwater and marine organisms.* John Wiley & Sons, Inc., London.
- Bardavid, R. E., Khristo, P. & Oren, A. (2008).** Interrelationships between *Dunaliella* and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles*, 12(1), 5-14.
- Barnes, R. S. K. (1980).** *Coastal lagoons* (Vol. 1). Cambridge University Press, Cambridge.
- Baroli, I. & Niyogi, K. K. (2000).** Molecular genetics of xanthophyll–dependent photoprotection in green algae and plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1402), 1385-1394.
- Bartley, M. L., Boeing, W. J., Corcoran, A. A., Holguin, F. O. & Schaub, T. (2013).** Effects of salinity on growth and lipid accumulation of biofuel microalga *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *Biomass and Bioenergy*, 54, 83-88.
- Basset, A., Sabetta, L., Fonnesu, A., Mouillot, D., Do Chi, T., Viaroli, P., Giordani, G., Reizopoulou, S., Abbiati, M. & Carrada, G. C. (2006).** Typology in Mediterranean transitional waters: new challenges and perspectives. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 16(5), 441-455.
- Basset, A., Barbone, E., Elliott, M., Li, B. L., Jorgensen, S. E., Lucena-Moya, P., Pardo, I., & Mouillot, D. (2013).** A unifying approach to understanding transitional waters: fundamental properties emerging from ecotone ecosystems. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 132, 5-16.
- Bauernfeind, J. C. (1972).** Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(3), 456-473.
- Beardall, J. & Raven, J. A. (2004).** The potential effects of global climate change on microalgal photosynthesis, growth and ecology. *Phycologia*, 43(1), 26-40.
- Beardall, J. & Stojkovic, S. (2006).** Microalgae under global environmental change: implications for growth and productivity, populations and trophic flow. *ScienceAsia*, 32(s1), 001-010.
- Bec, B., Hussein-Ratrema, J., Collos, Y., Souchu, P. & Vaquer, A. (2005).** Phytoplankton seasonal dynamics in a Mediterranean coastal lagoon: emphasis on the picoeukaryote community. *Journal of Plankton Research*, 27(9), 881-894.
- Becker, W. (2004).** Microalgae in human and animal nutrition, in: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* (Vol. 312). Blackwell Science Ltd, Oxford, pp. 312-351.
- Becker, E. W. (2007).** Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25(2), 207-210.

- Becker, B., Becker, D., Kamerling, J. P. & Melkonian, M. (1991). 2-keto-sugar acids in green flagellates: A chemical marker for Prasinophycean scales. *Journal of Phycology*, 27(4), 498-504.
- Behera, R. K. & Choudhury, N. K. (2002). High irradiance induced pigment degradation and loss of photochemical activity of wheat chloroplasts. *Biologia plantarum* 45(1), 45-49.
- Bellan G. (1987). Écologie littorale Méditerranée. *Bulletin d'Écologie*, 18, 105-241.
- Ben-Amotz, A. (1995). New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. *Journal of Applied Phycology*, 7(1), 65-68.
- Ben-Amotz, A. (1996). Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 32(2), 272-275.
- Ben-Amotz, A., Polle, J. E. W. & Rao, D. V. S. (Eds.). (2019). The alga *Dunaliella*. CRC Press, Boca Raton.
- Ben-Amotz, A. & Avron, M. (1973). The role of glycerol in the osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiology*, 51(5), 875-878.
- Ben-Amotz, A., Katz, A. & Avron, M. (1982). Accumulation of β -carotene in halotolerant algae: Purification and characterization of β -carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 18, 529-537.
- Ben-Amotz, A. & Avron, M. (1983a). On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 72(3), 593-597.
- Ben-Amotz, A. & Avron, M. (1983b). Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. *Annual Review of Microbiology*, 37(1), 95-119.
- Ben-Amotz, A., Gressel, J. & Avron, M. (1987). Massive accumulation of phytoene induced by norflurazon in *Dunaliella bardawil* (Chlorophyceae) prevents recovery from photoinhibition. *Journal of Phycology*, 23(1), 176-181.
- Ben-Amotz, A., Lers, A. & Avron, M. (1988). Stereoisomers of β -carotene and phytoene in the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant physiology*, 86(4), 1286-1291.
- Ben-Amotz, A., Shaish, A. & Avron, M. (1989). Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiology*, 91(3), 1040-1043.
- Ben-Amotz, A. & Avron, M. (1990). The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends in Biotechnology*, 8, 121-126.
- Ben-Amotz, A., Yatziv, S., Sela, M., Greenberg, S., Rachmilevich, B., Shwarzman, M. & Weshler, Z. E. (1998). Effect of natural β -carotene supplementation in children exposed to radiation from the Chernobyl accident. *Radiation and Environmental Biophysics*, 37(3), 187-193.
- Benemann, J. R. (1992). Microalgae aquaculture feeds. *Journal of Applied phycology*, 4(3), 233-245.
- Benemann, J. R. (2009). Microalgae biofuels: a brief introduction. Benemann Associates and MicroBio Engineering, Walnut Creek.
- Benson, B. J., Lenters, J. D., Magnuson, J. J., Stubbs, M. T., Kratz, K., Dillon, P. J., Hecky, R. E. & Lathrop, R. C. (2000). Regional coherence of climatic and lake thermal variables of four lake districts in the Upper Great Lakes Region of North America. *Freshwater Biology*, 43, 517-527.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. & Sayers, E. W. (2017). GenBank. *Nucleic acids research*, 45(D1), D37-D42.
- Beyerinck [Beijerinck], M.W. (1890). Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Botanische Zeitung*, 47, 725-739, 741-754, 757-768, 781-785.
- Bhosale, R. A., Rajabhoj, M. P. & Chaugule, B. B. (2010). *Dunaliella salina* Teod. as a prominent source of eicosapentaenoic acid. *International Journal on Algae*, 12(2).
- Bhosale, P. (2004). Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(4), 351-361.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K. & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 148-155.
- Rasid, E. N. B. I., Mohamad, S. E., Jamaluddin, H. & Salleh, M. M. (2014). Screening factors influencing the production of astaxanthin from freshwater and marine microalgae. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4), 2160-2174.
- Bird, E. (2011). Changes on the coastline of Port Phillip Bay. The Victorian Government Department of Sustainability and Environment, Melbourne.
- Bishop, W. M. & Zubeck, H. M. (2012). Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 2(5), 1-6.
- Bodenes, P. (2017). Study of the application of pulsed electric fields (PEF) on microalgae for the extraction of neutral lipids. (Doctoral Thesis, National Tsing Hua University, Hsinchu). Retrieved from: https://www.researchgate.net/publication/317648968_Study_of_the_application_of_pulsed_electric_fields_PEF_on_microalgae_for_the_extraction_of_neutral_lipids

- Bohlin, K. (1898 '1897')**. Zur Morphologie und Biologie einzelliger Algen. Öfversigt af Kongliga [Svenska] Vetenskademiens Förhanligar, Stockholm 54. 507-529.
- Bold, H. C. (1942)**. The cultivation of algae. *Botanical Review*, 8, 69–138.
- Bondioli, P., Della Bella, L., Rivolta, G., Zittelli, G. C., Bassi, N., Rodolfi, L., Casini, D., Prussi, M., Chiaramonti, D. & Tredici, M. R. (2012)**. Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. *Bioresource Technology*, 114, 567-572.
- Bong, S. C., & Loh, S. P. (2013)**. A study of fatty acid composition and tocopherol content of lipid extracted from marine microalgae, *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis suecica*, using solvent extraction and supercritical fluid extraction. *International Food Research Journal*, 20(2).
- Booton, G. C., Kaufman, L., Chandler, M., Oguto-Ohwayo, R., Duan, W. & Fuerst, P. A. (1999)**. Evolution of the ribosomal RNA internal transcribed spacer one (ITS-1) in cichlid fishes of the Lake Victoria region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11(2), 273-282.
- Borghini, F., Colacevich, A., Bergamino, N., Micarelli, P., Dattilo, A. M., Focardi, S., Focardi, S. & Loiselle, S. A. (2009)**. The microalgae *Tetraselmis suecica* in mesocosms under different light regimes. *Chemistry and Ecology*, 25(5), 345-357.
- Borowitzka L.J. (1981)**. The microflora, in: Williams W.D. (Ed.), Salt Lakes. Developments in Hydrobiology (vol 5). Springer, Dordrecht, pp. 33-46.
- Borowitzka, L. J., & Brown, A. D. (1974)**. The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga, *Dunaliella*. *Archives of Microbiology*, 96(1), 37-52.
- Borowitzka, L. J., Moulton, T. P. & Borowitzka, M. A. (1984)**. The mass culture of *Dunaliella salina* for fine chemicals: from laboratory to pilot plant, in: Eleventh International Seaweed Symposium, Springer, Dordrecht, pp. 115-121.
- Borowitzka, M. A. (1990)**. The mass culture of *Dunaliella salina*, in: Technical Resource Papers Regional Workshop on the Culture and Utilization of Seaweeds (Vol. 2). <http://www.fao.org/3/ab728e/AB728E06.htm> (Accessed on 8 March, 2020).
- Borowitzka, M. A. (1995)**. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, 7(1), 3-15.
- Borowitzka, M. A. (1999)**. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters, in Progress in industrial microbiology (Vol. 35). Elsevier, Cambridge, pp. 313-321.
- Borowitzka, M. A. (2013)**. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743-756.
- Borowitzka, M. A. (2016)**. Systematics, taxonomy and species names: Do they matter?, in: Borowitzka, M. A., Beardall, J. & Raven, J. A. (Eds.), The physiology of Microalgae. Springer, Cham, pp. 655-681.
- Borowitzka, M. A. (2018)**. Biology of Microalgae, in: Levine, I. A. & Fleurence, J. (Eds.), Microalgae in Health and Disease Prevention. Academic Press.
- Borowitzka, M. A. & Borowitzka, L. J. (Eds.). (1988)**. Micro-algal biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J. & Kessly, D. (1990)**. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, 2(2), 111-119.
- Borowitzka, M. A., Huisman, J. M. & Osborn, A. (1991)**. Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* 1. Effects of nutrients on growth and cell type. *Journal of Applied Phycology*, 3(4), 295-304.
- Borowitzka, M. A. & Huisman, J. M. (1993)**. The ecology of *Dunaliella salina* (Chlorophyceae, Volvocales): Effect of environmental conditions on aplanospore formation. *Botanica Marina*, 36, 233–243
- Borowitzka, M. A. & Siva, C. J. (2007)**. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 567-590.
- Boswell, K., Koskelo, E. K., Carl, L., Glaza, S., Hensen, D. J., Williams, K. D. & Kyle, D. J. (1996)**. Preclinical evaluation of single-cell oils that are highly enriched with arachidonic acid and docosahexaenoic acid. *Food and Chemical Toxicology*, 34(7), 585-593.
- Boussiba, S. (2000)**. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*, 108(2), 111-117.
- Boussiba, S. & Vonshak, A. (1991)**. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant and cell Physiology*, 32(7), 1077-1082.
- Boutaiba, S., Hacene, H., Bidle, K. A. & Maupin-Furlow, J. A. (2011)**. Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameur and Himalatt salt lakes of the Algerian Sahara. *Journal of Arid Environments*, 75(10), 909-916.
- Brady, C. W. (2008)**. Dilution Techniques and Calculations. (Manual. University of Wisconsin, Whitewater). <http://www2.hawaii.edu/~johnb/micro/m140/syllabus/week/handouts/m140.7.1.htm> (Accessed on 9 March, 2020).

- Brand, L. E. (1982).** Genetic variability and spatial patterns of genetic differentiation in the reproductive rates of the marine coccolithophores *Emiliania huxleyi* and *Gephyrocapsa oceanica*. *Limnology and Oceanography*, 27(2), 236-245.
- Brand, L. E. (1984).** The salinity tolerance of forty-six marine phytoplankton isolates. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 18(5), 543-556.
- Brand, L. E., Guillard, R. R. & Murphy, L. S. (1981a).** A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. *Journal of Plankton Research*, 3(2), 193-201.
- Brand, L. E., Murphy, L. S. & Guillard, R. R. L. (1981b).** Genetic variability and differentiation in the temperature niche component of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Marine Biology*, 62(2-3), 103-110.
- Brock, T. D. (1975).** Salinity and the ecology of *Dunaliella* from Great Salt Lake. *Microbiology*, 89(2), 285-292.
- Brown, D. (2002).** Structure and function of membrane rafts. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(6-7), 433-437.
- Brown, M. R. (1991).** The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 145(1), 79-99.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkmann, J.K. & Dunstan, G.A. (1997).** Nutrition properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151, 315-331.
- Buchheim, M. A., Müller, T. & Wolf, M. (2017).** 18S rDNA sequence-structure phylogeny of the Chlorophyceae with special emphasis on the Sphaeropleales. *Plant Gene*, 10, 45-50.
- Büdel, B. (2011).** Eukaryotic algae, in Lüttge, U., Beck, E., Bartels, D. (Eds), *Plant desiccation tolerance*. Springer, Berlin, pp. 45-63.
- Butcher, R.W. (1952).** Contributions to knowledge of the smaller marine algae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 31, 175-191.
- Butcher, R. W. (1959).** An introductory account of the smaller algae of British coastal waters Part I. Introduction and Chlorophyceae. *Fisheries Investigations*, 4, 1-74.
- Byrd, S. M., Burkholder, J. M. & Zimba, P. V. (2017).** Environmental stressors and lipid production by *Dunaliella* spp. I. Salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 487, 18-32.
- Cameron, H., Mata, M. T. & Riquelme, C. (2018).** The effect of heavy metals on the viability of *Tetraselmis marina* AC16-MESO and an evaluation of the potential use of this microalga in bioremediation. *PeerJ*, 6, e5295.
- Campillo, S., García-Roger, E. M., Carmona, M. J., Gómez, A. & Serra, M. (2009).** Selection on life-history traits and genetic population divergence in rotifers. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(12), 2542-2553.
- Cañavate, J. P., Prieto, A., Zerolo, R., Solé, M., Sarasquete, C. & Fernández-Díaz, C. (2007).** Effects of light intensity and addition of carotene rich *Dunaliella salina* live cells on growth and antioxidant activity of *Solea senegalensis* Kaup (1858) larval and metamorphic stages. *Journal of Fish Biology*, 71(3), 781-794.
- Cañavate, J. P., Armada, I., Ríos, J. L. & Hachero-Cruzado, I. (2016).** Exploring occurrence and molecular diversity of betaine lipids across taxonomy of marine microalgae. *Phytochemistry*, 124, 68-78.
- Carballo-Cárdenas, E. C., Tuan, P. M., Janssen, M. & Wijffels, R. H. (2003).** Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), 139-147.
- Cardoso, L. A., Karp, S. G., Vendruscolo, F., Kanno, K. Y., Zoz, L. I. & Carvalho, J. C. (2017).** Biotechnological production of carotenoids and their applications in food and pharmaceutical products, in: Cvetović, D. J. & Nikolić, G.S. (Eds.), *Carotenoids*. InTechOpen, Rijeka, p. 125.
- Cardozo, K. H., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo, P. & Pinto, E. (2007).** Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1-2), 60-78.
- Carneiro, M., Pôjo, V., Malcata, F. X. & Otero, A. (2019).** Lipid accumulation in selected *Tetraselmis* strains. *Journal of Applied Phycology*, 31(5), 2845-2853.
- Caroppo, C., Roselli, L. & Di Leo, A. (2018).** Hydrological conditions and phytoplankton community in the Lesina lagoon (southern Adriatic Sea, Mediterranean). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(2), 1784-1799.
- Carter, N. (1937).** New or interesting algae from brackish water. *Archiv für Protistenkunde*, 90, 1-68.
- Carvalho, A. P., Meireles, L. A. & Malcata, F. X. (2006).** Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology progress*, 22(6), 1490-1506.
- Carvalho, J. C., Magalhães Jr, A. I., de Melo Pereira, G. V., Medeiros, A. B. P., Sydney, E. B., Rodrigues, C., Aulestia, D. T. M, Vandenberghe, L. P. S., Soccol, V. T. & Soccol, C. R. (2020).**

- Microalgal biomass pretreatment for integrated processing into biofuels, food, and feed. *Bioresource Technology*, 122719.
- Castenmiller, J. J. & West, C. E. (1998).** Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition*, 18(1), 19-38.
- Çelekli, A. & Dönmez, G. (2006).** Effect of pH, light intensity, salt and nitrogen concentrations on growth and β -carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22 (2), 183-189.
- Chamalaki, A., Gianni, A., Kehayias, G., Zacharias, I., Tsiamis, G. & Bourtzis, K. (2014).** Bacterial diversity and hydrography of Etoliko, an anoxic semi-enclosed coastal basin in Western Greece. *Annals of Microbiology*, 64(2), 661-670.
- Chapman, R. L., Buchheim, M. A., Delwiche, C. F., Friedl, T., Huss, V. A., Karol, K. G., Lewis, L. A., Manhart, J., McCourt, R. M., Olsen, J. L. & Waters, D. A. (1998).** Molecular systematics of the green algae, in: Soltis, D. E., Soltis, P. S. & Doyle, J. J. (Eds.), *Molecular systematics of plants II*. Springer, Boston, pp. 508-540.
- Chappell, D. F., Hoops, H. J. & Floyd, G. L. (1989).** Strip-like covering revealed on "wall-less" *Asteromonas* (chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 25(1), 197-199.
- Chardard, R. (1987).** L'infrastructure du plasmalemme de *Dunaliella bioculata* (algue verte). Mise en évidence d'un cell coat; essai de localisation des charges négatives. *Cryptogamie. Algologie*, 8(3), 173-189.
- Chardard, R. (1990).** Further observations on the structure and composition of the cell-coat of *Dunaliella bioculata* (green-alga). *Cryptogamie Algologie*, 11(2), 137-152.
- Chase, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G., Morgan, D., Les, D. H., Mishler, B. D., Duvall, M. R., Price, R., Hills, H. G., Qiu, Y. L., Kron, K. A., Rettig, J. H., Conti, E., Palmer, J. D., Manhart, J. R., Sytsma, K. J., Michaels, H. J., Kress, W. J., Karol, K. G., Clark, W. D., Hedren, M., Gaut, B. S., Jansen, R. K., Kim, K., Wimpee, C. F., Smith, J. F., Furnier, G. R., Strauss, S. H., Xiang, Q., Plunkett, G. M., Soltis, P. S., Swensen, S. W., Williams, S. E., Gadek, P. A., Quinn, C. J., Eguarte, L. E., Golenberg, E., Learn, G. H. Jr, Graham, S., Barrett, S. C. H., Dayanandan, S. & Albert, V. A. (1993).** Phylogenetics of seed plants : an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene rbcL. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80, 528-580.
- Cheirsilp, B. & Torpee, S. (2012).** Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, 110, 510-516.
- Chen, B., Wan, C., Mehmood, M. A., Chang, J. S., Bai, F., & Zhao, X. (2017).** Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—A review. *Bioresource technology*, 244, 1198-1206.
- Chen, C. Y., Chen, Y. C., Huang, H. C., Huang, C. C., Lee, W. L. & Chang, J. S. (2013).** Engineering strategies for enhancing the production of eicosapentaenoic acid (EPA) from an isolated microalga *Nannochloropsis oceanica* CY2. *Bioresource Technology*, 147, 160-167.
- Chen, H., & Jiang, J. G. (2009).** Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *Journal of Cellular Physiology*, 219(2), 251-258.
- Chen, Y., Tang, X., Kapoore, R. V., Xu, C. & Vaidyanathan, S. (2015).** Influence of nutrient status on the accumulation of biomass and lipid in *Nannochloropsis salina* and *Dunaliella salina*. *Energy Conversion and Management*, 106, 61-72.
- Cheng, J., Huang, Y., Feng, J., Sun, J., Zhou, J., & Cen, K. (2013).** Improving CO₂ fixation efficiency by optimizing *Chlorella* PY-ZU1 culture conditions in sequential bioreactors. *Bioresource Technology*, 144, 321-327.
- Chiaromonti, D., Prussi, M., Casini, D., Tredici, M. R., Rodolfi, L., Bassi, N., Zittelli, G. C. & Bondioli, P. (2013).** Review of energy balance in raceway ponds for microalgae cultivation: re-thinking a traditional system is possible. *Applied Energy*, 102, 101-111.
- Chisti, Y. (2007).** Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.
- Chitlaru, E., & Pick, U. (1991).** Regulation of glycerol synthesis in response to osmotic changes in *Dunaliella*. *Plant Physiology*, 96(1), 50-60.
- Chiu, C. C., Su, K. P., Cheng, T. C., Liu, H. C., Chang, C. J., Dewey, M. E., Stewart, R. & Huang, S. Y. (2008).** The effects of omega-3 fatty acids monotherapy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a preliminary randomized double-blind placebo-controlled study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(6), 1538-1544.
- Cho, K., Lee, C. H., Ko, K., Lee, Y. J., Kim, K. N., Kim, M. K., Chung, Y. H., Kim, D., Yeo, I. K. & Oda, T. (2016).** Use of phenol-induced oxidative stress acclimation to stimulate cell growth and biodiesel production by the oceanic microalga *Dunaliella salina*. *Algal Research*, 17, 61-66.
- Choi, S. K., Harada, H., Matsuda, S., & Misawa, N. (2007).** Characterization of two β -carotene ketolases, CrtO and CrtW, by complementation analysis in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(6), 1335-1341.

- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneri, P. (2013).** Functional properties of carotenoids originating from algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(1), 5-11.
- Christensen, T. (1967).** Two new families and some new names and combinations in the algae. *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 15(1), 91-94.
- Christodoulou, M., Meletiou-Christou, M. S., Parmakelis, A., Economou-Amilli, A. & Pantazidou, A. (2015).** Further findings from Daveli Cave (Attica, Greece) enhancing the establishment of the genus *Oculatella* (Pseudanabaenaceae, Cyanobacteria). *Phytotaxa*, 202(3), 169-184.
- Chuecas, L. & Riley, J. P. (1969).** Component fatty acids of the total lipids of some marine phytoplankton. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 49(1), 97-116.
- Cid, A., Abalde, J. & Herrero, C. (1992).** High yield mixotrophic cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher (Prasinophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 4(1), 31-37.
- Cifuentes, A. S., González, M., Conejeros, M., Dellarossa, V., & Parra, O. (1992).** Growth and carotenogenesis in eight strains of *Dunaliella salina* Teodoresco from Chile. *Journal of Applied Phycology*, 4(2), 111.
- Cifuentes, A. S., Gonzalez, M. A. & Parra, O. O. (1996).** The effect of salinity on the growth and carotenogenesis in two Chilean strains of *Dunaliella salina* Teodoresco. *Biological Research*, 29, 227-236.
- Cifuentes, A. S., González, M. A., Inostroza, I. & Aguilera, A. (2001).** Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae): growth and pigment content across a salinity gradient. *Journal of Phycology*, 37(2), 334-344.
- Clarke, K. R. & Gorley, R. N. (2006).** PRIMER v6: user manual/tutorial, Primer E: Plymouth. Plymouth Marine Laboratory, Plymouth, UK.
- Cleve, P.T. (1873).** Examination of diatoms found on the surface of the Sea of Java. *Bihang till Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar* 1(11), 1-13.
- Cloern, J. E., Abreu, P. C., Carstensen, J., Chauvaud, L., Elmgren, R., Grall, J., Greening, H., Johansson, J. O. R., Kahru, M., Sherwood, E. T., Xu, J. & Yin K. (2016).** Human activities and climate variability drive fast-paced change across the world's estuarine-coastal ecosystems. *Global Change Biology*, 22(2), 513-529.
- Cobbs, M. E. (2015).** Novel Aggregating Growth Habit in *Dunaliella* spp. (Chlorophyta, Dunaliellales) (Master of Science Dissertation, Oklahoma State University). Retrieved from: <https://shareok.org/handle/11244/45148>
- Cocquyt, E., Gile, G. H., Leliaert, F., Verbruggen, H., Keeling, P. J. & De Clerck, O. (2010).** Complex phylogenetic distribution of a non-canonical genetic code in green algae. *BMC evolutionary biology*, 10(1), 327.
- Coesel, S. N., Baumgartner, A. C., Teles, L. M., Ramos, A. A., Henriques, N. M., Cancela, L. & Varela, J. C. S. (2008).** Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for Psy and Pds steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) exposed to high light and salt stress. *Marine Biotechnology*, 10(5), 602.
- Cohen, Z., Norman, H. A. & Heimer, Y. M. (1995).** Microalgae as a Source of ω 3 Fatty Acids¹, in: Simopoulos, A. (Ed.), *Plants in human nutrition* (Vol. 77). Karger Publishers, Basel, , pp. 1-31.
- Cohn, F. (1850).** Nachträge zur Naturgeschichte des *Protococcus pluvialis* Kützing (*Haematococcus pluvialis* Flotow). *Nov. Act. Leop. Carol.* 22(2), 605–764.
- Colegrave, N., Kaltz, O. & Bell, G. (2002).** The ecology and genetics of fitness in *Chlamydomonas*. VIII. The dynamics of adaptation to novel environments after a single episode of sex. *Evolution*, 56(1), 14-21.
- Collins, S. & Bell, G. (2004).** Phenotypic consequences of 1,000 generations of selection at elevated CO₂ in a green alga. *Nature*, 431(7008), 566-569.
- Conides, A. J. & Parpoura, A. R. (1997).** A study of oil pollution effects on the ecology of a coastal lake ecosystem. *Environmentalist*, 17(4), 297-306.
- Connor, W. E. (2000).** Importance of n- 3 fatty acids in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(1), 171S-175S.
- Cooper GM. (2000).** *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland.
- Copeland, H. F. (1956).** *The classification of lower organisms*. Pacific Books, Palo Alto.
- Cordero, B. F., Obratsova, I., Couso, I., Leon, R., Vargas, M. A. & Rodriguez, H. (2011).** Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. *Marine drugs*, 9(9), 1607-1624.
- Costa, D. F. A., Quigley, S. P., Isherwood, P., McLennan, S. R. & Poppi, D. P. (2016).** Supplementation of cattle fed tropical grasses with microalgae increases microbial protein production and average daily gain. *Journal of Animal Science*, 94(5), 2047-2058.
- Costache, T. A., Fernández, F. G. A., Morales, M. M., Fernández-Sevilla, J. M., Stamatini, I. & Molina, E. (2013).** Comprehensive model of microalgae photosynthesis rate as a function of culture conditions in photobioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(17), 7627-7637.

- Costas, E., Nieto, B., Lopez-Rodas, V., Salgado, C. & Toro, M. (1998).** Adaptation to competition by new mutation in clones of *Alexandrium minutum*. *Evolution*, 52(2), 610-613.
- Cowan, A. K., Rose, P. D., & Horne, L. G. (1992).** *Dunaliella salina*: a model system for studying the response of plant cells to stress. *Journal of Experimental Botany*, 43(12), 1535-1547.
- Cowan, A. K., Rose, P. D. & Horne, L. G. (1992).** *Dunaliella salina*: a model system for studying the response of plant cells to stress. *Journal of Experimental Botany*, 43(12), 1535-1547.
- Coyne, J. A. & Orr, H. A. (2004).** Speciation. Sinauer Associates, Sunderland.
- Cullum, A. J., Bennett, A. F. & Lenski, R. E. (2001).** Evolutionary adaptation to temperature. IX. Preadaptation to novel stressful environments of *Escherichia coli* adapted to high temperature. *Evolution*, 55(11), 2194-2202.
- Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP). (2014).** UK, <https://www.ccap.ac.uk/> (Accessed on 10 March, 2020).
- Curtain, C. (2000).** Plant Biotechnology- The growth of Australia's algal β -carotene industry. *Australasian Biotechnology*, 10(3), 19-23.
- Custódio, L., Soares, F., Pereira, H., Barreira, L., Vizetto-Duarte, C., Rodrigues, M. J., Rauter, A. P., Alberício, F. & Varela, J. (2014).** Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp.: possible application in the pharmaceutical and functional food industries. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 151-161.
- Da Costa Cardoso, L. A., Kanno, K. Y. F. & Karp, S. G. (2017).** Microbial production of carotenoids: A review. *African Journal of Biotechnology*, 16, 139-146.
- D'Adamo, S., Jinkerson, R. E., Boyd, E. S., Brown, S. L., Baxter, B. K., Peters, J. W. & Posewitz, M. C. (2014).** Evolutionary and biotechnological implications of robust hydrogenase activity in halophilic strains of *Tetraselmis*. *PloS one*, 9(1).
- Dammak, M., Hadrach, B., Miladi, R., Barkallah, M., Hentati, F., Hachicha, R., Laroche, C., Michaud, P., Fendri, I. & Abdelkafi, S. (2017).** Effects of nutritional conditions on growth and biochemical composition of *Tetraselmis* sp. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 41.
- Danquah, M. K., Harun, R., Halim, R. & Forde, G. M. (2010).** Cultivation medium design via elemental balancing for *Tetraselmis suecica*. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 24(3), 361-369.
- Darienko, T., Gustavs, L., Eggert, A., Wolf, W., & Pröschold, T. (2015).** Evaluating the species boundaries of green microalgae (*Coccomyxa*, Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. *PloS one*, 10(6).
- Da Silva Ferreira, V. & Sant' Anna, C. (2017).** Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 20.
- Daugbjerg, N. & Andersen, R. A. (1997).** A molecular phylogeny of the heterokont algae based on analyses of chloroplast-encoded *rbcL* sequence data. *Journal of Phycology*, 33(6), 1031-1041.
- Davis, J. S. (2000).** Structure, function, and management of the biological system for seasonal solar saltworks. *Global NEST Journal*, 2(3), 217-226.
- Davis, J. S. & Giordano, M. (1995).** Biological and physical events involved in the origin, effects, and control of organic matter in solar saltworks. *International Journal of Salt Lake Research*, 4(4), 335-347.
- Day, J. G., Pröschold, T., Friedl, T., Lorenz, M. & Silva, P. C. (2010).** Conservation of microalgal type material: Approaches needed for 21st century science. *Taxon*, 59(1), 3-6.
- De Boer, M. K., Koolmees, E. M., Vrieling, E. G., Breeman, A. M. & van Rijssel, M. (2005).** Temperature responses of three *Fibrocapsa japonica* strains (Raphidophyceae) from different climate regions. *Journal of Plankton Research*, 27(1), 47-60.
- Decelle, J., Colin, S. & Foster, R. A. (2015).** Photosymbiosis in marine planktonic protists, in: Ohtsuka, S., Suzuki, T., Horiguchi, T., Suzuki, N. & Not, F. (Eds), *Marine protists*. Springer, Tokyo, pp. 465-500.
- De Clerck, O., Guiry, M. D., Leliaert, F., Samyn, Y. & Verbruggen, H. (2013).** Algal taxonomy: a road to nowhere? *Journal of Phycology*, 49(2), 215-225.
- De Jesus Raposo, M. F., de Morais, R. M. S. C. & de Morais, A. M. M. B. (2013).** Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*, 93(15), 479-486.
- De Jesus Raposo, M. F., De Morais, A. M. B. & De Morais, R. M. S. C. (2015).** Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine Drugs*, 13(5), 2967-3028.
- De la Noue, J. & de Pauw, N. (1988).** The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnology advances*, 6(4), 725-770.
- De Morais, M. G., Vaz, B. D. S., de Morais, E. G. & Costa, J. A. V. (2015).** Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *BioMed Research International*, 2015.
- Deng, R. & Chow, T. J. (2010).** Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics*, 28(4), e33-e45.

- De Pauw, N., Morales, J. & Persoone, G. (1984).** Mass culture of microalgae in aquaculture systems: progress and constraints. *Hydrobiologia*, 116(1), 121-134.
- De Pauw, N. & Persoone, G. (1988).** Microalgae for aquaculture, in: Borowitzka, M. A. & Borowitzka, J. L. (Eds), *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 197.
- De Pinto, M. C., Locato, V. & De Gara, L. (2012).** Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), 234-244.
- Devassy, V. P. & Goes, J. I. (1988).** Phytoplankton community structure and succession in a tropical estuarine complex (central west coast of India). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 27(6), 671-685.
- Dittami, S. M., Duboscq-Bidot, L., Perennou, M., Gobet, A., Corre, E., Boyen, C. & Tonon, T. (2016).** Host-microbe interactions as a driver of acclimation to salinity gradients in brown algal cultures. *The ISME Journal*, 10(1), 51-63.
- Dogaris, I., Welch, M., Meiser, A., Walmsley, L. & Philippidis, G. (2015).** A novel horizontal photobioreactor for high-density cultivation of microalgae. *Bioresource Technology*, 198, 316-324.
- Dolapsakis, N. P. (1997).** Primary resources and aquaculture development beyond the year 2000. (Master of Science Thesis, University of Stirling, Stirling), 270 p.
- Dolapsakis, N. P., Tafas, T., Abatzopoulos, T. J., Ziller, S. & Economou-Amilli, A. (2005).** Abundance and growth response of microalgae at Megalon Embolon solar saltworks in northern Greece: An aquaculture prospect. *Journal of Applied Phycology*, 17(1), 39-49.
- Domínguez-Espinosa, R. M. & Webb, C. (2003).** Submerged fermentation in wheat substrates for production of *Monascus* pigments. *World Journal of Microbiology and biotechnology*, 19(3), 329-336.
- Dominguez, H. (Ed.). (2013).** Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals. Elsevier, Amsterdam.
- Domonkos, I., Kis, M., Gombos, Z. & Ughy, B. (2013).** Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 539-561.
- Domozych, D. S., Stewart, K. D. & Mattox, K. R. (1981).** Development of the cell wall in *Tetraselmis*: role of the Golgi apparatus and extracellular wall assembly. *Journal of Cell Science*, 52(1), 351-371.
- Dortch, Q., Clayton, J. R., Thoreson, S. S., Bressler, S. L. & Ahmed, S. I. (1982).** Response of marine phytoplankton to nitrogen deficiency: decreased nitrate uptake vs enhanced ammonium uptake. *Marine Biology*, 70(1), 13-19.
- Dos Santos, A. L., Gourvil, P., Tragin, M., Noël, M. H., Decelle, J., Romac, S. & Vaultot, D. (2017).** Diversity and oceanic distribution of prasinophytes clade VII, the dominant group of green algae in oceanic waters. *The ISME Journal*, 11(2), 512-528.
- Dougherty, R. C., Strain, H. H., Svec, W. A., Uphaus, R. A. & Katz, J. J. (1970).** Structure, properties, and distribution of chlorophyll c. *Journal of the American Chemical Society*, 92(9), 2826-2833.
- Doughman, S. D., Krupanidhi, S. & Sanjeevi, C. B. (2007).** Omega-3 fatty acids for nutrition and medicine: considering microalgae oil as a vegetarian source of EPA and DHA. *Current Diabetes Reviews*, 3(3), 198-203.
- Doyle, J. J. L. & Doyle, J. L. (1987).** Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochemical Bulletin*, 19(11), 11-15.
- Droop, M. R. (1954).** Conditions governing haematochrome formation and loss in the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow. *Archiv für Mikrobiologie*, 20(4), 391-397.
- Drummond, C. S., Hall, J., Karol, K. G., Delwiche, C. F. & McCourt, R. M. (2005).** Phylogeny of *Spirogyra* and *Sirogonium* (Zygnematophyceae) based on rbcL sequence data. *Journal of Phycology*, 41(5), 1055-1064.
- D'Souza, F. M. & Kelly, G. J. (2000).** Effects of a diet of a nitrogen-limited alga (*Tetraselmis suecica*) on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) larvae. *Aquaculture*, 181(3-4), 311-329.
- Duan, S. S., Guo, Y. F., Liu, Z. Q., Li, A. F., Xu, N., Zhang, Y. N. & Chen, J. (2003).** Over-compensatory growth of *Tetraselmis tetrethelae* under the stress of nutrients deficiency. *Acta Ecologica Sinica*, 7.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Murthy, K. N. C. & Ravishankar, G. A. (2005).** Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 389-406.
- Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Jeffrey, S. W. & Barrett, S. M. (1992).** Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 2. Lipid classes and fatty acids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 161(1), 115-134.
- Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M. & Garland, C. D. (1993).** Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Journal of Applied Phycology*, 5(1), 71-83.
- Dunstan, G. A., Brown, M. R. & Volkman, J. K. (2005).** Cryptophyceae and Rhodophyceae; chemotaxonomy, phylogeny, and application. *Phytochemistry*, 66(21), 2557-2570.

- Dykhuizen, D. E. (1990).** Experimental studies of natural selection in bacteria. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21(1), 373-398.
- Ebenezer, V. & Ki, J. S. (2013a).** Quantification of toxic effects of the herbicide metolachlor on marine microalgae *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae), *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae), and *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae). *Journal of Microbiology*, 51(1), 136-139.
- Ebenezer, V. & Ki, J. S. (2013b).** Quantification of the sub-lethal toxicity of metals and endocrine-disrupting chemicals to the marine green microalga *Tetraselmis suecica*. *Aquatic Sciences*, 16, 187-194.
- Egeland, E. S., Eikrem, W., Throndsen, J., Wilhelm, C., Zapata, M. & Liaen-Jensen, S. (1995).** Carotenoids from further prasinophytes. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23(7-8), 747-755.
- Ehrenberg, C.G. (1834).** Dritter Beitrag zur Erkenntniss grosser Organisation in der Richtung des kleinsten Raumes. *Abhandlungen der Königl. Akademie der Wissenschaften zu Berlin 1833*, 145-336.
- Ehrenberg, C.G. (1844).** Einige vorläufige Resultate seiner Untersuchungen der ihm von der Südpolreise des Captain Ross, so wie von den Herren Schayer und Darwin zugekommenen Materialien über das Verhalten des kleinsten Lebens in den Ozeanen und den grössten bisher zugänglichen Tiefen des Weltmeeres. Bericht über die zur Bekanntmachung Geeigneten Verhandlungen Der Königl. Preuss. Akademie Der Wissenschaften zu Berlin 1844, 182-207.
- Einali, A. (2018).** The induction of salt stress tolerance by propyl gallate treatment in green microalga *Dunaliella bardawil*, through enhancing ascorbate pool and antioxidant enzymes activity. *Protoplasma*, 255(2), 601-611.
- El-Kassas, H. Y., Nassar, M. Z. A. & Gharib, S. M. (2016).** Study of phytoplankton in a natural hypersaline lagoon in a desert area (Bardawil Lagoon in Northern Sinai, Egypt). *Rendiconti Lincei*, 27(3), 483-493.
- Elena, S. F. & Lenski, R. E. (2003).** Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 4(6), 457-469.
- Elliott, M. & V. Quintino, (2007).** The estuarine quality paradox, environmental homeostasis and the difficulty of detecting anthropogenic stress in naturally stressed areas. *Marine Pollution Bulletin* 54(6):640-645.
- Eman M, F. & El, D. M. (2013).** Fatty acids composition and biodiesel characterization of *Dunaliella salina*. *Journal of Water Resource and Protection*, 5(9),894-899.
- Emeish, S. (2012).** Production of natural β -carotene from *Dunaliella* living in the Dead Sea. *Jordan Journal of Earth and Environmental Sciences*, 4(2), 23-27.
- Erkelens, M., Ball, A. S. & Lewis, D. M. (2015).** The application of activated carbon for the treatment and reuse of the aqueous phase derived from the hydrothermal liquefaction of a halophytic *Tetraselmis* sp. *Bioresource Technology*, 182, 378-382.
- Ershad, G. A., Jazini, M., Fashandi, H. & Shariati, M. (2019).** A cell retention system composed of cellulose acetate hollow fiber membranes for cultivation of *Dunaliella salina* in a helical photobioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(7), 2148-2157.
- Eskra, J. N., Kuiper, J. W., Walden, P. D., Bosland, M. C. & Özten, N. (2017).** Interactive effects of 9-cis-retinoic acid and androgen on proliferation, differentiation, and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *European Journal of Cancer Prevention*, 26(1), 71-77.
- Ettl, H. (1983).** Chlorophyta I. Phytomonadina. Subwasserflora Von Mitteleuropa, 9. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 95-720.
- Fabregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. & Abalde, J. (1985).** Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butcher) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 49(3-4), 231-244.
- Fábregas, J., Otero, A., Morales, E., Cordero, B. & Patiño, M. (1996).** *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*. *Aquaculture*, 143(2), 197-204.
- Fábregas, J., Otero, A., Domínguez, A. & Patiño, M. (2001).** Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *Marine biotechnology*, 3(3), 256-263.
- Famintzin, A. (1871).** Die anorganischen Salze als ausgezeichnetes Hilfsmittel zum Studium der Entwicklung niederer chlorophyllhaltiger Organismen. *Bulletin de l'Académie Impériale des Sciences de St.Pétersbourg*. 17, 31-70.
- Fang, L., Leliaert, F., Novis, P. M., Zhang, Z., Zhu, H., Liu, G., Penny, D. & Zhong, B. (2018).** Improving phylogenetic inference of core Chlorophyta using chloroplast sequences with strong phylogenetic signals and heterogeneous models. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 127, 248-255.
- Farhat, N., Rabhi, M., Falleh, H., Jouini, J., Abdelly, C. & Smaoui, A. (2011).** Optimization of salt concentrations for a higher carotenoid production in *Dunaliella salina* (chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 47(5), 1072-1077.

- Faure, H., Fayol, V., Galabert, C., Grolier, P., Le Moel, G., Steghens, J. P., Van Kappel, A. & Nabet, F. (1999).** Carotenoids: 1. Metabolism and physiology. *Annales de Biologie Clinique*, 57(2), 169-83.
- Fawley, M. W., Yun, Y. & Qin, M. (2000).** Phylogenetic analyses of 18S rDNA sequences reveal a new coccoid lineage of the Prasinophyceae (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 36(2), 387-393.
- Fazeli, M. R., Tofighi, H., Samadi, N. & Jamalifar, H. (2006).** Effects of salinity on β -carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. *Bioresource Technology*, 97(18), 2453-2456.
- Felix, E.A. & Rushforth, S.R. (1979)** The algal flora of the Great Salt Lake, Utah, U.S.A. *Nova Hedwigia* 31, 305–312.
- Felizardo, P., Correia, M. J. N., Raposo, I., Mendes, J. F., Berkemeier, R. & Bordado, J. M. (2006).** Production of biodiesel from waste frying oils. *Waste Management*, 26(5), 487-494.
- Felsenstein, J. (1974).** The evolutionary advantage of recombination. *Genetics*, 78(2), 737-756.
- Feng, S., Li, X., Xu, Z. & Qi, J. (2014).** *Dunaliella salina* as a novel host for the production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(10), 4293-4300.
- Ferreira J.G., Wolff W.J., Simas T.C. & Bricker S.B. (2005).** Does biodiversity of estuarine phytoplankton depend on hydrology? *Ecological Modelling* 187, 513-523.
- Figuroa, F. L., Niell, F. X., Figueiras, F. G. & Villarino, M. L. (1998).** Diel migration of phytoplankton and spectral light field in the Ria de Vigo (NW Spain). *Marine Biology*, 130(3), 491-499.
- Figuroa, F. L., Korbee, N., Abdala-Díaz, R., Álvarez-Gómez, F., Gómez-Pinchetti, J. L. & Ación, F. G. (2018).** Growing algal biomass using wastes, in: Häder, D. P. & Erzinger, G. S. (Eds), *Bioassays*. Elsevier, Cambridge, pp. 99-117.
- Finkel, Z. V., Irwin, A. J. & Schofield, O. (2004).** Resource limitation alters the 3/4 size scaling of metabolic rates in phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 273, 269-279.
- Fitzpatrick, F. A., Waite, I. R., D'arconte, P. J., Meador, M. R., Mauplin, M. A. & Gurtz, M. E. (1998).** Revised methods for characterizing stream habitat in the National Water-Quality Assessment Program. *U. S. Geological Survey Water Resources Investigations Report*, 98-4052, 67 pp.
- Flores-Moya, A., Rouco, M., García-Sánchez, M. J., García-Balboa, C., González, R., Costas, E. & López-Rodas, V. (2012).** Effects of adaptation, chance, and history on the evolution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* under selection of increased temperature and acidification. *Ecology and Evolution*, 2(6), 1251-1259.
- Folke C., Carpenter S., Walker B., Scheffer M., Elmqvist T., Gunderson L. & Holling C.S. (2004).** Regime shifts, resilience and biodiversity in ecosystem management. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 35, 557-581.
- Fon-Sing, S. & Borowitzka, M. A. (2016).** Isolation and screening of euryhaline *Tetraselmis* spp. suitable for large-scale outdoor culture in hypersaline media for biofuels. *Journal of Applied Phycology*, 28(1), 1-14.
- Foyer, C. H. (2018).** Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*, 154, 134-142.
- Frankhauser D. (1983).** Spreading Technique for Plating Bacteria.
<https://fankhauserblog.wordpress.com/1983/02/> (Accessed on 9 March, 2020)
- Francisco, E. C., Neves, D. B., Jacob-Lopes, E. & Franco, T. T. (2010).** Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(3), 395-403.
- Freshwater, D. W., Fredericq, S., Butler, B. S., Hommersand, M. H. & Chase, M. W. (1994).** A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid rbcL. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), 7281-7285.
- Friedl, T. (1995).** Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae cl. nov.). *Journal of Phycology*, 31(4), 632-639.
- Friedl, T. & O'Kelly, C. J. (2002).** Phylogenetic relationships of green algae assigned to the genus *Planophila* (Chlorophyta): evidence from 18S rDNA sequence data and ultrastructure. *European Journal of Phycology*, 37(3), 373-384.
- Fritsch, F. E. (1948).** Contributions to our knowledge of British algae. *Hydrobiologia*, 1(1-4), 115-125.
- Fu, W., Guðmundsson, Ó., Paglia, G., Herjólfsson, G., Andrésón, Ó. S., Palsson, B. Ø. & Brynjólfsson, S. (2013).** Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2395-2403.
- 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. (2014a).** New phylogenetic hypotheses for the core Chlorophyta based on chloroplast sequence data. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2, 63.

- Fučíková, K., Lewis, P. O. & Lewis, L. A. (2014b). Widespread desert affiliation of trebouxiophycean algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) including discovery of three new desert genera. *Phycological Research*, 62(4), 294-305.
- Furnas, M. J. & Mitchell, A. W. (1986). Phytoplankton dynamics in the central Great Barrier Reef—I. Seasonal changes in biomass and community structure and their relation to intrusive activity. *Continental Shelf Research*, 6(3), 363-384.
- García, C. M., García-Ruiz, R., Rendón, M., Niell, F. X. & Lucena, J. (1997). Hydrological cycle and interannual variability of the aquatic community in a temporary saline lake (Fuente de Piedra, Southern Spain). *Hydrobiologia*, 345(2-3), 131-141.
- García, D., Rangel-Basto, Y., Barajas-Solano, A., Muñoz-Peñalosa, Y. & Urbina-Suarez, N. (2019). Towards the production of microalgae biofuels: the effect of the culture medium on lipid deposition. *BioTechnologia*, 100(3), 273-278.
- García, F., Freile-Pelegrín, Y. & Robledo, D. (2007). Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. *Bioresource Technology*, 98(7), 1359-1365.
- García, J. G. & Ma, S. F. (2005). Polymerase chain reaction: A landmark in the history of gene technology. *Critical Care Medicine*, 33(12), S429-S432.
- García-González, M., Moreno, J., Canavate, J. P., Anguis, V., Prieto, A., Manzano, C., Florencio, F. J. & Guerrero, M. G. (2003). Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. *Journal of Applied Phycology*, 15(2-3), 177-184.
- García-González, M., Moreno, J., Manzano, J. C., Florencio, F. J. & Guerrero, M. G. (2005). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 115(1), 81-90.
- Garrido, J. L., Rodríguez, F. & Zapata, M. (2009). Occurrence of loroxanthin, loroxanthin decenoate, and loroxanthin dodecenoate in *Tetraselmis* species (Prasinophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 45(2), 366-374.
- Gast, R. J., McDonnell, T. A. & Caron, D. A. (2000). srDna-based taxonomic affinities of algal symbionts from a planktonic foraminifer and a solitary radiolarian. *Journal of Phycology*, 36(1), 172-177.
- Gast, R. J. & Caron, D. A. (2001). Photosymbiotic associations in planktonic foraminifera and radiolaria. *Hydrobiologia*, 461(1-3), 1-7.
- Geider, R. J., MacIntyre, H. L. & Kana, T. M. (1998). A dynamic regulatory model of phytoplankton acclimation to light, nutrients, and temperature. *Limnology and Oceanography*, 43(4), 679-694.
- Gershwin, M. E. & Belay, A. (Eds.). (2007). *Spirulina* in human nutrition and health. CRC Press, Boca Raton.
- Ghirardi, M. L., Zhang, L., Lee, J. W., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E. & Melis, A. (2000). Microalgae: a green source of renewable H₂. *Trends in Biotechnology*, 18(12), 506-511.
- Giacco, E., Mariottini, G. L. & Pane, L. (2011). Ecotoxicological evaluation of marine sediments using free and immobilized phytoplanktonic algae. *Journal of Biological Research*, 84(1), 34.
- Gianni, A., Kehayias, G. & Zacharias, I. (2011). Geomorphology modification and its impact to anoxic lagoons. *Ecological Engineering*, 37(11), 1869-1877.
- Gibor, A. (1956). The culture of brine algae. *The Biological Bulletin*, 111(2), 223-229.
- Gielly, L. & Taberlet, P. (1994). The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 11(5), 769-777.
- Gilbert, J. (2001). Seasonal plankton dynamics in a Mediterranean hypersaline coastal lagoon: the Mar Menor. *Journal of Plankton Research*, 23(2), 207-218.
- Gim, G. H., Kim, J. K., Kim, H. S., Kathiravan, M. N., Yang, H., Jeong, S. H. & Kim, S. W. (2014). Comparison of biomass production and total lipid content of freshwater green microalgae cultivated under various culture conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(2), 99-106.
- Gimpel, J. A., Specht, E. A., Georgianna, D. R. & Mayfield, S. P. (2013). Advances in microalgae engineering and synthetic biology applications for biofuel production. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(3), 489-495.
- Ginzburg, M. (1987). *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Advances in Botanical Research*, 14(93), 183.
- Giordano, M., Davis, J. S. & Bowes, G. (1994). Organic carbon release by *Dunaliella salina* (Chlorophyta) under different growth conditions of CO₂, nitrogen, and salinity. *Journal of Phycology*, 30(2), 249-257.
- Giordano, M. & Beardall, J. (2009). Impact of environmental conditions on photosynthesis, growth and carbon allocation strategies of hypersaline species of *Dunaliella*. *Global NEST Journal*, 11, 79-85.
- Giordano, M., Bargnesi, F., Mariani, P. & Ratti, S. (2014). *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) affects the quality of NaCl crystals. *Cryptogamie. Algologie*, 35(3), 285-302.

- Go, S., Lee, S. J., Jeong, G. T. & Kim, S. K. (2012). Factors affecting the growth and the oil accumulation of marine microalgae, *Tetraselmis suecica*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(1-2), 145-150.
- Goes, J. I., Handa, N., Taguchi, S. & Hama, T. (1994). Effect of UV-B radiation on the fatty acid composition of the marine phytoplankter *Tetraselmis* sp.: relationship to cellular pigments. *Marine Ecology Progress Series*, 259-274.
- Goho, S. & Bell, G. (2000). The ecology and genetics of fitness in *Chlamydomonas*. IX. The rate of accumulation of variation of fitness under selection. *Evolution*, 54(2), 416-424.
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J. & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1477-1486.
- Goiris, K., Van Colen, W., Wilches, I., León-Tamariz, F., De Cooman, L. & Muylaert, K. (2015). Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Research*, 7, 51-57.
- Goldman, J. C., Porcella, D. B., Middlebrooks, J. E. & Toerien, D. F. (1971). The Effect of Carbon on Algal Growth-Its Relationship to Eutrophication. *Reports*. Paper 462.
- Goldman, J. C. (1979). Outdoor algal mass cultures—I. Applications. *Water Research*, 13(1), 1-19.
- Gomes, E. D. A. C. (2018). Evaluation of *Dunaliella salina* growth and corresponding β -carotene production in tubular photobioreactor (Doctoral Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo). Retrieved from: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-06022019-101558/en.php>
- Gómez, P. I. & González, M. A. (2001). Genetic polymorphism in eight Chilean strains of the carotenogenic microalga *Dunaliella salina* Teodoresco (Chlorophyta). *Biological Research*, 34(1), 23-30.
- Gómez, P. I., Barriga, A., Cifuentes, A. S. & Gonzalez, M. A. (2003). Effect of salinity on the quantity and quality of carotenoids accumulated by *Dunaliella salina* (strain CONC-007) and *Dunaliella bardawil* (strain ATCC 30861) Chlorophyta. *Biological Research*, 36(2), 185-192.
- Gómez, P. I. & González, M. A. (2004). Genetic variation among seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with industrial potential, based on RAPD banding patterns and on nuclear ITS rDNA sequences. *Aquaculture*, 233(1-4), 149-162.
- Gómez, P. I. & González, M. A. (2005). The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biological Research*, 38(2-3), 151-162.
- Gong, M. & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1396-1412.
- González, M. A., Gómez, P. I. & Montoya, R. (1998). Comparison of PCR-RFLP analysis of the ITS region with morphological criteria of various strains of *Dunaliella*. *Journal of Applied Phycology*, 10(6), 573-580.
- González, M. A., Coleman, A. W., Gómez, P. I. & Montoya, R. (2001). Phylogenetic relationship among various strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae) based on nuclear ITS rDNA sequences. *Journal of Phycology*, 37(4), 604-611.
- Gonzalez, M. A., Aguayo, P. A., Inostroza, I. D. L., Castro, P. A., Fuentes, G. A. & Gomez, P. I. (2015). Ultrastructural and molecular characterization of *Tetraselmis* strains (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta) isolated from Chile/Caracterización ultraestructural y molecular de cepas de *Tetraselmis* (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta) aisladas de Chile. *Gayana. Botanica*, 72(1), 47.
- González, M. A., Gómez, P. I. & Polle, J. E. (2019). Taxonomy and phylogeny of the genus *Dunaliella*, in: Ben-Amotz, A., Polle, J. E. W. & Rao, D. V. S. (Eds.), *The alga Dunaliella*. CRC Press, Boca Raton, pp. 15-44.
- González-Fernández, C. & Ballesteros, M. (2012). Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1655-1661.
- González-Fernández, C., Sialve, B. & Molinuevo-Salces, B. (2015). Anaerobic digestion of microalgal biomass: challenges, opportunities and research needs. *Bioresource Technology*, 198, 896-906.
- Gooday, G. W. (1971). A biochemical and autoradiographic study of the role of the Golgi bodies in thecal formation in *Platymonas tetrathele*. *Journal of Experimental Botany*, 22(4), 959-971.
- Goodenough, U. W. & Heuser, J. E. (1985). The *Chlamydomonas* cell wall and its constituent glycoproteins analyzed by the quick-freeze, deep-etch technique. *The Journal of Cell Biology*, 101(4), 1550-1568.
- Goodwin, T. W. (1952). *The comparative biochemistry of the carotenoids*. Chapman and Hall, London.
- Goodwin, T. W., Jamikorn, M. & Willmer, J. S. (1953). *Studies in carotenogenesis*. 7. Further observations concerning the action of diphenylamine in inhibiting the synthesis of β -carotene in *Phycomyces blakesleeanus*. *Biochemical Journal*, 53(4), 531.

- Gottardis, M. M., Lamph, W. W., Shalinsky, D. R., Wellstein, A. & Heyman, R. A. (1996).** The efficacy of 9-cis retinoic acid in experimental models of cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 38(1), 85-96.
- Gould, S. J. & Lewontin, R. C. (1979).** Evolution: The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: A critique of the adaptationist programme. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 205(1161), 581-598.
- Gouveia, L., Raymundo, A., Batista, A. P., Sousa, I. & Empis, J. (2006).** *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *European Food Research and Technology*, 222(3-4), 362.
- Gouveia, L. & Oliveira, A. C. (2009).** Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(2), 269-274.
- Gray, K. A., Zhao, L. & Emptage, M. (2006).** Bioethanol. *Current opinion in chemical biology*, 10(2), 141-146.
- Greville, R.K. (1865).** Descriptions of new and rare diatoms. Series XVI. *Transactions of the Microscopical Society, New Series, London* 13, 43-57.
- Grierson, S., Strezov, V. & Bengtsson, J. (2013).** Life cycle assessment of a microalgae biomass cultivation, bio-oil extraction and pyrolysis processing regime. *Algal Research*, 2(3), 299-311.
- Griffiths, M. J., van Hille, R. P. & Harrison, S. T. (2012).** Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 989-1001.
- Grima, E. M., Camacho, F. G., Sanchez Perez, J. A., Gomez, A. C. & Sanz, F. V. (1994).** Outdoor turbidostat culture of the marine microalga *Tetraselmis* sp. *Aquaculture Research*, 25(5), 547-555.
- Guedes, A. C., Amaro, H. M. & Malcata, F. X. (2011).** Microalgae as sources of high added-value compounds—a brief review of recent work. *Biotechnology Progress*, 27(3), 597-613.
- Guedes, A. C. & Malcata, F. X. (2012).** Nutritional value and uses of microalgae in aquaculture. *Aquaculture*, 10(1516), 59-78.
- Guedes, A. C., Sousa-Pinto, I. & Malcata, F. X. (2015).** Application of microalgae protein to aquafeed, in: Kim., S.K.(Ed.) *Handbook of Marine Microalgae*. Academic Press, Cambridge, pp. 93-125.
- Guelorget, O. & Perthuisot, J. P. (1983).** Le domaine paralique. Expressions géologiques, biologiques et économiques du confinement. Paris: Presses de l'École Normale Supérieure.
- Guerin, M., Huntley, M. E. & Olaizola, M. (2003).** *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition. *TRENDS in Biotechnology*, 21(5), 210-216.
- Guevara, M., Lodeiros, C., Gómez, O., Lemus, N., Núñez, P., Romero, L., Vásquez, A. & Rosales, N. (2005).** Carotenogénesis de cinco cepas del alga *Dunaliella* sp.(Chlorophyceae) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 53(3-4), 331-337.
- Gugger, M., Lyra, C., Suominen, I., Tsitko, I., Humbert, J. F., Salkinoja-Salonen, M. S. & Sivonen, K. (2002).** Cellular fatty acids as chemotaxonomic markers of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Nostoc* and *Planktothrix* (cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(3), 1007-1015.
- Guillou L., Eikrem W., Chrétiennot-Dinet M.-J., Le Gall F., Massana R., Romari K., Pedrós-Alió C. & Vaultot D. (2004).** 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, 193-214.
- Guiry, M., in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2020).** AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org> (Accessed on 9 March 2020).
- Guschina, I. A. & Harwood, J. L. (2006).** Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 45(2), 160-186.
- Gutell, R. R., Larsen, N. & Woese, C. R. (1994).** Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 58(1), 10-26.
- Guzmán, H. M., de la Jara Valido, A., Duarte, L. C. & Presmanes, K. F. (2010).** Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from *Tetraselmis suecica* in response to culture conditions. *Aquaculture International*, 18(2), 189-199.
- Guzmán, H. M., de la Jara Valido, A., Presmanes, K. F. & Duarte, L. C. (2012).** Quick estimation of intraspecific variation of fatty acid composition in *Dunaliella salina* using flow cytometry and Nile Red. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1237-1243.
- Guzman, S., Gato, A., Lamela, M., Freire-Garabal, M. & Calleja, J. M. (2003).** Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytotherapy Research*, 17(6), 665-670.
- Haeckel, E. H. P. A. (1894).** Systematische Phylogenie der Protisten und Pflanzen. Verlag von Georg Reimer, Berlin, 400 pp.

- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M. K. & Webley, P. A. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 178-185.
- Hallegraeff, G. M. (2010). Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. *Journal of Phycology* 46(2), 220-235.
- Hamed, I., Ak, B., Isik, O. & Uslu, L. (2017). The effects of salinity and temperature on the growth of *Dunaliella* sp. isolated from the Salt Lake (Tuz Gölü), Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17(7), 1367-1372.
- Hammer, U. T., Shames, J. & Haynes, R. C. (1983). The distribution and abundance of algae in saline lakes of Saskatchewan, Canada. *Hydrobiologia*, 105(1), 1-26.
- Han, M. A., Hong, S. J., Kim, Z. H., Cho, B. K., Lee, H., Choi, H. K. & Lee, C. G. (2018). Enhanced production of fatty acids via redirection of carbon flux in marine microalga *Tetraselmis* sp. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 267-274.
- Han, S. F., Jin, W. B., Tu, R. J. & Wu, W. M. (2015). Biofuel production from microalgae as feedstock: current status and potential. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(2), 255-268.
- Handelman, G. J. (2001). The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition*, 17(10), 818-822.
- Hansen, L. A., Sigman, C. C., Andreola, F., Ross, S. A., Kelloff, G. J. & De Luca, L. M. (2000). Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis*, 21(7), 1271-1279.
- Harris, G. (2012). Phytoplankton ecology: structure, function and fluctuation. Springer Science & Business Media.
- Harker, M., Tsavalos, A. J. & Young, A. J. (1996). Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(2), 113-118.
- Harshman, L. G. & Hoffmann, A. A. (2000). Laboratory selection experiments using *Drosophila*: what do they really tell us? *Trends in Ecology & Evolution*, 15(1), 32-36.
- Hashemi, A., Moslemi, M., Pajoum Shariati, F. & Delavari Amrei, H. (2020). Beta-carotene production within *Dunaliella salina* cells under salt stress condition in an indoor hybrid helical-tubular photobioreactor. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 98(1), 69-74.
- Hasle G. R. & Tomas C. R. (1997). Introduction and historical background, in: Tomas C. R. (Ed.), Identifying Marine Phytoplankton. Elsevier, San Diego, pp. 1-4.
- Hatanaka, Y., Inaoka, K., Kobayashi, O., Higashihara, M. & Hiyama, K. (1998). Sensitivity of the surface coat of the halotolerant green alga *Dunaliella parva* (Volvocales, Chlorophyceae) to lysozyme. *Phycological Research*, 46(2), 147-153.
- Haupt, F. (2011). Plankton vertical migrations-Implications for the pelagic ecosystem (Doctoral dissertation, LMU, München). Retrieved from: <https://edoc.ub.uni-muenchen.de/13513/>
- Havlik, I., Lindner, P., Schepers, T. & Reardon, K. F. (2013). On-line monitoring of large cultivations of microalgae and cyanobacteria. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 406-414.
- He, Q., Yang, H., Wu, L. & Hu, C. (2015). Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresource Technology*, 191, 219-228.
- Heidari, R., Saadatmand, S. & Riahi, H. (2000). Effects of salt and irradiance stress on photosynthetic pigments and proteins in *Dunaliella salina* Teodoresco. *Journal Of Sciences Islamic Republic Of Iran*, 11(2), 73-77.
- Heidelberg, K. B., Nelson, W. C., Holm, J. B., Eisenkolb, N., Andrade, K. & Emerson, J. B. (2013). Characterization of eukaryotic microbial diversity in hypersaline Lake Tyrrell, Australia. *Frontiers in Microbiology*, 4, 115.
- Hejazi, M. A., Holwerda, E. & Wijffels, R. H. (2004). Milking microalga *Dunaliella salina* for β -carotene production in two-phase bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(5), 475-481.
- Hejazi, M. A., Barzegari, A., Gharajeh, N. H. & Hejazi, M. S. (2010). Introduction of a novel 18S rDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga *Dunaliella*. *Saline Systems*, 6(1), 4.
- Hellebust, J. A. (1965). Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography*, 10(2), 192-206.
- Hellebust, J. A. (1985). Mechanisms of response to salinity in halotolerant microalgae, in Pasternak, D. & San Pietro, A. Biosalinity in Action: Bioproduction with Saline Water. Springer, Dordrecht, pp. 69-81.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravikumar, R. & Carvalho, I. S. (2013). Microalgae taxonomy and breeding. *Biofuel Crops: Production, Physiology and Genetics*, 44.
- Hempel, N., Petrick, I. & Behrendt, F. (2012). Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1407-1418.

- Hermawan, J., Masithah, E. D., Tjahjaningsih, W. & Abdillah, A. A. (2018). Increasing β -carotene content of phytoplankton *Dunaliella salina* using different salinity media. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 137(1), p. 012034.
- Herrero-Jáuregui, C., Arnaiz-Schmitz, C., Herrera, L., Smart, S. M., Montes, C., Pineda, F. D. & Schmitz, M. F. (2019). Aligning landscape structure with ecosystem services along an urban–rural gradient. Trade-offs and transitions towards cultural services. *Landscape Ecology*, 34(7), 1525-1545.
- Hibberd, D.J. (1981). Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 82, 93-119.
- Hieber, A., D. King, T. J., Morioka, S., Fukushima, L. H., Franke, A. A. & Bertram, J. S. (2000). Comparative effects of all-trans β -carotene vs. 9-cis β -carotene on carcinogen-induced neoplastic transformation and connexin 43 expression in murine 10T1/2 cells and on the differentiation of human keratinocytes. *Nutrition and Cancer*, 37(2), 234-244.
- Hill, D.R.A. & Wetherbee, R. (1989). A reappraisal of the genus *Rhodomonas* (Cryptophyceae). *Phycologia* 28, 143-158
- Hillebrand, H., Dürselen, C. D., Kirschtel, D., Pollinger, U. & Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35(2), 403-424.
- Hoffmann, L. (1989). Algae of terrestrial habitats. *The Botanical Review*, 55(2), 77-105.
- Hogg, J. (1860). On the distinctions of a plant and an animal, and on a fourth kingdom of nature. *New Philosophical Journal* 12, 216-225.
- Hoham, R. W., Bonome, T. A., Martin, C. W., & Leebens-Mack, J. H. (2002). A combined 18s rDNA and rbcL phylogenetic analysis of *Chloromonas* and *Chlamydomonas* (Chlorophyceae, Volvocales) emphasizing snow and other cold-temperature habitats. *Journal of Phycology*, 38(5), 1051-1064.
- Holcomb, R. E., Mason, L. J., Reardon, K. F., Cropek, D. M. & Henry, C. S. (2011). Culturing and investigation of stress-induced lipid accumulation in microalgae using a microfluidic device. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(1), 245-253.
- Holt, J. R. & Pfister, L. A. (1982). A technique for counting chromosomes of armored dinoflagellates, and chromosome numbers of six freshwater dinoflagellate species. *American Journal of Botany*, 69(7), 1165-1168.
- Hori, T., Norris, R. E. & Chihara, M. (1982). Studies on the Ultrastructure and Taxonomy of the genus *Tetraselmis* (Prasinophyceae). *Shokubutsu-gaku-zasshi*, 95(1), 49.
- Hori, T., Norris, R. E. & Chihara, M. (1983). Studies on the ultrastructure and taxonomy of the genus *Tetraselmis* (Prasino physeae). II: Subgenus *Prasinocladia*. *Shokubutsugaku Zasshi*, 96(1044), 385-392.
- Hori, T., Norris, R. E. & Chihara, M. (1986). Studies on the ultrastructure and taxonomy of the genus *Tetraselmis* (Prasinophyceae). III: Subgenus *Parviselmis*. *Shokubutsugaku Zasshi*, 99(1053), 123-135.
- Hoshaw, R. W., Wang, J. C., McCourt, R. M. & Hull, H. M. (1985). Ploidal changes in clonal cultures of *Spirogyra communis* and implications for species definition. *American Journal of Botany*, 72(7), 1005-1011.
- Hosseini Tafreshi, A. & Shariati, M. (2009). *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 14-35.
- Hu, C. C., Lin, J. T., Lu, F. J., Chou, F. P. & Yang, D. J. (2008). Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry*, 109(2), 439-446.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54(4), 621-639.
- Huang, Q., Jiang, F., Wang, L. & Yang, C. (2017). Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms. *Engineering*, 3(3), 318-329.
- Huang, X., Wei, L., Huang, Z. & Yan, J. (2014). Effect of high ferric ion concentrations on total lipids and lipid characteristics of *Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 105-114.
- Huber, M. E. & Lewin, R. A. (1986). An electrophoretic survey of the genus *Tetraselmis* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Phycologia*, 25(2), 205-209.
- Ibañez, E. & Cifuentes, A. (2013). Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 703-709.
- Ignatiades, L., Gotsis-Skretas, O. & Metaxatos, A. (2007). Field and culture studies on the ecophysiology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Halim) present in Greek coastal waters. *Harmful Algae*, 6(2), 153-165.

- Imamoglu, E., Demirel, Z. & Conk Dalay, M. (2015). Process optimization and modeling for the cultivation of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis striata* via response surface methodology. *Journal of Phycology*, 51(3), 442-453.
- Innis, S. M. (2005). Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta*, 26, S70-S75.
- Issarapayup, K., Powtongsook, S. & Pavasant, P. (2011). Economical review of *Haematococcus pluvialis* culture in flat-panel airlift photobioreactors. *Aquacultural Engineering*, 44(3), 65-71.
- Jackson, R. H., Williams, P. J. Le B. & Joint, I. R. (1987). Freshwater phytoplankton in the low salinity region of the River Tamar Estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 25,299-311.
- Jahnke, L. S. (1999). Massive carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* induced by ultraviolet-A radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 48(1), 68-74.
- Jaime, L., Rodríguez-Meizoso, I., Cifuentes, A., Santoyo, S., Suarez, S., Ibáñez, E. & Señorans, F. J. (2010). Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT-Food Science and Technology*, 43(1), 105-112.
- Jaswir, I., Noviendri, D., Hasrini, R. F. & Octavianti, F. (2011). Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *Journal Medicinal Plants Research*, 5(33), 7119-7131.
- Javor, B. J. (1983). Planktonic standing crop and nutrients in a saltern ecosystem. *Limnology and Oceanography*, 28(1), 153-159.
- Javor, B. J. (2002). Industrial microbiology of solar salt production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 42-47.
- Jeong, H. J. (1999). The ecological roles of heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic community. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 390-396.
- Jeong, M. H., Yun, J. H., Yang, K. & Jo, W. S. (2015). Application of electrochemically treated seawater as basic culture media for mass cultivation of *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture international*, 23(6), 1457-1471.
- Jimenez, C. & Pick, U. (1993). Differential reactivity of [beta]-carotene isomers from *Dunaliella bardawil* toward oxygen radicals. *Plant Physiology*, 101(2), 385-390.
- Jiménez, C., Cossío, B. R. & Niell, F. X. (2003). Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. *Aquaculture*, 221(1-4), 331-345.
- Juneja, A., Ceballos, R. M. & Murthy, G. S. (2013). Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies*, 6(9), 4607-4638.
- Jacquet, S., Delesalle, B., Torréton, J. P. & Blanchot, J. (2006). Response of phytoplankton communities to increased anthropogenic influences (southwestern lagoon, New Caledonia). *Marine Ecology Progress Series*, 320, 65-78.
- Jellison, R. & Melack, J. M. (1988). Photosynthetic activity of phytoplankton and its relation to environmental factors in hypersaline Mono Lake, California, in: Melack, J. (Ed.), *Saline Lakes*. Springer, Dordrecht, pp. 69-88.
- Jellison, R. & Melack, J. M. (1993). Algal photosynthetic activity and its response to meromixis in hypersaline Mono Lake, California. *Limnology and Oceanography*, 38(4), 818-837.
- Jiang, J. G. & Zhu, Y. H. (2010). Preliminary and comparative studies on the cultivations of *Dunaliella salina* between outdoors and in the photobioreactor. *Journal of Food Process Engineering*, 33(1), 104-114.
- Jicha, G. A. & Markesbery, W. R. (2010). Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease. *Clinical Interventions in Aging*, 5, 45.
- Jing, C., Qun, X. & Rohrer, J. (2012). HPLC separation of all-trans-β-carotene and its iodine-induced isomers using a C30 column. *Thermo Scientific*, 391, 2-6.
- Jo, W. S., Choi, Y. J., Kim, H. J., Nam, B. H., Hong, S. H., Lee, G. A., Lee, S. W., Seo, S. Y. & Jeong, M. H. (2010). Anti-inflammatory effect of microalgal extracts from *Tetraselmis suecica*. *Food Science and Biotechnology*, 19(6), 1519-1528.
- Jo, W. S., Yang, K. M., Park, H. S., Kim, G. Y., Nam, B. H., Jeong, M. H. & Choi, Y. J. (2012). Effect of microalgal extracts of *Tetraselmis suecica* against UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts. *Toxicological Research*, 28(4), 241-248.
- John, D. M., Whitton, B. A. & Brook, A. J. (Eds.) (2002). *The freshwater algal flora of the British isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Johnson, E. J., Krinsky, N. I. & Russell, R. M. (1996). Serum response of all-trans and 9-cis isomers of beta-carotene in humans. *Journal of the American College of Nutrition*, 15(6), 620-624.
- Kalinowska, K. (2004). Bacteria, nanoflagellates and ciliates as components of the microbial loop in three lakes of different trophic status. *Polish Journal of Ecology*, 52(1), 19-34.
- Karsten, G. (1898). *Rhodomonas baltica*, n.g. et sp. *Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen, Abteilung Kiel, Neue Folge* 3: 15-16

- Kassen, R. & Bell, G. (1998).** Experimental evolution in *Chlamydomonas*. IV. Selection in environments that vary through time at different scales. *Heredity*, 80(6), 732-741.
- Katselis, G. N., Moutopoulos, D. K., Dimitriou, E. N. & Koutsikopoulos, C. (2013).** Long-term changes of fisheries landings in enclosed gulf lagoons (Amvrakikos gulf, W Greece): Influences of fishing and other human impacts. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 131, 31-40.
- Katsiapi, M., Moustaka-Gouni, M., Michaloudi, E. & Kormas, K. A. (2011).** Phytoplankton and water quality in a Mediterranean drinking-water reservoir (Marathonas Reservoir, Greece). *Environmental Monitoring and Assessment*, 181(1-4), 563-575.
- Kehayias, G., Ramfos, A., Ioannou, S., Bisouki, P., Kyrtzoglou, E., Gianni, A. & Zacharias, I. (2013).** Zooplankton diversity and distribution in a deep and anoxic Mediterranean coastal lake. *Mediterranean Marine Science*, 14(1), 179-192.
- Kermarrec, L., Franc, A., Rimet, F., Chaumeil, P., Humbert, J. F. & Bouchez, A. (2013).** Next-generation sequencing to inventory taxonomic diversity in eukaryotic communities: a test for freshwater diatoms. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 607-619.
- Khadim, S. R., Singh, P., Singh, A. K., Tiwari, A., Mohanta, A. & Asthana, R. K. (2018).** Mass cultivation of *Dunaliella salina* in a flat plate photobioreactor and its effective harvesting. *Bioresource Technology*, 270, 20-29.
- Khan, M. I., Shin, J. H. & Kim, J. D. (2018).** The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 36.
- Kharkwal, H., Joshi, D. D., Panthari, P. R. E. E. T. I., Pant, M. K. & Kharkwal, A. C. (2012).** Algae as future drugs. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(4), 1-4.
- Khatoon, H., Rahman, N. A., Banerjee, S., Harun, N., Suleiman, S. S., Zakaria, N. H., Lananan, F., Siti Hajar Abdul, H. & Endut, A. (2014).** Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95, 11-18.
- Kim, G., Bae, J. & Lee, K. (2016).** Nitrate repletion strategy for enhancing lipid production from marine microalga *Tetraselmis* sp. *Bioresource Technology*, 205, 274-279.
- Kim, S. G., Choi, A., Ahn, C. Y., Park, C. S., Park, Y. H. & Oh, H. M. (2005).** Harvesting of *Spirulina platensis* by cellular flotation and growth stage determination. *Letters in Applied Microbiology*, 40(3), 190-194.
- Kim, S. K. & Chojnacka, K. (Eds.). (2015).** Marine algae extracts: processes, products, and applications. John Wiley & Sons, Hoboken, J.
- Kim, Z. H., Park, Y. S., Ryu, Y. J. & Lee, C. G. (2017).** Enhancing biomass and fatty acid productivity of *Tetraselmis* sp. in bubble column photobioreactors by modifying light quality using light filters. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 22(4), 397-404.
- Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111-120.
- Kinsella, J. E., Broughton, K. S. & Whelan, J. W. (1990).** Dietary unsaturated fatty acids: interactions and possible needs in relation to eicosanoid synthesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1(3), 123-141.
- Kirkwood, A. E. & Henley, W. J. (2006).** Algal community dynamics and halotolerance in a terrestrial, hypersaline environment. *Journal of Phycology*, 42(3), 537-547.
- Kisdi, É. & Geritz, S. A. (2001).** Evolutionary disarmament in interspecific competition. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1485), 2589-2594.
- Kjerfve, B. (1994).** Coastal lagoon processes. Elsevier Oceanography Series. Elsevier, Amsterdam.
- Klausmeier, C. A., Litchman, E. & Levin, S. A. (2004).** Phytoplankton growth and stoichiometry under multiple nutrient limitation. *Limnology and Oceanography*, 49(4part2), 1463-1470.
- Kleinegris, D. M., van Es, M. A., Janssen, M., Brandenburg, W. A. & Wijffels, R. H. (2010a).** Carotenoid fluorescence in *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, 22(5), 645-649.
- Kleinegris, D. M., Janssen, M., Brandenburg, W. A. & Wijffels, R. H. (2010b).** The selectivity of milking of *Dunaliella salina*. *Marine Biotechnology*, 12(1), 14-23.
- Kleinegris, D. M., Janssen, M., Brandenburg, W. A. & Wijffels, R. H. (2011).** Continuous production of carotenoids from *Dunaliella salina*. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(3), 253-259.
- Klinthong, W., Yang, Y. H., Huang, C. H. & Tan, C. S. (2015).** A review: Microalgae and their applications in CO₂ capture and renewable energy. *Aerosol and Air Quality Research*, 15(2), 712-42.
- Kobara, T. & Hori, T. (1975).** On the formation and germination of cyst in *Platymonas* and *Prasinocladus* (Prasinophyceae). *The Bulletin of the Japanese Society of Phycology*, 23, 111-5.
- Kocum, E. (2020).** Autotrophic nanoplankton dynamics is significant on the spatio-temporal variation of phytoplankton biomass size structure along a coastal trophic gradient. *Regional Studies in Marine Science*, 33, 100920.

- Kokkinos, D., Dakhil, H., Wierschem, A., Briesen, H. & Braun, A. (2016).** Deformation and rupture of *Dunaliella salina* at high shear rates without the use of thickeners. *Biorheology*, 53(1), 1-11.
- Kokou, F., Makridis, P., Kentouri, M. & Divanach, P. (2012).** Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquaculture Research*, 43(10), 1520-1527.
- Kormas, K. A., Nicolaidou, A. & Reizopoulou, S. (2001).** Temporal variations of nutrients, chlorophyll a and particulate matter in three coastal lagoons of Amvrakikos Gulf (Ionian Sea, Greece). *Marine Ecology*, 22(3), 201-213.
- Kottuparambil, S., Shin, W., Brown, M. T. & Han, T. (2012).** UV-B affects photosynthesis, ROS production and motility of the freshwater flagellate, *Euglena agilis* Carter. *Aquatic Toxicology*, 122, 206-213.
- Koutsodendris, A., Brauer, A., Zacharias, I., Putyrskaya, V., Klemt, E., Sangiorgi, F., & Pross, J. (2015).** Ecosystem response to human-and climate-induced environmental stress on an anoxic coastal lagoon (Etoliko, Greece) since 1930 AD. *Journal of Paleolimnology*, 53(3), 255-270.
- Kovárová-Kovar, K. & Egli, T. (1998).** Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 646-666.
- Krinsky, N. I. & Denke, S. M. (1982).** Interaction of oxygen and oxygen radicals with carotenoids. *Journal of the National Cancer Institute*, 69, 205-210.
- Krinsky, N. I. (1989).** Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(6), 617-635.
- Krinsky, N. I. (1994).** Carotenoids and cancer: basic research studies. *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*, 239-261.
- Kró, M., Maxwell, D. P. & Huner, N. P. (1997).** Exposure of *Dunaliella salina* to low temperature mimics the high light-induced accumulation of carotenoids and the carotenoid binding protein (Cbr). *Plant and Cell Physiology*, 38(2), 213-216.
- Kuckuck, P. (1894).** Bemerkungen zur marinen Algenvegetation von Helgoland. *Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen. Neue Folge* 1(1), 223-263.
- Kuhner, M. K. (2009).** Coalescent genealogy samplers: windows into population history. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 86-93.
- Kumar, M. S., & Buddolla, V. (2019).** Future Prospects of Biodiesel Production by Microalgae: A Short Review, in: Buddolla, V. (Ed.) *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, Cambridge, pp. 161-166.
- Kumar, S., Matange, N., Umapathy, S. & Visweswariah, S. S. (2015).** Linking carbon metabolism to carotenoid production in mycobacteria using Raman spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 362(3), 1-6.
- Kumar, S. D., Sojin, K., Santhanam, P., Dhanalakshmi, B., Latha, S., Park, M. S. & Kim, M. K. (2018).** Triggering of fatty acids on *Tetraselmis* sp. by ethyl methanesulfonate mutagenic treatment. *Bioresource Technology Reports*, 2, 21-28.
- Kützing, F. T. (1843).** *Phycologia generalis: oder Anatomie, Physiologie und Systemkunde der Tange*. Brockhaus.
- Kwon, M. H. & Yeom, S. H. (2017).** Evaluation of closed photobioreactor types and operation variables for enhancing lipid productivity of *Nannochloropsis* sp. KMMCC 290 for biodiesel production. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(5), 604-611.
- Kylin, H. (1935).** Über *Rhodomonas*, *Platymonas* and *Prasinocladus*. *Kungliga Fysiografiska Sällskapets i Lund Förhandlingar*, 5, 1-13
- Lakeman, M. B. & Cattolico, A. R. A. (2007).** Cryptic diversity in phytoplankton cultures is revealed using a simple plating technique. *Journal of Phycology*, 43(4), 662-674.
- Lakeman, M. B., von Dassow, P. & Cattolico, R. A. (2009).** The strain concept in phytoplankton ecology. *Harmful Algae*, 8(5), 746-758.
- Lam, M. K. & Lee, K. T. (2012).** Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30(3), 673-690.
- Lamers, P. P. (2011).** Metabolomics of carotenoid accumulation in *Dunaliella salina*. (Doctoral Dissertation, Wageningen University). Retrieved from: <https://research.wur.nl/en/publications/metabolomics-of-carotenoid-accumulation-in-dunaliella-salina>
- Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C., Bino, R. J. & Wijffels, R. H. (2008).** Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends in Biotechnology*, 26(11), 631-638.
- Lamers, P. P., van de Laak, C. C., Kaasenbrood, P. S., Lorier, J., Janssen, M., De Vos, R. C., Bino, R. J. & Wijffels, R. H. (2010).** Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(4), 638-648.

- Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C., Bino, R. J. & Wijffels, R. H. (2012). Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga. *Journal of Biotechnology*, 162(1), 21-27.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L. & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6955-6959.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. & Guindon, S. (2012). PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29(6), 1695-1701.
- Lang, I., Hodac, L., Friedl, T. & Feussner, I. (2011). Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC plant biology*, 11(1), 124.
- Lari, Z., Abrishamchi, P., Ahmadzadeh, H. & Soltani, N. (2019). Differential carbon partitioning and fatty acid composition in mixotrophic and autotrophic cultures of a new marine isolate *Tetraselmis* sp. KY114885. *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 201-210.
- Larson, C. A. & Belovsky, G. E. (2013). Salinity and nutrients influence species richness and evenness of phytoplankton communities in microcosm experiments from Great Salt Lake, Utah, USA. *Journal of Plankton Research*, 35(5), 1154-1166.
- Latasa, M., Scharek, R., Gall, F. L. & Guillou, L. (2004). Pigment suites and taxonomic groups in Prasinophyceae. *Journal of Phycology*, 40(6), 1149-1155.
- Lauritano, C., Andersen, J. H., Hansen, E., Albrigtsen, M., Escalera, L., Esposito, F., Helland, K., Hanssen, K. Ø., Romano, G. & Ianora, A. (2016). Bioactivity screening of microalgae for antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetes, and antibacterial activities. *Frontiers in Marine Science*, 3, 68.
- Laws, E. A., Pei, S., Bienfang, P. & Grant, S. (2011). Phosphate-limited growth and uptake kinetics of the marine prasinophyte *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher. *Aquaculture*, 322, 117-121.
- Lee, E., Jalalizadeh, M. & Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: a review. *Algal Research*, 12, 497-512.
- Lee, H. J. & Hur, S. B. (2009). Genetic relationships among multiple strains of the genus *Tetraselmis* based on partial 18S rDNA sequences. *Algae*, 24(4), 205-212.
- Lee, R. E. (2018). *Phycology*. Cambridge University Press.
- Lefranc, F., Koutsaviti, A., Ioannou, E., Kornienko, A., Roussis, V., Kiss, R. & Newman, D. (2019). Algae metabolites: From in vitro growth inhibitory effects to promising anticancer activity. *Natural Product Reports*, 36(5), 810-841.
- Leliaert, F., Smith, D. R., Moreau, H., Herron, M. D., Verbruggen, H., Delwiche, C. F. & De Clerck, O. (2012). Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(1), 1-46.
- Leliaert, F., Verbruggen, H., Vanormelingen, P., Steen, F., López-Bautista, J. M., Zuccarello, G. C., & De Clerck, O. (2014). DNA-based species delimitation in algae. *European Journal of Phycology*, 49(2), 179-196.
- Leonardi, P. I. & Cáceres, E. J. (1994). Comparative analysis of the fine structure of young and adult individuals of *Dunaliella salina* (polyblepharidaceae, chlorophyceae) with emphasis on the flagellar apparatus. *Journal of Phycology*, 30(4), 642-653.
- Lepage, G. & Roy, C. C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research*, 27(1), 114-120.
- Lerche W (1937) Untersuchungen über Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella*. *Archiv für Protistenkunde*, 88, 236–268.
- Leroi, A. M., Bennett, A. F. & Lenski, R. E. (1994). Temperature acclimation and competitive fitness: an experimental test of the beneficial acclimation assumption. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(5), 1917-1921.
- Lers, A., Biener, Y. & Zamir, A. (1990). Photoinduction of massive β -carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*: Kinetics and dependence on gene activation. *Plant Physiology*, 93(2), 389-395.
- Leupold, M., Hindersin, S., Gust, G., Kerner, M. & Hanelt, D. (2013). Influence of mixing and shear stress on *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*, 25(2), 485-495.
- Lewitus, A. J. (2006). Osmotrophy in marine microalgae, in: Rao, S. (Ed.), *Algal cultures, analogues of blooms and applications*. Science Publishers, Enfield, pp.343-383.
- Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F. & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102(3), 771-776.

- Li, G., Dong, H., Hou, W., Wang, S., Jiang, H., Yang, J. & Wu, G. (2016). Temporal succession of ancient phytoplankton community in Qinghai Lake and implication for paleo-environmental change. *Scientific Reports*, 6, 19769.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N. & Lan, C. Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 629-636.
- Liska, A. J., Shevchenko, A., Pick, U. & Katz, A. (2004). Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. *Plant Physiology*, 136(1), 2806-2817.
- Litchman, E. & Klausmeier, C. A. (2001). Competition of phytoplankton under fluctuating light. *The American Naturalist*, 157(2), 170-187.
- Liu, A. Y., Wei, C. H. E. N., Zheng, L. L. & Song, L. R. (2011). Identification of high-lipid producers for biodiesel production from forty-three green algal isolates in China. *Progress in Natural Science: Materials International*, 21(4), 269-276.
- Liu, J., Mukherjee, J., Hawkes, J. J. & Wilkinson, S. J. (2013). Optimization of lipid production for algal biodiesel in nitrogen stressed cells of *Dunaliella salina* using FTIR analysis. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(10), 1807-1814.
- Liu, S., Gibson, K., Cui, Z., Chen, Y., Sun, X. & Chen, N. (2020). Metabarcoding analysis of harmful algal species in Jiaozhou Bay. *Harmful Algae*, 92, 101772.
- Liu, X. D. & Shen, Y. G. (2006). Salt shock induces state II transition of the photosynthetic apparatus in dark-adapted *Dunaliella salina* cells. *Environmental and Experimental Botany*, 57(1-2), 19-24.
- Loeblich, L. A. (1970). Growth limitation of *Dunaliella salina* by CO₂ at high salinity. *Journal of Phycology*, 6, p. 9.
- Loeblich LA (1972). Studies on the brine flagellate *Dunaliella salina*. (PhD Thesis, University of California, San Diego).
- Loeblich, L. A. (1974). Action spectra and effect of light-intensity on growth, pigments and photosynthesis in *Dunaliella salina*. *Journal of Protozoology*, 21(3), pp. 420.
- Loeblich, L. A. (1982). Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 62(3), 493-508.
- Lohbeck, K. T., Riebesell, U. & Reusch, T. B. (2012). Adaptive evolution of a key phytoplankton species to ocean acidification. *Nature Geoscience*, 5(5), 346-351.
- Loper, C. L., Steidinger, K. A. & Walker, L. M. (1980). A simple chromosome spread technique for unarmored dinoflagellates and implications of polyploidy in algal cultures. *Transactions of the American Microscopical Society*, 343-346.
- López-González, P. J., Guerrero, F. & Castro, M. C. (1997). Seasonal fluctuations in the plankton community in a hypersaline temporary lake (Honda, southern Spain). *International Journal of Salt Lake Research*, 6(4), 353-371.
- Lorenz, M., Friedl, T. & Day, J. G. (2005). Maintenance of actively metabolizing microalgal cultures, in: Andersen, R. A. (Ed.), *Algal culturing techniques*. Elsevier, Cambridge, pp.145.
- Lorenz, R. T. & Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 18(4), 160-167.
- Lowe, C. D., Day, A., Kemp, S. J. & Montagnes, D. J. (2005). There are high levels of functional and genetic diversity in *Oxyrrhis marina*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(3), 250-257.
- Lu, N., Wei, D., Jiang, X. L., Chen, F. & Yang, S. T. (2012). Regulation of lipid metabolism in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* in response to NaCl stress: an integrated analysis by cytomic and lipidomic approaches. *Process Biochemistry*, 47(7), 1163-1170.
- Lu, L., Wang, J., Yang, G., Zhu, B. & Pan, K. (2017). Heterotrophic growth and nutrient productivities of *Tetraselmis chuii* using glucose as a carbon source under different C/N ratios. *Journal of Applied Phycology*, 29(1), 15-21.
- Lucas, L. V., Koseff, J. R., Cloern, J. E., Monismith, S. G. & Thompson, J. K. (1999). Processes governing phytoplankton blooms in estuaries I: The local production-loss balance. *Marine Ecology Progress Series*, 187, 1-15.
- Luong-Van, J. T. & Hayward, E. (2007). Immobilized *Tetraselmis* sp. for ease of TEM processing and for ultrastructure research. *Journal of Applied Phycology*, 19(6), 685-688.
- Lv, H., Wang, Q. E., Wang, S., Qi, B., He, J. & Jia, S. (2019). Enhancing biomass production of *Dunaliella salina* via optimized combinational application of phytohormones. *Aquaculture*, 503, 146-155.
- Lynch, M. & Gabriel, W. (1990). Mutation load and the survival of small populations. *Evolution*, 44(7), 1725-1737.
- Lynch, M., Gabriel, W. & Wood, A. M. (1991). Adaptive and demographic responses of plankton populations to environmental change. *Limnology and Oceanography*, 36(7), 1301-1312.

- Macken, A., Giltrap, M., Foley, B., McGovern, E., McHugh, B. & Davoren, M. (2008).** A model compound study: the ecotoxicological evaluation of five organic contaminants employing a battery of marine bioassays. *Environmental Pollution*, 153(3), 627-637.
- Magdaong, J. B., Ubando, A. T., Culaba, A. B., Chang, J. S. & Chen, W. H. (2019).** Effect of aeration rate and light cycle on the growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* in a photobioreactor. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 268(1), p. 012112.
- Makridis, P., Costa, R. A. & Dinis, M. T. (2006).** Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima*, and effect on bacterial load of enriched *Artemia metanauplii*. *Aquaculture*, 255(1-4), 76-81.
- Malik, A. (2004).** Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*, 30(2), 261-278.
- Manhart, J. R. (1994).** Phylogenetic analysis of green plant rbcL sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3(2), 114-127.
- Manivasagan, P., Bharathiraja, S., Santha Moorthy, M., Mondal, S., Seo, H., Dae Lee, K. & Oh, J. (2018).** Marine natural pigments as potential sources for therapeutic applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(5), 745-761.
- Mann, D. G. & Chepurinov, V. A. (2004).** What have the Romans ever done for us? The past and future contribution of culture studies to diatom systematics. *Nova Hedwigia*, 79(1-2), 237-291.
- Manoylov, K. M., Marsh, T. & Stevenson, R. J. (2009).** Testing molecular tools for assessment of taxonomic composition of a benthic algal community. *Nova Hedwigia*, 135, 121-136.
- Manoylov, K. M. (2014).** Taxonomic identification of algae (morphological and molecular): species concepts, methodologies, and their implications for ecological bioassessment. *Journal of phycology*, 50(3), 409-424.
- Mansour, M. P., Frampton, D. M., Nichols, P. D., Volkman, J. K. & Blackburn, S. I. (2005).** Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: applications and unusual C24 – C28 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Applied Phycology*, 17(4), 287-300.
- Manton, I. & Parke, M. (1960).** Further observations on a small green flagellate with special reference to possible relatives of *Chromulina pusilla* Butcher. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 39, 275-298.
- Maragou, P. & Mantziou, D. (2000).** Assessment of the Greek Ramsar wetlands. WWF Greece. Retrieved from: https://www.researchgate.net/publication/267939062_Assessment_of_the_Greek_Ramsar_wetlands
- Margalef, R. (1946).** Contribución al conocimiento del género *Platymonas* (Volvocales). *Collectanea Botanica*, 1(8), p. 95-105.
- Margalef, R. (1978).** Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta* 1, 493-509.
- Margulis, L. (Ed.)(1990).** Handbook of protocista: the structure, cultivation, habitats, and life histories of the eukaryotic microorganisms and their descendants exclusive of animals, plants, and fungi: a guide to the algae, ciliates, foraminifera, sporozoa, water molds, slime molds, and the other protocists. The Jones and Bartlett series in life sciences, Burlington.
- 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.
- Marin, B., Matzke, C. & Melkonian, M. (1993).** Flagellar hairs of *Tetraselmis* (Prasinophyceae): ultrastructural types and intrageneric variation. *Phycologia*, 32(3), 213-222.
- 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(2), 304-336.
- Marín, N., Morales, F., Lodeiros, C. & Tamigneaux, E. (1998).** Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *Journal of Applied Phycology*, 10(4), 405-411.
- Markou, G. & Nerantzis, E. (2013).** Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1532-1542.
- Markovits, A., Gianelli, M. P., Conejeros, R., & Erazo, S. (1993).** Strain selection for β -carotene production by *Dunaliella*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(5), 534-537.
- Marova, I., Haronikova, A., Petrik, S., Kostovova, I. & Dvorakova, T. (2011).** Production of single cell oil and carotene-enriched biomass by red yeasts cultivated on waste glycerol. *Current Opinion in Biotechnology*, (22), S98.
- Marshall, J. A. & Newman, S. (2002).** Differences in photoprotective pigment production between Japanese and Australian strains of *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 272(1), 13-27.
- Martínez-Macías, R., Meza-Escalante, E., Serrano-Palacios, D., Gortáres-Moroyoqui, P., Ruíz-Ruíz, P. E. & Ulloa-Mercado, G. (2018).** Effect of fed-batch and semicontinuous regimen on

- Nannochloropsis oculata* grown in different culture media to high-value products. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(2), 585-590.
- Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L. R., Lopez-Elias, J. A. & Porchas-Cornejo, M. A. (2014).** Bioremediation of aquaculture effluents, in: Das, S. (Ed.), *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Elsevier, Cambridge, pp. 539-553.
- Martino, A. D., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K. & Bowler, C. (2007).** Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. *Journal of Phycology*, 43(5), 992-1009.
- Martins, C. A., Kulis, D., Franca, S. & Anderson, D. M. (2004).** The loss of PSP toxin production in a formerly toxic *Alexandrium lusitanicum* clone. *Toxicon*, 43(2), 195-205.
- Masel, J. (2011).** Genetic drift. *Current Biology*, 21(20), R837-R838.
- Masojídek, J., Torzillo, G., Kopecký, J., Koblížek, M., Nidiaci, L., Komenda, J., Lukavská, A. & Sacchi, A. (2000).** Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp. grown under nitrogen deficiency and salinity stress. *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 417-426.
- Masojídek, J., Papáček, Š., Sergejevova, M., Jirka, V., Červený, J., Kunc, J., Korečko, J., Verbovikova, O., Kopecký, J., Štys, D. & Torzillo, G. (2003).** A closed solar photobioreactor for cultivation of microalgae under supra-high irradiance: basic design and performance. *Journal of Applied Phycology*, 15(2-3), 239-248.
- Massjuk, N. P. (1973).** Morphology, systematics, ecology, geographic distribution of genus *Dunaliella* Teod. and perspectives of its practical use, Nauk. Dumka Press, Kiev.
- Massjuk, N. P. & Radchenko, M. I. (1971).** Pigment concentration in cells in some *Dunaliella* under conditions promoting reproduction. *Hydrobiol. J.(Engl. Transl. Hidrobiol. Zh.)*, 7, 24-32.
- Massjuk, N. P. & Radchenko, M. I. (1973).** New taxons of *Dunaliella salina* Teod, genus III. *Ukr Bot Zh*, 30, 468-471.
- Massjuk, N. P., Posudin, Y. I. & Lilitckaya, G. G. (2007).** Photomovement of the Cells of *Dunaliella* Teod.(Dunaliellales, Chlorophyceae, Viridiplantae).
- Massjuk, N. P. (2006).** Chlorodendrophyceae class nov.(Chlorophyta, Viridiplantae) in the Ukrainian flora: I. The volume, phylogenetic relations and taxonomical status. *Ukrainian Botanical Journal*, 63, 601-614.
- Massjuk, N. P. & Lilitcka, G. G. (2006).** Chlorodendrophyceae class. nov.(Chlorophyta, Viridiplantae) in the Ukrainian flora. II. The genus *Tetraselmis* F. Stein. *Ukrainian Botanical Journal*, 63(6), 741-758.
- Mata, T. M., Martins, A. A. & Caetano, N. S. (2010).** Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232.
- Mathimani, T. & Pugazhendhi, A. (2019).** Utilization of algae for biofuel, bio-products and bio-remediation. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 17, 326-330.
- Matthiessen, P., Bifield, S., Jarrett, F., Kirby, M. F., Law, R. J., McMinn, W. R., Sheahana, D.A., Thain, J.E. & Whale, G. F. (1998).** An assessment of sediment toxicity in the River Tyne Estuary, UK by means of bioassays. *Marine Environmental Research*, 45(1), 1-15.
- Mattox, K. R. & Stewart, K. D. (1984).** Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology, in: Irvine, D.E.G. & John, D. (Eds.), *Systematics of the Green Algae*, Academic Press, London, pp. 29-72.
- Matsui, M. S., Muizzuddin, N., Arad, S. & Marenus, K. (2003).** Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104(1), 13-22.
- Mayr, E. (1963).** *Animal species and evolution*. Belknap Press, Cambridge.
- McNeill, J., Barrie, F. R., Burdet, H. M., Demoulin, V., Hawksworth, D. L., Marhold, K., Nicolson D.H., Prado J., Silva P.C., Skog J.E., Wiersema J.H. & Turland N.J. (2006).** International code of botanical nomenclature (Vienna Code) adopted by the seventeenth International Botanical Congress, Vienna, Austria, July 2005. *Regnum Vegetabile*, 146.
- Metha, A. (2012).** Limitations and deviations of Beer-Lambert Law. PharmaXChange.info.
- Meireles, L. A., Azevedo, J. L., Cunha, J. P. & Malcata, F. X. (2002).** On-line determination of biomass in a microalga bioreactor using a novel computerized flow injection analysis system. *Biotechnology Progress*, 18(6), 1387-1391.
- Melis, A., Neidhardt, J. & Benemann, J. R. (1998).** *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells. *Journal of Applied Phycology*, 10(6), 515-525.
- Melkonian, M. (1979).** An ultrastructural study of the flagellate *Tetraselmis cordiformis* Stein (Chlorophyceae) with emphasis on the flagellar apparatus. *Protoplasma*, 98(1-2), 139-151.
- Melkonian, M. (1980).** Ultrastructural aspects of basal body associated fibrous structures in green algae: a critical review. *Biosystems*, 12(1-2), 85-104.

- Melkonian, M. (1982).** Structural and evolutionary aspects of the flagellar apparatus in green algae and land plants. *Taxon*, 31(2), 255-265.
- Melkonian, M. (1990).** Handbook of Protoctista: The Structure, Cultivation, Habitats and Life Histories of the Eukaryotic Microorganisms and Their Descendants Exclusive of Animals, Plants and Fungi.
- Melkonian, M., & Preisig, H. R. (1984).** An ultrastructural comparison between *Spermatozopsis* and *Dunaliella* (Chlorophyceae). *Plant Systematics and Evolution*, 146(1-2), 31-46.
- Mendoza, H., De la Jara, A., Freijanes, K., Carmona, L., Ramos, A. A., de Sousa Duarte, V. & Serafim Varela, J. C. (2008).** Characterization of *Dunaliella salina* strains by flow cytometry: a new approach to select carotenoid hyperproducing strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(4), 5-6.
- Meseck, S. L., Alix, J. H. & Wikfors, G. H. (2005).** Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). *Aquaculture*, 246(1-4), 393-404.
- Metting, F. B. (1996).** Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology*, 17(5-6), 477-489.
- Metting, F. B. & Pyne, J. W. (1986).** Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(7), 386-394.
- Meuser, J. E., Baxter, B. K., Spear, J. R., Peters, J. W., Posewitz, M. C. & Boyd, E. S. (2013).** Contrasting patterns of community assembly in the stratified water column of Great Salt Lake, Utah. *Microbial Ecology*, 66(2), 268-280.
- Miao, X. & Wu, Q. (2004).** High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology*, 110(1), 85-93.
- Mieczan, T. & Tarkowska-Kukuryk, M. (2013).** Diurnal dynamics of the microbial loop in peatlands: structure, function and relationship to environmental parameters. *Hydrobiologia*, 717(1), 189-201.
- Milano, J., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Chong, W. T., Lam, M. K., Loh, P. K. & Vellayan, V. (2016).** Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 180-197.
- Milko, Y. (1963)** Effect of various environmental factors on pigment production in the alga *Dunaliella salina*. *Mikrobiologiya* 32, 299– 307.
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J. & Adholeya, A. (2016).** A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, 7, 546.
- Mishra, A., & Jha, B. (2011).** Antioxidant response of the microalga *Dunaliella salina* under salt stress. *Botanica Marina*, 54(2), 195-199.
- Moestrup, Ø. (2002).** Phylum Prasinophyta, in: John, D.M., Whitton, B.A. & Brook, A.J. (Eds), *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 281-286.
- Moestrup, Ø. & Thronsdén, J. (1988).** Light and electron microscopical studies on *Pseudosourfieldia marina*, a primitive scaly green flagellate (Prasinophyceae) with posterior flagella. *Canadian Journal of Botany*, 66(7), 1415-1434.
- Mohan, S. V., Devi, M. P., Subhash, G. V. & Chandra, R. (2014).** Algae oils as fuels, in Pandey A., Chisti, Y., Lee, D.J. & Soccol, C. R. (Eds), *Biofuels from algae*. Elsevier, Cambridge, pp. 155-187.
- Mohebbi, F. (2010).** The Brine Shrimp *Artemia* and hypersaline environments microalgal composition: a mutual interaction. *International Journal of Aquatic Science*, 1(1), 19-27.
- Moheimani, N. R. (2013).** Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 25(2), 387-398.
- Moheimani, N. R. (2016).** *Tetraselmis suecica* culture for CO₂ bioremediation of untreated flue gas from a coal-fired power station. *Journal of Applied Phycology*, 28(4), 2139-2146.
- Moheimani, N. R. & Borowitzka, M. A. (2006).** The long-term culture of the coccolithophore *Pleurochysis carterae* (Haptophyta) in outdoor raceway ponds. *Journal of Applied Phycology*, 18(6), 703-712.
- Mohsenpour, S. F. & Willoughby, N. (2016).** Effect of CO₂ aeration on cultivation of microalgae in luminescent photobioreactors. *Biomass and Bioenergy*, 85, 168-177.
- Molina, E., Martínez, M. E., Sánchez, S., García, F. & Contreras, A. (1991).** Growth and biochemical composition with emphasis on the fatty acids of *Tetraselmis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 21-25.
- Molina, E., Fernández, J., Acién, F. G. & Chisti, Y. (2001).** Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, 92(2), 113-131.
- Moniz, M. B., Rindi, F., Novis, P. M., Broady, P. A. & Guiry, M. D. (2012).** Molecular phylogeny of Antarctic *Prasiola* (Prasiolales, Trebouxiophyceae) reveals extensive cryptic diversity. *Journal of Phycology*, 48(4), 940-955.

- Montagnes, D. J. & Weisse, T. (2000).** Fluctuating temperatures affect growth and production rates of planktonic ciliates. *Aquatic Microbial Ecology*, 21(1), 97-102.
- Montero, M. F., Aristizábal, M. & Reina, G. G. (2011).** Isolation of high-lipid content strains of the marine microalga *Tetraselmis suecica* for biodiesel production by flow cytometry and single-cell sorting. *Journal of Applied Phycology*, 23(6), 1053-1057.
- Montero-Lobato, Z., Vázquez, M., Navarro, F., Fuentes, J. L., Bermejo, E., Garbayo, I., Vílchez, C. & Cuaresma, M. (2018).** Chemically-induced production of anti-inflammatory molecules in microalgae. *Marine Drugs*, 16(12), 478.
- Montoya, T. H. & Olivera, G. A. (1993).** *Dunaliella salina* from saline environments of the central coast of Peru, in: Hurlbert, S. H. (Ed.), *Saline Lakes V*. Springer, Dordrecht, pp. 155-161.
- Montresor, M. & Lewis, J. M. (2005).** *Algal Cultures, Analogues of Blooms and Applications*. Science Publishers Enfield.
- Morabito, G., Mazzocchi, M. G., Salmaso, N., Zingone, A., Bergami, C., Flaim, G., Accoroni, S., Basset, A., Bastianini, M., Belmonte, G., Aubry, F. B., Bernardi, F., Bertani, A., I., Bresciani, M., Buzzi, F., Cabrini, M., Camatti, E., Caroppo, C., Cataletto, B., Castellano, M., Del Negro, P., de Olazabal, A., Di Capua, I., Elia, A., C., Fornasaro, D., Giallain, M., Grilli, F., Leoni, B., Lipizer, M., Longobardi, L., Ludovisi, A., Lugliè, A., Manca, M., Margiotta, F., Mariani, M. A., Marini, M., Marzocchi, M., Obertegger, U., Oggioni, A., Padedda, B. A., Pansera, M., Piscia, R., Povero, P., Pulina, S., Romagnoli, T., Rosati, I., Rossetti, G., Rubino, F., Sarno, D., Satta, C. T., Sechi, N., Stanca, E., Tirelli, V., Totti, C. & Puggnetti, A. (2018).** Plankton dynamics across the freshwater, transitional and marine research sites of the LTER-Italy Network. Patterns, fluctuations, drivers. *Science of The Total Environment*, 627, 373-387.
- Morales, E. A., Siver, P. A. & Trainor, F. R. (2001).** Identification of diatoms (Bacillariophyceae) during ecological assessments: comparison between light microscopy and scanning electron microscopy techniques. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 151(1), 95-103.
- Morowvat, M. H. & Ghasemi, Y. (2016).** Culture medium optimization for enhanced β -carotene and biomass production by *Dunaliella salina* in mixotrophic culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 217-223.
- Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Tangney, C. C., Bennett, D. A., Wilson, R. S., Aggarwal, N. & Schneider, J. (2003).** Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 60(7), 940-946.
- Morris, R. J. & F. Culkin (1976).** Marine lipids: Analytical technique and fatty acid ester analyses. *Oceanography and Marine Biology an Annual Review* 14, 391-433.
- Mostaert, A. S., Karsten, U., Hara, Y. & Watanabe, M. M. (1998).** Pigments and fatty acids of marine raphidophytes: a chemotaxonomic re-evaluation. *Phycological Research*, 46(4), 213-220.
- Moulton, T. P., Sommer, T. R., Burford, M. A. & Borowitzka, L. J. (1987).** Competition between *Dunaliella* species at high salinity, in: Ragan, M. A. & Bird, C. J. (Eds), *Twelfth International Seaweed Symposium*. Springer, Dordrecht, pp. 107-116.
- Moulton II, S. R., Kennen, J. G., Goldstein, R. M. & Hambrook, J. A. (2002).** Revised protocols for sampling algal, invertebrate, and fish communities as part of the National Water-Quality Assessment Program (No. 2002-150). Geological Survey (US).
- Mourelle, M. L., Gómez, C. P. & Legido, J. L. (2017).** The potential use of marine microalgae and cyanobacteria in cosmetics and thalassotherapy. *Cosmetics*, 4(4), 46.
- Mourente, G., Lubian, L. M. & Odriozola, J. M. (1990).** Total fatty acid composition as a taxonomic index of some marine microalgae used as food in marine aquaculture. *Hydrobiologia*, 203(3), 147-154.
- Moussa, I. D. B., Chtourou, H., Karray, F., Sayadi, S. & Dhoub, A. (2017).** Nitrogen or phosphorus repletion strategies for enhancing lipid or carotenoid production from *Tetraselmis marina*. *Bioresource Technology*, 238, 325-332.
- Mulders, K. J., Janssen, J. H., Martens, D. E., Wijffels, R. H. & Lamers, P. P. (2014).** Effect of biomass concentration on secondary carotenoids and triacylglycerol (TAG) accumulation in nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis*. *Algal Research*, 6, 8-16.
- Muller, H. J. (1964).** The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1(1), 2-9.
- Munir, N., Sharif, N., Naz, S. & Manzoor, F. (2013).** Algae: a potent antioxidant source. *Sky Journal of Microbiology Research*, 1, 22-31.
- Mutanda, T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A. & Bux, F. (2011).** Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 57-70.
- Muylaert, K., Sabbe, K. & Vyverman, W. (2009).** Changes in phytoplankton diversity and community composition along the salinity gradient of the Schelde estuary (Belgium/The Netherlands). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 82(2), 335-340.

- Myers, J. (1962).** Laboratory cultures, in: Lewin, R. A. (ed.), *Physiology and biochemistry of algae*. Academic Press, New York, pp. 603–615.
- Nascimento, I. A., Marques, S. S. I., Cabanelas, I. T. D., Pereira, S. A., Druzian, J. I., de Souza, C. O., Vich, D. V., de Carvalho, G. C. & Nascimento, M. A. (2013).** Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenergy Research*, 6(1), 1-13.
- Nagarajan, D., Lee, D. J., Kondo, A. & Chang, J. S. (2017).** Recent insights into biohydrogen production by microalgae—From biophotolysis to dark fermentation. *Bioresource Technology*, 227, 373-387.
- Nagata, M., Noguchi, Y., Ito, H., Imanishi, S. & Sugiyama, K. (2007).** A simple spectrophotometric method for the estimation of alpha-carotene, beta-carotene and lycopene concentrations in carrot [*Daucus carota*] acetone extracts. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 54(7), 351-355.
- Nägeli, C. (1849).** Gattungen einzelliger Algen physiologisch und systematisch bearbeitet. Zürich. 139 pp.
- Nagao, A. K. I. H. I. K. O. & Olson, J. A. (1994).** Enzymatic formation of 9-cis, 13-cis, and all-trans retinals from isomers of beta-carotene. *The FASEB Journal*, 8(12), 968-973.
- Nakayama, T., Watanabe, S., Mitsui, K., Uchida, H. & Inouye, I. (1996).** The phylogenetic relationship between the Chlamydomonadales and Chlorococcales inferred from 18S rDNA sequence data. *Phycological Research*, 44(1), 47-55.
- Nakayama, T., Marin, B., Kranz, H. D., Surek, B., Huss, V. A., Inouye, I. & 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(4), 367-380.
- Narváez-Zapata, J. A., Rojas-Herrera, R., López-Uc, Y. & Sánchez-Estudillo, L. (2011).** Different physiological responses influenced by salinity in genetically related *Dunaliella salina* isolates. *Biotechnology Letters*, 33(5), 1021-1026.
- Nassiri, Y., Ginsburger-Vogel, T., Mansot, J. L. & Wéry, J. (1996).** Effects of heavy metals on *Tetraselmis suecica*: Ultrastructural and energy-dispersive X-ray spectroscopic studies. *Biology of The Cell*, 86(2-3), 151-160.
- Neher, R. A. & Shraiman, B. I. (2012).** Fluctuations of fitness distributions and the rate of Muller's ratchet. *Genetics*, 191(4), 1283-1293.
- Nguyen, A., Tran, D., Ho, M., Louime, C., Tran, H. & Tran, D. (2016).** High light stress regimen on *Dunaliella salina* strains for carotenoids induction. *Integrative Food Nutrition and Metabolism*, 3, 347-350.
- Nichols, P. D., Klumpp, D. W. & Johns, R. B. (1986).** Lipid components and utilization in consumers of a seagrass community: an indication of carbon source. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 83(1), 103-113.
- Nicolaidou, A., Reizopoulou, S., Koutsoubas, D., Orfanidis, S. & Kevrekidis, T. (2005).** Biological components of Greek lagoonal ecosystems: an overview. *Mediterranean Marine Science*, 6(2), 31-50.
- Norris, R. E., Hori, T. & Chihara, M. (1980).** Revision of the genus *Tetraselmis* (Class Prasinophyceae). *Shokubutsu-gaku-zasshi*, 93(4), 317.
- Nishino, H., Murakoshi, M., Ii, T., Takemura, M., Kuchide, M., Kanazawa, M., Mou, X. Y., Wada, S., Masuda, M., Ohsaka, Y., Yogosawa, S., Satomi, Y., Jinno, K. & Yogosawa, S. (2002).** Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews*, 21(3-4), 257-264.
- Norton, T. A., Melkonian, M. & Andersen, R. A. (1996).** Algal biodiversity. *Phycologia*, 35(4), 308-326.
- Olaizola, M. (2003).** Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), 459-466.
- Oligae (2010).** Oilgae Guide to Algae-based Wastewater Treatment :A Sample Report.
- Oliveira, L., Bisalputra, T. & Antia, N. J. (1980).** Ultrastructural observation of the surface coat of *Dunaliella tertiolecta* from staining with cationic dyes and enzyme treatments. *New Phytologist*, 85(3), 385-392.
- Olmos, J., Paniagua, J. & Contreras, R. (2000).** Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. *Letters in Applied Microbiology*, 30(1), 80-84.
- Olmos, J., Ochoa, L., Paniagua-Michel, J. & Contreras, R. (2009).** DNA fingerprinting differentiation between β -carotene hyperproducer strains of *Dunaliella* from around the world. *Saline Systems*, 5(1), 5.
- Olmos-Soto, J., Paniagua-Michel, J., Contreras, R. & Trujillo, L. (2002).** Molecular identification of β -carotene hyper-producing strains of *Dunaliella* from saline environments using species-specific oligonucleotides. *Biotechnology Letters*, 24(5), 365-369.
- Olmos-Soto, J., Paniagua-Michel, J., Contreras, R. & Ochoa, L. (2012).** DNA fingerprinting intron-sizing method to accomplish a specific, rapid, and sensitive identification of carotenogenic

- Dunaliella* species, in: Barredo, J. L. (Ed.), *Microbial Carotenoids from Bacteria and Microalgae* Humana Press, Totowa, pp. 269-281.
- Olsen, L. M., Öztürk, M., Sakshaug, E. & Johnsen, G. (2006).** Photosynthesis-induced phosphate precipitation in seawater: ecological implications for phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 319, 103-110.
- Onefeli, A. O. & Stanys, V. (2019).** Phylogenetic Study of African Combretaceae t. Br. based on rbcL sequence. *Baltic Forestry*, 25(2), 170-177.
- Oppenheimer, C. H. (1960).** Bacterial activity in sediments of shallow marine bays. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 19(4), 244-260.
- Oppenheimer, C. H. & Kornicker, L. S. (1958).** Effect of the microbial production of hydrogen sulfide and carbon dioxide on the pH of recent sediments. *Publications of the Institute of Marine Science, University of Texas*, 5, 5-15.
- Ördög, V., Stirk, W. A., Bálint, P., van Staden, J. & Lovász, C. (2012).** Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *Journal of Applied Phycology*, 24(4), 907-914.
- Oren, A. (2005).** A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline systems*, 1(1), 2.
- Oren, A. (2009).** Saltern evaporation ponds as model systems for the study of primary production processes under hypersaline conditions. *Aquatic Microbial Ecology*, 56(2-3), 193-204.
- Oren, A. (2010).** Thoughts on the “missing link” between saltworks biology and solar salt quality. *Global NEST Journal*, 12(4), 417-425.
- Oren, A. (2014).** The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21(1), 23.
- Oren, A., Gurevich, P., Anati, D. A., Barkan, E. & Luz, B. (1995).** A bloom of *Dunaliella parva* in the Dead Sea in 1992: biological and biogeochemical aspects. *Hydrobiologia*, 297(3), 173-185.
- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A. & Abalde, J. (2005).** Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 96(3), 373-378.
- Otero, A. & Fábregas, J. (1997).** Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture*, 159(1-2), 111-123.
- Otero, A., García, D. & Fábregas, J. (1997).** Factors controlling eicosapentaenoic acid production in semicontinuous cultures of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9(5), 465-469.
- Paerl, H. W., Valdes, L. M., Pinckney, J. L., Piehler, M. F., Dyble, J. & Moisaner, P. H. (2003).** Phytoplankton photopigments as indicators of estuarine and coastal eutrophication. *BioScience*, 53(10), 953-964.
- Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Trivedi, K., Patidar, S. K., Ghosh, A. & Mishra, S. (2015).** Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 189, 341-348.
- Papaioannou, E., Roukas, T. & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2008).** Preparative biochemistry and biotechnology effect of biomass pre-treatment and solvent extraction on β -carotene and lycopene recovery from *Blakeslea trispora* cells. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 38, 246-256.
- Papandroulakis, N., Divanach, P. & Kentouri, M. (2002).** Enhanced biological performance of intensive sea bream (*Sparus aurata*) larviculture in the presence of phytoplankton with long photophase. *Aquaculture*, 204(1-2), 45-63.
- Papke, R. T., Ramsing, N. B., Bateson, M. M. & Ward, D. M. (2003).** Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 5(8), 650-659.
- Park, H., Jung, D., Lee, J., Kim, P., Cho, Y., Jung, I., Kim, J. H., Lim, S. M. & Lee, C. G. (2018).** Improvement of biomass and fatty acid productivity in ocean cultivation of *Tetraselmis* sp. using hypersaline medium. *Journal of Applied Phycology*, 30(5), 2725-2735.
- Park, S., Lee, Y., & Jin, E. (2013).** Comparison of the responses of two *Dunaliella* strains, *Dunaliella salina* CCAP 19/18 and *Dunaliella bardawil* to light intensity with special emphasis on carotenogenesis. *Algae*, 28(2), 203-211.
- Park, S., Kim, M., Lee, S. G., Lee, Y., Choi, H. K. & Jin, E. (2015).** Contrasting photoadaptive strategies of two morphologically distinct *Dunaliella* species under various salinities. *Journal of Applied Phycology*, 27(3), 1053-1062.
- Parke, M. (1949).** Studies on marine flagellates. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 28, 255-288,
- Parke, M. (1972).** Roger William Butcher (1897–1971). *British Journal of Phycology* 7(2), 275-278.
- Parke, M. & Manton, I. (1965).** Preliminary observations on the fine structure of *Prasinocladus marinus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 45(2), 525-536.
- Parke, M. & Manton, I. (1967).** The specific identity of the algal symbiont in *Convoluta roscoffensis*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 47(2), 445-464.

- Parke, M. & Dixon, P. S. (1968).** Check-list of British marine algae—second revision. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 48(3), 783-832.
- Parke, M. & Green, J. C. (1976).** Chlorophyta, Prasinophyceae. Check-list of British marine algae (third revision). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 56, 564-566.
- Parsons T.R., Maita Y. & Lalli C.M.. (1984).** A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press, Oxford.
- Pascher, A. (1938).** Heterokonten. In: Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. (Rabenhorst, L. Eds) Vol. 11, Teil 3, pp. 321-480
- Pasqualetti, M., Bernini, R., Carletti, L., Crisante, F. & Tempesta, S. (2011).** Salinity and nitrate concentration on the growth and carotenoids accumulation in a strain of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Transitional Waters Bulletin*, 4(2), 94-104.
- Pate, R., Klise, G. & Wu, B. (2011).** Resource demand implications for US algae biofuels production scale-up. *Applied Energy*, 88(10), 3377-3388.
- Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G. & Gislerød, H. R. (2007).** Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, 15(1), 1-9.
- Paul, C., Sommer, U., Garzke, J., Moustaka-Gouni, M., Paul, A. & Matthiessen, B. (2016).** Effects of increased CO₂ concentration on nutrient limited coastal summer plankton depend on temperature. *Limnology and Oceanography*, 61(3), 853-868.
- Pavlova, P., Markova, K., Tanev, S. & Davis, J. S. (1998).** Observations on a solar saltworks near Burgas, Bulgaria. *International Journal of Salt Lake Research*, 7(4), 357-368.
- Pereira, S. L., Leonard, A. E., Huang, Y. S., Chuang, L. T. & Mukerji, P. (2004).** Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the ω₃-fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid. *Biochemical Journal*, 384(2), 357-366.
- Pereira, H., Gangadhar, K. N., Schulze, P. S., Santos, T., De Sousa, C. B., Schueler, L. M., Custódio, L., Malcata, F. X., Gouveia, L., Varela, J. C. S. & Barreira, L. (2016).** Isolation of a euryhaline microalgal strain, *Tetraselmis* sp. CTP4, as a robust feedstock for biodiesel production. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11.
- Pérez-Rama, M., López, C. H., Alonso, J. A. & Vaamonde, E. T. (2001).** Class III metallothioneins in response to cadmium toxicity in the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(9), 2061-2066.
- Pérez-Rama, M., Alonso, J. A., López, C. H. & Vaamonde, E. T. (2002).** Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Bioresource Technology*, 84(3), 265-270.
- Pérez-Rama, M., Abalde, J., Herrero, C., Suárez, C. & Torres, E. (2009).** A capillary zone electrophoresis for determination of thiolic peptides in biological samples. *Journal of Separation science*, 32(12), 2152-2158.
- Pérez-Rama, M., Torres, E., Suárez, C., Herrero, C. & Abalde, J. (2010).** Sorption isotherm studies of Cd (II) ions using living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. *Journal of Environmental Management*, 91(10), 2045-2050.
- Pérez-Ruzafa, A., Marcos, C., Pérez-Ruzafa, I. M. & Pérez-Marcos, M. (2011).** Coastal lagoons: “transitional ecosystems” between transitional and coastal waters. *Journal of Coastal Conservation*, 15(3), 369-392.
- Pérez-Ruzafa, A., Campillo, S., Fernández-Palacios, J. M., García-Lacunza, A., García-Oliva, M., Ibañez, H., Navarro-Martínez, P. C., Pérez-Marcos, M., Pérez-Ruzafa, I. M., Quispe-Becerra, J. I., Sala-Mirete, A., Sánchez, O., Marcos, C. & Sala-Mirete, A. (2019).** Long-term dynamic in nutrients, chlorophyll a, and water quality parameters in a coastal lagoon during a process of eutrophication for decades, a sudden break and a relatively rapid recovery. *Frontiers in Marine Science*, 6(26), 1-23.
- Pérez-Pérez, M. E., Lemaire, S. D. & Crespo, J. L. (2012).** Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. *Plant Physiology*, 160(1), 156-164.
- Perrineau, M. M., Zelzion, E., Gross, J., Price, D. C., Boyd, J. & Bhattacharya, D. (2014).** Evolution of salt tolerance in a laboratory reared population of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Microbiology*, 16(6), 1755-1766.
- Petala, M., Tsiridis, V., Androulidakis, I., Makris, C., Baltikas V., Stefanidou, A., Genitsaris, S., Antoniadou, C., Rammou, D., Moustaka-Gouni, M., Chintiroglou, C.C. & Darakas, E. (2018).** Monitoring the marine environment of Thermaikos Gulf. *Protection and Restoration of Ecosystems*, 762-774.
- Petkov, G. & Garcia, G. (2007).** Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*?. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(5), 281-285.
- Petroutsos, D., Katapodis, P., Samiotaki, M., Panayotou, G. & Kekos, D. (2008).** Detoxification of 2, 4-dichlorophenol by the marine microalga *Tetraselmis marina*. *Phytochemistry*, 69(3), 707-714.
- Phadwal, K. & Singh, P. K. (2003).** Effect of nutrient depletion on β-carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. *Bioresource Technology*, 90(1), 55-58.

- Phang, S.M. & W.L. Chu. (1999).** University of Malaya, Algae culture Collection, Catalogue of Strains. Institute of Post Graduate Studies and Research, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia. 77 pp.
- Philippe, H. & Telford, M. J. (2006).** Large-scale sequencing and the new animal phylogeny. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(11), 614-620.
- Pisal, D. S. & Lele, S. S. (2005).** Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology* 4, 476-483.
- Pitzschke, A., Forzani, C. & Hirt, H. (2006).** Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9-10), 1757-1764.
- Pohl, P., & Zurheide, F. (1979).** Control of fatty acid and lipid formation in Baltic marine algae by environmental factors, in: Appelqvist, L. A. & Liljenberg, C. (Eds.), *Advances in the Biochemistry and Physiology of Plant Lipids*. Elsevier, Amsterdam, pp. 427-432.
- Polle, J. E., Tran, D., & Ben-Amotz, A. (2019).** History, distribution, and habitats of algae of the genus *Dunaliella* Teodoresco (Chlorophyceae), in: Ben-Amotz, A., Polle, J. E. W. & Rao, D. V. S. (Eds.), *The alga Dunaliella*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-14.
- Post, F. J. (1977).** The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microbial Ecology*, 3(2), 143-165.
- Posten, C. & Walter, C. (Eds.). (2012).** Microalgal biotechnology: potential and production. Walter de Gruyter, Berlin.
- Potter, D., Lajeunesse, T. C., Saunders, G. W. & Anderson, R. A. (1997).** Convergent evolution masks extensive biodiversity among marine coccoid picoplankton. *Biodiversity & Conservation*, 6(1), 99-107.
- Prabandono, K., Amin, S., Kim, S. K. & Lee, C. G. (2015).** Production of biomethane from marine microalgae. *Marine Bioenergy: Trends and Developments*, 303-323.
- Prasanna, R., Sood, A., Suresh, A., Nayak, S. & Kaushik, B. (2007).** Potentials and applications of algal pigments in biology and industry. *Acta Botanica Hungarica*, 49(1-2), 131-156.
- Preetha, K., John, L., Subin, C. S. & Vijayan, K. K. (2012).** Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (Chlorophyta) from Indian salinas and their diversity. *Aquatic Biosystems*, 8(1), 27.
- Preisig, H. R. (1992).** Morphology and taxonomy, in: Avron, M. & Ben-Amotz, A. (Eds.), *Dunaliella: Physiology, biochemistry and biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-15.
- Prieto, A., Canavate, J. P. & García-González, M. (2011).** Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. *Journal of Biotechnology*, 151(2), 180-185.
- Pringsheim, E. G. (1946).** Pure Cultures of Algae. Their Preparation and Maintenance. Cambridge University Press, Cambridge, 119 pp.
- Prokopowich, C. D., Gregory, T. R. & Crease, T. J. (2003).** The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome*, 46(1), 48-50.
- Pröschold, T. & Leliaert, F. (2007).** Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. *Systematics Association Special Volume*, 75, 123.
- Proskauer, J. (1950).** On *Prasinocladus*. *American Journal of Botany*, 59-66.
- Provasoli, L., Yamasu, T. & Manton, I. F. R. S. (1968).** Experiments on the resynthesis of symbiosis in *Convoluta roscoffensis* with different flagellate cultures. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 48(2), 465-478.
- Qin, J. G., Pearson, L. & Carragher, J. F. (1999).** Response of *Tetraselmis suecica* to nutrient and grazer manipulation. *Journal of Applied Phycology*, 11(6), 481-485.
- Qin, M. J., Huang, Y., Yang, G., Xu, L. S. & Zhou, K. Y. (2003).** rbcL sequence analysis of *Belamcanda chinensis* and related medicinal plants of Iris. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 38(2), 147-152.
- Qiu, Y. L., Chase, M. W., Les, D. H. & Parks, C. R. (1993).** Molecular phylogenetics of the Magnoliidae: cladistic analyses of nucleotide sequences of the plastid gene rbcL. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 587-606.
- Quinlan, E. L. & Philips, E. J. (2007).** Phytoplankton assemblages across the marine to low-salinity transition zone in a blackwater dominated estuary. *Journal of Plankton Research*, 29(5), 401-416.
- Quigg, A., Al-Ansi, M., Al Din, N. N., Wei, C. L., Nunnally, C. C., Al-Ansari, I. S., Rowe, G. T., Soliman, Y., Al-Maslamani, I., Mahmoud, I., Youssef, N. & Abdel-Moatid M., A. (2013).** Phytoplankton along the coastal shelf of an oligotrophic hypersaline environment in a semi-enclosed marginal sea: Qatar (Arabian Gulf). *Continental Shelf Research*, 60, 1-16.
- Rabbani, S., Beyer, P., Lintig, J. V., Huguency, P. & Kleinig, H. (1998).** Induced β -carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 116(4), 1239-1248.
- Rad, F. A., Aksoz, N. & Hejazi, M. A. (2011).** Effect of salinity on cell growth and β -carotene production in *Dunaliella* sp. isolates from Urmia Lake in northwest of Iran. *African Journal of Biotechnology*, 10(12), 2282-2289.
- Radmer, R. J. (1996).** Algal diversity and commercial algal products. *Bioscience*, 46(4), 263-270.

- Raes, E. J., Isdepsky, A., Muylaert, K., Borowitzka, M. A. & Moheimani, N. R. (2014).** Comparison of growth of *Tetraselmis* in a tubular photobioreactor (Biocoil) and a raceway pond. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 247-255.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., & Rengasamy, R. (2007).** Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(3), 517-523.
- Raja, A., Vipin, C. & Aiyappan, A. (2013).** Biological importance of marine algae-An overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2, 222-227.
- Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylidès, C. & Havaux, M. (2012).** Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(14), 5535-5540.
- Ramos, A. A., Polle, J., Tran, D., Cushman, J. C., Jin, E. S. & Varela, J. C. (2011).** The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives. *Algae*, 26(1), 3-20.
- Randrianarison, G. & Ashraf, M. A. (2017).** Microalgae: a potential plant for energy production. *Geology, Ecology, and Landscapes*, 1(2), 104-120.
- Rashid, N., Rehman, M. S. U., Memon, S., Rahman, Z. U., Lee, K. & Han, J. I. (2013).** Current status, barriers and developments in biohydrogen production by microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 22, 571-579.
- Rasoul-Amini, S., Mousavi, P., Montazeri-Najafabady, N., Mobasher, M. A., Mousavi, S. B., Vosough, F., Dabbagh, F. & Ghasemi, Y. (2014).** Biodiesel properties of native strain of *Dunaliella salina*. *International Journal of Renewable Energy Research*, 4(1), 39-41.
- Reboud, X. & Bell, G. (1997).** Experimental evolution in *Chlamydomonas*. III. Evolution of specialist and generalist types in environments that vary in space and time. *Heredity*, 78(5), 507-514.
- Reddy, A. R. & Raghavendra, A. S. (2006).** Photooxidative stress, in: Madhava Rao, K. V., Raghavendra, A. S. & Janardhan Reddy, K. (Eds.), *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Springer, Dordrecht, pp. 157-186.
- Reed, D. H., Lowe, E. H., Briscoe, D. A. & Frankham, R. (2003).** Inbreeding and extinction: effects of rate of inbreeding. *Conservation Genetics*, 4(3), 405-410.
- Regal, P. J. (1977).** Evolutionary loss of useless features: is it molecular noise suppression?. *The American Naturalist*, 111(977), 123-133.
- Regunathan, C. & Wesley, S. G. (2004).** Control of *Vibrio* spp. in shrimp hatcheries using the green algae *Tetraselmis suecica*. *Asian Fisheries Science*, 17(1/2), 147-158.
- Remane, A. & Schlieper, C. (1971).** *Biology of Brackish Water*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Resurreccion, E. P., Colosi, L. M., White, M. A. & Clarens, A. F. (2012).** Comparison of algae cultivation methods for bioenergy production using a combined life cycle assessment and life cycle costing approach. *Bioresource Technology*, 126, 298-306.
- Reynolds, C. S. (1997).** Successional development, energetics and diversity in planktonic communities, in: Takuya, A., Levin, S. A., Higashi M. (Eds.), *Biodiversity*. Springer, New York, pp. 167-202.
- Richmond, A. (2004).** Biological principles of mass cultivation, in: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied phycology*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, pp. 125-177.
- Richmond, A. & Hu, Q. (2013).** *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*, 2nd Edition. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Richmond, A. & Becker, E. W. (2017).** Technological aspects of mass cultivation—a general outline, in: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Mass Culture* (1986) CRC Press, Boca Raton, pp. 245-264.
- Rigobello-Masini, M., Masini, J. C. & Aidar, E. (2006).** The profiles of nitrate reductase and carbonic anhydrase activity in batch cultivation of the marine microalgae *Tetraselmis gracilis* growing under different aeration conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 57(1), 18-25.
- Robertson, R. C., Guihéneuf, F., Bahar, B., Schmid, M., Stengel, D. B., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. & Stanton, C. (2015).** The anti-inflammatory effect of algae-derived lipid extracts on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human THP-1 macrophages. *Marine Drugs*, 13(8), 5402-5424.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. & Trevisan, M. R. (2009).** Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100-112.
- Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D., Limon, D., Meléndez-Martínez, A. J., Olmedilla-Alonso, B., Palou, A., Ribot, J., Rodrigo, M. J., Zacarias, L. & Zhu, C. (2018).** A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*, 70, 62-93.

- Rodriguez-Valera, F. (2004). Environmental genomics, the big picture?. *FEMS Microbiology Letters*, 231(2), 153-158.
- Rodriguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G. & Imhoff, J. F. (1985). Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-pond saltern. *Microbial Ecology*, 11(2), 107-115.
- Roessler, P. G. (1990). Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *Journal of Phycology*, 26(3), 393-399.
- Romari, K. & Vaultot, D. (2004). Composition and temporal variability of picoeukaryote communities at a coastal site of the English Channel from 18S rDNA sequences. *Limnology and Oceanography*, 49(3), 784-798.
- Romay, C. H., Armesto, J., Ramirez, D., Gonzalez, R., Ledon, N. & Garcia, I. (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. *Inflammation Research*, 47(1), 36-41.
- Romay, C. H., Gonzalez, R., Ledon, N., Ramirez, D. & Rimbau, V. (2003). C-phycoerythrin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein and Peptide Science*, 4(3), 207-216.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539-542.
- Rosa, A., Deidda, D., Serra, A., Deiana, M., Dessi, M. A. & Pompei, R. (2005). Omega-3 fatty acid composition and biological activity of three microalgae species. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 3, 120-124.
- Roselli, L. & Basset, A. (2015). Decoding size distribution patterns in marine and transitional water phytoplankton: from community to species level. *PLoS one*, 10(5).
- Rosenberg, J. N., Oyler, G. A., Wilkinson, L. & Betenbaugh, M. J. (2008). A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(5), 430-436.
- Rozzak, D. B. & Colwell, R. R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews*, 51(3), 365.
- Roy, S. S. & Pal, R. (2015). Microalgae in aquaculture: a review with special references to nutritional value and fish dietetics, in: *Proceedings of the Zoological Society* 68(1). Springer (India), New Delhi, pp. 1-8.
- Rozen, D. E. & Lenski, R. E. (2000). Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. VIII. Dynamics of a balanced polymorphism. *The American Naturalist*, 155(1), 24-35.
- Rubin, M., Fenig, E., Rosenauer, A., Menendez-Botet, C., Achkar, C., Bentel, J. M., Yahalom, J., Mendelsohn, J. & Miller, W. H. (1994). 9-Cis retinoic acid inhibits growth of breast cancer cells and down-regulates estrogen receptor RNA and protein. *Cancer Research*, 54(24), 6549-6556.
- Ruhfel, B. R., Gitzendanner, M. A., Soltis, P. S., Soltis, D. E. & Burleigh, J. G. (2014). From algae to angiosperms—inferring the phylogeny of green plants (Viridiplantae) from 360 plastid genomes. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 23.
- Ruiz-Domínguez, M. C., Vaquero, I., Obregón, V., de la Morena, B., Vilchez, C. & Vega, J. M. (2015). Lipid accumulation and antioxidant activity in the eukaryotic acidophilic microalga *Coccomyxa* sp.(strain *onubensis*) under nutrient starvation. *Journal of Applied Phycology*, 27(3), 1099-1108.
- Ruiz-Martinez, A., Garcia, N. M., Romero, I., Seco, A. & Ferrer, J. (2012). Microalgae cultivation in wastewater: nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresource Technology*, 126, 247-253.
- Rusch, D. B., Halpern, A. L., Sutton, G., Heidelberg, K. B., Williamson, S., Yooseph, S., Wu, D., Eisen, J.A., Hoffman, J. M., Remington, K., Beeson, K., Tran, B., Smith, H., Baden-Tillson, H., Stewart, C., Thorpe, J., Freeman, J., Andrews-Pfannkoch, C., Venter, J. E., Li, K., Kravitz, S., Heidelberg, J. F., Utterback, T., Rogers, Y. H., Falcón, L. I., Souza, V., Germán Bonilla-Rosso, L., Eguiarte, L. E., Karl, D. M., Sathyendranath, S., Platt, T., Bermingham, E., Gallardo, V., Tamayo-Castillo, G., Ferrari, M. R., Strausberg, R. L., Neilson, K., Friedman, R., Frazier, M. & Venter, J. C. (2007). Oceanic metagenomics: the Sorcerer II global ocean sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific. *PLoS Biology*, 5(3).
- Rushforth, S. R. & Felix, E. A. (1982). Biotic adjustments to changing salinities in the Great Salt Lake, Utah, USA. *Microbial Ecology*, 8(2), 157-161.
- Ruyle, M., Connor, W. E., Anderson, G. J. & Lowensohn, R. I. (1990). Placental transfer of essential fatty acids in humans: venous-arterial difference for docosahexaenoic acid in fetal umbilical erythrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(20), 7902-7906.
- Ryckebosch, E., Bruneel, C., Muylaert, K. & Foubert, I. (2012). Microalgae as an alternative source of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Lipid Technology*, 24(6), 128-130.

- Ryšánek, D., Holzinger, A. & Škaloud, P. (2016).** Influence of substrate and pH on the diversity of the aeroterrestrial alga *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Streptophyta): a potentially important factor for sympatric speciation. *Phycologia*, 55(4), 347-358.
- Sahu, A., Pancha, I., Jain, D., Paliwal, C., Ghosh, T., Patidar, S., Bhattacharya, S. & Mishra, S. (2013).** Fatty acids as biomarkers of microalgae. *Phytochemistry*, 89, 53-58.
- Salgado-Hernanz, P. M., Racault, M. F., Font-Muñoz, J. S. & Basterretxea, G. (2019).** Trends in phytoplankton phenology in the Mediterranean Sea based on ocean-colour remote sensing. *Remote Sensing of Environment*, 221, 50-64.
- Salguero, A., de la Morena, B., Vigar, J., Vega, J. M., Vilchez, C., & León, R. (2003).** Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6), 249-253.
- Salisbury, J. L., Swanson, J. A., Floyd, G. L., Hall, R. & Maihle, N. J. (1981).** Ultrastructure of the flagellar apparatus of the green alga *Tetraselmis subcordiformis*. *Protoplasma*, 107(1-2), 1-11.
- Samanamud, A. (1998).** Crecimiento e historia de vida de *Dunaliella salina* de las salinas de los Chimus, Ancash y de Chilca, Lima, Peru. In: de Paula, EJ, M Coreldiro-Marino, DP Santos, EM Plastino, MT Fujii, NS Yokoya (Eds), Anais do IV Congresso Latino-Americano, II Reuniao Iberio-Americana, VII Reunião Brasileira, de Ficologia. Volume II. Sociedade Ficologica de America Latina e Caribe and Sociatade Brasileira de Ficologia, Caxambu, Brazil, pp 309–324
- San Pedro, A., González-López, C. V., Acien, F. G. & Molina-Grima, E. (2013).** Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 134, 353-361.
- Sansone, C., Galasso, C., Orefice, I., Nuzzo, G., Luongo, E., Cutignano, A., Romano, G., Brunet, C., Fontana, A., Esposito, F. & Ianora, A. (2017).** The green microalga *Tetraselmis suecica* reduces oxidative stress and induces repairing mechanisms in human cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1-12.
- Sarhan, S., Hamed, F. & Al-Youssef, W. (2018).** The rbcL gene sequence variations among and within *Prunus* species. Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, Juja.
- Sarmad, J., Shariati, M. & Madadkar Haghjou, M. (2007).** Relationship between endogenous Abscisic Acid and β -carotene synthesis in unicellular green alga *Dunaliella*. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 2(5), 559-564.
- Sarno, D., Zingone, A., Saggiomo, V. & Carrada, G. C. (1993).** Phytoplankton biomass and species composition in a Mediterranean coastal lagoon. *Hydrobiologia*, 271(1), 27-40.
- Sarpal, A., Teixeira, C. M. L. L., Costa, C., Ferreira, L., Silva, R., Cunha, S. & Daroda, R. J. (2019).** Evaluation of low cost medium for the production of lipids for biodiesel and carotenoids from microalgae *Tetraselmis* aff. *chuii*. *World Journal of Aquatic Research and Development*, 1, 1006.
- Sathasivam, R., Kermanee, P., Roytrakul, S. & Juntawong, N. (2012).** Isolation and molecular identification of β -carotene producing strains of *Dunaliella salina* and *Dunaliella bardawil* from salt soil samples by using species-specific primers and internal transcribed spacer (ITS) primers. *African Journal of Biotechnology*, 11(102), 16677-16687.
- Sathasivam, R. & Juntawong, N. (2013).** Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains. *International Journal of Current Science*, 5, 67-73.
- Sathasivam, R. & Ki, J. S. (2018).** A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. *Marine Drugs*, 16(1), 26.
- Sathasivam, R., & Ki, J. S. (2019a).** Heat shock protein genes in the green alga *Tetraselmis suecica* and their role against redox and non-redox active metals. *European Journal of Protistology*, 69, 37-51.
- Sathasivam, R. & Ki, J. S. (2019b).** Differential transcriptional responses of carotenoid biosynthesis genes in the marine green alga *Tetraselmis suecica* exposed to redox and non-redox active metals. *Molecular Biology Reports*, 46(1), 1167-1179.
- Sayadi, M. H., Ahmadpour, N., Fallahi, C. M. & Rezaei, M. R. (2016).** Removal of nitrate and phosphate from aqueous solutions by microalgae: An experimental study. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 2(4), 357-364.
- Scandinavian Culture Collection of Algae and Protozoa (SCCAP). (1986).** Denmark. The Collection. <http://www.sccap.dk/collection/> (Accessed on 10 March 2020).
- Schubert, B. A., Timofeeff, M. N., Lowenstein, T. K. & Polle, J. E. (2010).** *Dunaliella* cells in fluid inclusions in halite: significance for long-term survival of prokaryotes. *Geomicrobiology Journal*, 27(1), 61-75.
- Schüler, L. M., Santos, T., Pereira, H., Duarte, P., Katkam, N. G., Florindo, C., Schulzec, P. S. C., Barreira, L. & Varela, J. C. (2020).** Improved production of lutein and β -carotene by thermal and light intensity upshifts in the marine microalga *Tetraselmis* sp. CTP4. *Algal Research*, 45, 101732.
- Seckbach, J., & Oren, A. (2007).** Oxygenic photosynthetic microorganisms in extreme environments, in: Seckbach, J. (Ed.), *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments*. Springer, Dordrecht, pp. 3-25.

- Sellami, I., Hamza, A., El Bour, M., Mhamdi, M. A., Pinelalloul, B. & Ayadi, H. (2016). Succession of phytoplankton and zooplankton communities coupled to environmental factors in the oligo-mesotrophic Nabhana reservoir (semi arid mediterranean area, central Tunisia). *Zoological Studies*, 55, 1-15.
- Sen, B., Kocer, M. A. T. & Alp, M. T. (2005). Studies on growth of marine microalgae in batch cultures: IV. *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (Prasinophyta). *Asian Journal of Plant Sciences*, 4(6), 645-647.
- Senhorinho, G. N., Ross, G. M. & Scott, J. A. (2015). Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as potential sources of antibiotics. *Phycologia*, 54(3), 271-282.
- Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C. & Cid, Á. (2014). Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. *Marine environmental Research*, 101, 1-7.
- Serdar, S., Lök, A., Acarli, S. & Köse, A. (2007). The effect of two different culture media and five different salinities on growth of *Tetraselmis suecica*. *Rapports de la Commission Internationale pour la Mer Méditerranée*, 38, 394.
- Serini, S., Bizzarro, A., Piccioni, E., Fasano, E., Rossi, C., Lauria, A., R. M. C. Achille, Masullo, C. & Calviello, G. (2012). EPA and DHA differentially affect in vitro inflammatory cytokine release by peripheral blood mononuclear cells from Alzheimer's patients. *Current Alzheimer Research*, 9(8), 913-923.
- Serôdio, J., Silva, R., Ezequiel, J. & Calado, R. (2011). Photobiology of the symbiotic acol flatworm *Symsagittifera roscoffensis*: algal symbiont photoacclimation and host photobehaviour. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 91(1), 163-171.
- Service, P. M. & Rose, M. R. (1985). Genetic covariation among life-history components: the effect of novel environments. *Evolution*, 39(4), 943-945.
- Shaish, A., Avron, M., Pick, U. & Ben-Amotz, A. (1993). Are active oxygen species involved in induction of β -carotene in *Dunaliella bardawil*?. *Planta*, 190(3), 363-368.
- Shanab, S. M., Mostafa, S. S., Shalaby, E. A. & Mahmoud, G. I. (2012). Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(8), 608-615.
- Shankle, A. M., Mayali, X. & Franks, P. J. (2004). Temporal patterns in population genetic diversity of *Prorocentrum micans* (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, 40(2), 239-247.
- Sharma, N. K. & Rai, A. K. (2011). Biodiversity and biogeography of microalgae: progress and pitfalls. *Environmental Reviews*, 19(NA), 1-15.
- Sharma, K., Li, Y. & Schenk, P. M. (2014). UV-C-mediated lipid induction and settling, a step change towards economical microalgal biodiesel production. *Green Chemistry*, 16(7), 3539-3548.
- Shenbaga Devi, A., Santhanam, P., Rekha, V., Ananth, S., Prasath, B. B., Nandakumar, R., Jeyanthi, R. & Kumar Dinesh S. (2012). Culture and biofuel producing efficacy of marine microalgae *Dunaliella salina* and *Nannochloropsis* sp. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3(4), 38-44.
- Shields, R. J. (2001). Larviculture of marine finfish in Europe. *Aquaculture*, 200(1-2), 55-88.
- Shumskaya, M. & Wurtzel, E. T. (2013). The carotenoid biosynthetic pathway: thinking in all dimensions. *Plant Science*, 208, 58-63.
- Sierra, E., Ación, F. G., Fernández, J. M., García, J. L., González, C. & Molina, E. (2008). Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*, 138(1-3), 136-147.
- Simmons, T. L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P. & Gerwick, W. H. (2005). Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(2), 333-342.
- Simpson, K. L. (1983). Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Proceedings of the Nutrition Society*, 42(1), 7-17.
- Sing, S. F., Isdepsky, A., Borowitzka, M. A. & Lewis, D. M. (2014). Pilot-scale continuous recycling of growth medium for the mass culture of a halotolerant *Tetraselmis* sp. in raceway ponds under increasing salinity: a novel protocol for commercial microalgal biomass production. *Bioresource Technology*, 161, 47-54.
- Singh, M. (2005). Essential fatty acids, DHA and human brain. *The Indian Journal of Pediatrics*, 72(3), 239-242.
- Singh, P., Kumari, S., Guldhe, A., Misra, R., Rawat, I. & Bux, F. (2016). Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 1-16.
- Singh, S., Kate, B. N. & Banerjee, U. C. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(3), 73-95.
- Sirakov, I. N. & Velichkova, K. N. (2014). Bioremediation of wastewater originate from aquaculture and biomass production from microalgae species-*Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20(1), 66-72.

- Sirenko, L. A. & Kirpenko, Y. A. (1999).** Influence of metabolites of certain algae on human and animal cell cultures. *International Journal on Algae*, 1(1).
- Siriwardhana, N., Kalupahana, N. S. & Moustaid-Moussa, N. (2012).** Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, in: Kim, S. K. (Ed). *Advances in Food and Nutrition Research*, Volume 65. Academic Press, Cambridge, pp. 211-222.
- Škaloud, P. & Rindi, F. (2013).** Ecological differentiation of cryptic species within an asexual protist morphospecies: a case study of filamentous green alga *Klebsormidium* (Streptophyta). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60(4), 350-362.
- Škaloud, P., Steinová, J., Řídká, T., Vančurová, L. & Peksa, O. (2015).** Assembling the challenging puzzle of algal biodiversity: species delimitation within the genus *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 51(3), 507-527.
- Smit, S., Widmann, J. & Knight, R. (2007).** Evolutionary rates vary among rRNA structural elements. *Nucleic Acids Research*, 35(10), 3339-3354.
- Smith, D. R., Lee, R. W., Cushman, J. C., Magnuson, J. K., Tran, D. & Polle, J. E. (2010).** The *Dunaliella salina* organelle genomes: large sequences, inflated with intronic and intergenic DNA. *BMC Plant Biology*, 10(1), 83.
- Solana, M., Rizza, C. S. & Bertucco, A. (2014).** Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 311-318.
- Solovchenko, A. & Khozin-Goldberg, I. (2013).** High CO₂ tolerance in microalgae: possible mechanisms and implications for biotechnology and bioremediation. *Biotechnology Letters*, 35(11), 1745-1752.
- Solovchenko, A. & Neverov, K. (2017).** Carotenogenic response in photosynthetic organisms: a colorful story. *Photosynthesis Research*, 133(1-3), 31-47.
- Soltis, D. E. & Soltis, P. S. (1998).** Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis, in: Soltis, D. E., Soltis, P. S. & Doyle, J. J. (Eds), *Molecular systematics of plants II*. Springer, Boston, pp. 1-42.
- Sommer, U., Gliwicz, Z. M., Lampert, W. & Duncan, A. (1986).** The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Archiv für Hydrobiologie*, 106(4), 433-471.
- Soontornchaiboon, W., Joo, S. S. & Kim, S. M. (2012).** Anti-inflammatory effects of violaxanthin isolated from microalga *Chlorella ellipsoidea* in RAW 264.7 macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(7), 1137-1144.
- Spector, A. A. (1999).** Essentiality of fatty acids. *Lipids*, 34(1), S1-S3.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006).** Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Spurr, A. R. (1969).** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26(1-2), 31-43.
- Stachowski-Haberkorn, S., Jérôme, M., Rouxel, J., Khelifi, C., Rincé, M. & Burgeot, T. (2013).** Multigenerational exposure of the microalga *Tetraselmis suecica* to diuron leads to spontaneous long-term strain adaptation. *Aquatic Toxicology*, 140, 380-388.
- Staehr, P. A. & Birkeland, M. J. (2006).** Temperature acclimation of growth, photosynthesis and respiration in two mesophilic phytoplankton species. *Phycologia*, 45(6), 648-656.
- Stansell, G. R., Gray, V. M. & Sym, S. D. (2012).** Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. *Journal of Applied Phycology*, 24(4), 791-801.
- Stefanidou, N., Genitsaris, S., Lopez-Bautista, J., Sommer, U. & Moustaka-Gouni, M. (2018).** Effects of heat shock and salinity changes on coastal Mediterranean phytoplankton in a mesocosm experiment. *Marine Biology*, 165(10), 154.
- Steinkötter, J., Bhattacharya, D., Semmelroth, I., Bibeau, C. & Melkonian, M. (1994).** Prasinophytes form independent lineages within the Chlorophyta: Evidence from ribosomal RNA sequence comparisons. *Journal of Phycology*, 30(2), 340-345.
- Stephens, D. W. & Gillespie, D. M. (1976).** Phytoplankton production in the Great Salt Lake, Utah, and a laboratory study of algal response to enrichment. *Limnology and Oceanography*, 21(1), 74-87.
- Stephenson, P. G., Moore, C. M., Terry, M. J., Zubkov, M. V. & Bibby, T. S. (2011).** Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution. *Trends in Biotechnology*, 29(12), 615-623.
- Stevenson, R. J. & Bahls, L. L. (1999).** Periphyton protocols, in: Barbour, M.T., Gerritsen, J., Snyder, B.D. & Stribling, J.B. (Eds), *Rapid bioassessment protocols for use in wadeable streams and rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates, and fish*. Second Edition. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, D.C, pp. 6-1 - 6-21.
- Stewart, K. D. & Mattox, K. R. (1978).** Structural evolution in the flagellated cells of green algae and land plants. *BioSystems*, 10(1-2), 145-152.

- Stolz, P. & Obermayer, B. (2005).** Manufacturing microalgae for skin care. *Cosmetics and Toiletries*, 120(3), 99-106.
- Stoynova-Bakalova, E. & Toncheva-Panova, T. (2003).** Subcellular adaptation to salinity and irradiance in *Dunaliella salina*. *Biologia Plantarum*, 47(2), 233-236.
- Streftaris, N. & Zenetos, A. (2009).** Evidence of climate change on Greek marine and coastal biodiversity. *9th Symposium on Oceanography & Fisheries, 2009 - Proceedings*, Volume I, 675-680.
- Subhash, G. V., Rohit, M. V., Devi, M. P., Swamy, Y. V. & Mohan, S. V. (2014).** Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater. *Bioresource Technology*, 169, 789-793.
- Suh, I. S. & Lee, C. G. (2003).** Photobioreactor engineering: design and performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(6), 313.
- Sullivan, B. E. & Andersen, R. A. (2001).** Salinity tolerances of 62 strains of *Pfiesteria* and *Pfiesteria*-like heterotrophic flagellates (Dinophyceae). *Phycological Research*, 49(3), 207-214.
- Sun, Y., Wang, H., Guo, G., Pu, Y. & Yan, B. (2014).** The isolation and antioxidant activity of polysaccharides from the marine microalgae *Isochrysis galbana*. *Carbohydrate Polymers*, 113, 22-31.
- Sunda, W. G., Price, N. M., & Morel, F. M. M. (2005), Sunda, W. G. 2000.** Trace metal ion buffers and their use in culture studies, in: Andersen, R. A. (Ed.), *Algal culturing techniques*. Elsevier, Cambridge, pp. 35-63.
- Supamattaya, K., Kiriratnikom, S., Boonyaratpalin, M. & Borowitzka, L. (2005).** Effect of a *Dunaliella* extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 248(1-4), 207-216.
- Swaaf, M. D. (2003).** Docosahexaenoic acid production by the marine alga *Cryptothecodinium cohnii* (Doctoral dissertation, Delft, Delft Technical University). Accessed from: <https://repository.tudelft.nl/islandora/object/uuid:dbef725de-614f-41be-adba-85e4ee7ae949?collection=research>
- Schwarz, G. (1978).** Estimating the dimension of a model. *The Annals of Statistics*, 6(2), 461-464.
- Sylaios, G. & Theocharis, V. (2002).** Hydrology and nutrient enrichment at two coastal lagoon systems in Northern Greece. *Water Resources Management*, 16(3), 171-196.
- Sym, S. D. & Pienaar, R. N. (1993).** Further observations on *Trichocystis*, a subgenus of *Pyramimonas* (Prasinophyceae, Chlorophyta). *Phycologia*, 32(5), 338-350.
- Tagliapietra, D. & Ghirardini, A. V. (2006).** Notes on coastal lagoon typology in the light of the EU Water Framework Directive: Italy as a case study. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 16(5), 457-467.
- Taha, O., Abo El-Kheir, W., Hammouda, F. & Abd El-Hady, H. (2012, January).** Production of β -carotene and glycerol from *Dunaliella bardawil* and *D. salina* isolated from the Egyptian wet-lands Qarun and Bardawil. *International Conference on Ecological, Environmental and Biological Sciences* pp. 369-373.
- Tai, E. K., Wang, X. B. & Chen, Z. Y. (2013).** An update on adding docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (AA) to baby formula. *Food & Function*, 4(12), 1767-1775.
- Takaichi, S. (2011).** Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine Drugs*, 9(6), 1101-1118.
- Talebi, A. F., Mohtashami, S. K., Tabatabaei, M., Tohidfar, M., Bagheri, A., Zeinalabedini, M., Mirzaei, H. H., Mirzajanzadeh, M., Shafaroudi, S. M. & Bakhtiari, S. (2013).** Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Research*, 2(3), 258-267.
- Talero, E., García-Mauriño, S., Ávila-Román, J., Rodríguez-Luna, A., Alcaide, A. & Motilva, V. (2015).** Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer. *Marine Drugs*, 13(10), 6152-6209.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. & Kumar, S. (2013).** MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Tanner, R., Glenn, E. P. & Moore, D. (1999).** Food chain organisms in hypersaline, industrial evaporation ponds. *Water Environment Research*, 71(4), 494-505.
- Tanoue, E. & Aruga, Y. (1975).** Encystment of *Platymonas* in culture. *Mer. (Tokyo)*, 15, 37-42.
- Temina, M., Rezankova, H., Rezanka, T. & Dembitsky, V. M. (2007).** Diversity of the fatty acids of the *Nostoc* species and their statistical analysis. *Microbiological Research*, 162(4), 308-321.
- Teo, C. L., Atta, M., Bukhari, A., Taisir, M., Yusuf, A. M. & Idris, A. (2014).** Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. *Bioresource Technology*, 162, 38-44.
- Teodoresco, E.C. (1905).** Organisation et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocacée - Polyblepharidée. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt* 18(Abt. 1), 215-232.
- Terry, K. L. & Raymond, L. P. (1985).** System design for the autotrophic production of microalgae. *Enzyme and Microbial Technology*, 7(10), 474-487.

- Thamatrakoln, K., Korenovska, O., Niheu, A. K. & Bidle, K. D. (2012).** Whole-genome expression analysis reveals a role for death-related genes in stress acclimation of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Environmental Microbiology*, 14(1), 67-81.
- The EU Water Framework Directive - integrated river basin management for Europe, 2000.** https://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/index_en.html (Accessed on January 3 2020).
- Theodorou, J. A. (2002).** Current and future technological trends of European seabass-seabream culture. *Reviews in Fisheries Science*, 10(3-4), 529-543.
- Thronsdon, J. (1996).** The planktonic marine flagellates, in: Tomas, C.R. (Ed.), Identifying marine phytoplankton (1997). Academic Press, San Diego, pp. 591-730.
- Thronsdon, J. & Zingone, A. (1988).** *Tetraselmis wettsteinii* (Schiller) Thronsdon comb. nov. and its occurrence in golfo di Napoli. *Plant Biosystem*, 122(3-4), 227-235.
- Tillmann, U. & Hansen, P. J. (2009).** Allelopathic effects of *Alexandrium tamarense* on other algae: evidence from mixed growth experiments. *Aquatic Microbial Ecology*, 57(1), 101-112.
- Toba, T., Shidoji, Y., Fujii, J., Moriwaki, H., Muto, Y., Suzuki, T., Ohishi, T. & Yagi, K. (1997).** Growth suppression and induction of heat-shock protein-70 by 9-cis β -carotene in cervical dysplasia-derived cells. *Life sciences*, 61(8), 839-845.
- Tomas, C. R. (Ed.). (1997).** Identifying marine phytoplankton. Academic Press, San Diego.
- Tominaga, K., Hongo, N., Karato, M. & Yamashita, E. (2012).** Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects. *Acta Biochimica Polonica*, 59(1).
- Tracewell, C. A., Vrettos, J. S., Bautista, J. A., Frank, H. A. & Brudvig, G. W. (2001).** Carotenoid photooxidation in photosystem II. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 61-69.
- Tragin, M., Lopes dos Santos, A., Christen, R. & Vulot, D. (2016).** Diversity and ecology of green microalgae in marine systems: an overview based on 18S rRNA gene sequences. *Perspectives in Phycology*, 3, 141-154.
- Tsai, H. P., Chuang, L. T. & Chen, C. N. N. (2016).** Production of long chain omega-3 fatty acids and carotenoids in tropical areas by a new heat-tolerant microalga *Tetraselmis* sp. DS3. *Food Chemistry*, 192, 682-690.
- Tseng, C. K. (2001).** Algal biotechnology industries and research activities in China. *Journal of Applied Phycology*, 13(4), 375-380.
- Tukey, J. W. (1949).** Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*, 99-114.
- Turmel, M., de Cambiaire, J. C., Otis, C. & Lemieux, C. (2016).** Distinctive architecture of the chloroplast genome in the chlorodendrophycean green algae *Scherffelia dubia* and *Tetraselmis* sp. CCMP 881. *PLoS One*, 11(2).
- Tyler, P. A. (1996).** The significance of north-east Tasmania for the biogeography of endemic Australian freshwater algae. *Geography of Northeast Tasmania: Records of the Queen Victoria Museum*, 133-135.
- Tzovenis, I. P. (2001).** Optimisation of the biomass and fatty acid production of the microalga *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-ISO) for aquacultural and industrial purposes (Doctoral dissertation, Ghent University).
- Tzovenis, I., Fountoulaki, E., Dolapsakis, N., Kotzamanis, I., Nengas, I., Bitis, I., Cladas, Y. & Economou-Amilli, A. (2009).** Screening for marine nanoplanktic microalgae from Greek coastal lagoons (Ionian Sea) for use in mariculture. *Journal of Applied Phycology*, 21(4), 457.
- Ursi, S., Pedersén, M., Plastino, E. & Snoeijs, P. (2003).** Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). *Marine Biology*, 142(5), 997-1007.
- Vadrucci, M. R., Sabetta, L., Fiocca, A., Mazziotti, C., Silvestri, C., Cabrini, M., Kongjka, E. & Basset, A. (2008).** Statistical evaluation of differences in phytoplankton richness and abundance as constrained by environmental drivers in transitional waters of the Mediterranean basin. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 18(S1), S88-S104.
- Van den Hoek C., Mann D.G. & Jahns H.M. (1995).** Algae: An introduction to Phycology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Van de Peer, Y. & De Wachter, R. (1997).** Evolutionary relationships among the eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. *Journal of Molecular Evolution*, 45(6), 619-630.
- Van Houwelingen, A. C., Sørensen, J. D., Hornstra, G., Simonis, M. M., Boris, J., Olsen, S. F. & Secher, N. J. (1995).** Essential fatty acid status in neonates after fish-oil supplementation during late pregnancy. *British Journal of Nutrition*, 74(5), 723-731.
- Vaquero, I., Ruiz-Domínguez, M. C., Márquez, M. & Vílchez, C. (2012).** Cu-mediated biomass productivity enhancement and lutein enrichment of the novel microalga *Coccomyxa onubensis*. *Process Biochemistry*, 47(5), 694-700.

- Varzakakou, M., Roukas, T. & Kotzekidou, P. (2010).** Effect of the ratio of (+) and (-) mating type of *Blakeslea trispora* on carotene production from cheese whey in submerged fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(12), 2151-2156.
- Vasavada, N. (2016).** One-way ANOVA (ANalysis Of VAriance) with post-hoc Tukey HSD (Honestly Significant Difference) Test Calculator for comparing multiple treatments. Available at: https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/ (Accessed on 10 March 2020)
- Vasileiadou, K., Pavlouidi, C., Kalantzi, I., Apostolaki, E. T., Chatzigeorgiou, G., Chatzinikolaou, E., Pafilis, E., Papageorgiou, N., Fanini, L., Konstas, S., Fragopoulou, N. & Arvanitidis, C. (2016).** Environmental variability and heavy metal concentrations from five lagoons in the Ionian Sea (Amvrakikos Gulf, W Greece). *Biodiversity Data Journal*, (4).
- Venkatesan, J., Manivasagan, P. & Kim, S. K. (2015).** Marine microalgae biotechnology: present trends and future advances, in: Kim, S. K. (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae*. Academic Press, Cambridge, pp. 1-9.
- Ventosa, A. & Nieto, J. J. (1995).** Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(1), 85-94.
- Verbruggen, H., Vlaeminck, C., Sauvage, T., Sherwood, A. R., Leliaert, F. & De Clerck, O. (2009).** Phylogenetic analysis of *Pseudochlorodesmis* strains reveals cryptic diversity above the family level in the siphonous green algae (Bryopsidales, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 45(3), 726-731.
- Vieira, L. R. & Guilhermino, L. (2012).** Multiple stress effects on marine planktonic organisms: influence of temperature on the toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Tetraselmis chuii*. *Journal of Sea Research*, 72, 94-98.
- Viprey, M., Guillou, L., Ferréol, M. & Vaulot, D. (2008).** Wide genetic diversity of picoplanktonic green algae (Chloroplastida) in the Mediterranean Sea uncovered by a phylum-biased PCR approach. *Environmental Microbiology*, 10(7), 1804-1822.
- Viso, A. C. & Marty, J. C. (1993).** Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry*, 34(6), 1521-1533.
- Vo, H. N. P., Ngo, H. H., Guo, W., Nguyen, T. M. H., Liu, Y., Liu, Y., Nguyen, D. D. & Chang, S. W. (2019).** A critical review on designs and applications of microalgae-based photobioreactors for pollutants treatment. *Science of the Total Environment*, 651, 1549-1568.
- Vo, T. & Tran, D. (2014).** Carotene and antioxidant capacity of *Dunaliella salina* strains. *World Journal of Nutrition and Health*, 2(2), 21-23.
- Vogler, A. P. & Monaghan, M. T. (2007).** Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45(1), 1-10.
- Volkman, J. K. & Johns, R. B. (1977).** The geochemical significance of positional isomers of unsaturated acids from an intertidal zone sediment. *Nature*, 267(5613), 693-694.
- Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Nichols, P. D., Rogers, G. I. & Garland, C. D. (1989).** Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 128(3), 219-240.
- Von Dassow, P., Chepurnov, V. A. & Armbrust, E. V. (2006).** Relationships between growth rate, cell size, and induction of spermatogenesis in the centric diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*, 42(4), 887-899.
- Von Dassow, P., Petersen, T. W., Chepurnov, V. A. & Virginia Armbrust, E. (2008).** Inter- and intraspecific relationships between nuclear DNA content and cell size in selected members of the centric diatom genus *Thalassiosira* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 44(2), 335-349.
- Von Lintig, J. & Babino, D. (2020).** Vitamin A and Other Carotenoids, in: De Caterina, R., Martinez, J. A. & Kohlmeier, M. (Ed.), *Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics*. Academic Press, London, pp. 237-244.
- Vonshak, A. (1986).** Laboratory techniques for the cultivation of microalgae, in: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Mass Culture* (2017). CRC Press, Boca Raton, p. 117-146.
- Vorst, P., Baard, R. L., Mur, L. R., Korthals, J. J. & Van der Ende, H. (1994).** Effect of growth arrest on carotene accumulation and photosynthesis in *Dunaliella*. *Microbiology* 140, 1411-1417.
- Walne, P. R. (1970).** Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fisheries Investigations Series 2*, 26(5), pp. 62.
- Wang, C. & Lan, C. Q. (2018).** Effects of shear stress on microalgae—a review. *Biotechnology Advances*, 36(4), 986-1002.
- Wang, S. K., Hu, Y. R., Wang, F., Stiles, A. R. & Liu, C. Z. (2014).** Scale-up cultivation of *Chlorella ellipsoidea* from indoor to outdoor in bubble column bioreactors. *Bioresource Technology*, 156, 117-122.
- Wang, X. D. (1994).** Absorption and metabolism of beta-carotene. *Journal of the American College of Nutrition*, 13(4), 314-325.

- Wei, L., Huang, X. & Huang, Z. (2015).** Temperature effects on lipid properties of microalgae *Tetraselmis subcordiformis* and *Nannochloropsis oculata* as biofuel resources. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 33(1), 99-106.
- Wei, S., Bian, Y., Zhao, Q., Chen, S., Mao, J., Song, C., Cheng, K. Xiao, Z. Zhang, C. Ma, W. Zou, H., Ye, M. & Zou, H. (2017).** Salinity-induced palmella formation mechanism in halotolerant algae *Dunaliella salina* revealed by quantitative proteomics and phosphoproteomics. *Frontiers in Plant Science*, 8, 810.
- Weldy, C. S. & Huesemann, M. (2007).** Lipid production by *Dunaliella salina* in batch culture: effects of nitrogen limitation and light intensity. *Journal of Undergraduate Research*, 7, 115-122.
- Wen, Z. & Zhi-Hui, H. (1999).** Biological and ecological features of inland saline waters in North Hebei, China. *International Journal of Salt Lake Research*, 8(3), 267-285.
- West, G.S. (1916).** Algological notes XVIII-XXIII. *Journal of Botany, British and Foreign* 54, 1-10.
- Wheeler, W. C. & Honeycutt, R. L. (1988).** Paired sequence difference in ribosomal RNAs: evolutionary and phylogenetic implications. *Molecular Biology and Evolution*, 5(1), 90-96.
- Whelan, J. & Rust, C. (2006).** Innovative dietary sources of n-3 fatty acids. *Annual Review of Nutrition*, 26, 75-103.
- White, A. L. & Jahnke, L. S. (2002).** Contrasting effects of UV-A and UV-B on photosynthesis and photoprotection of β -carotene in two *Dunaliella* spp. *Plant and Cell Physiology*, 43(8), 877-884.
- Whittaker, R. J., Willis, K. J. & Field, R. (2001).** Scale and species richness: towards a general, hierarchical theory of species diversity. *Journal of Biogeography*, 28(4), 453-470.
- Whittaker, R. J., Araújo, M. B., Jepson, P., Ladle, R. J., Watson, J. E. & Willis, K. J. (2005).** Conservation biogeography: assessment and prospect. *Diversity and Distributions*, 11(1), 3-23.
- Wijffels, R. H., Kruse, O. & Hellingwerf, K. J. (2013).** Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(3), 405-413.
- Wijffels, R. H., Barbosa, M. & Janssen, M. (2019).** Cultivation of *Dunaliella* for high-value compounds, in: Ben-Amotz, A., Polle, J. E. W. & Rao, D. V. S. (Eds.), *The alga Dunaliella*. CRC Press, Boca Raton, pp. 104-123.
- Wikfors, G. H., Patterson, G. W., Ghosh, P., Lewin, R. A., Smith, B. C. & Alix, J. H. (1996).** Growth of post-set oysters, *Crassostrea virginica*, on high-lipid strains of algal flagellates *Tetraselmis* spp. *Aquaculture*, 143(3-4), 411-419.
- Wilcox, L. W., Lewis, L. A., Fuerst, P. A. & Floyd, G. L. (1992).** Group I introns within the nuclear-encoded small-subunit rRNA gene of three green algae. *Molecular Biology and Evolution*, 9(6), 1103-1118.
- Williams, P. J. L. B. & Laurens, L. M. (2010).** Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, 3(5), 554-590.
- Wolff, W. J. (1968).** The halophilous vegetation of the lagoons of Mesolonghi, Greece. *Vegetatio*, 95-134.
- Wongsnansilp, T., Yokthongwattana, K., Roytrakul, S. & Juntawong, N. (2019).** β -carotene Production of UV-C induced *Dunaliella salina* under salt stress. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13(1), 193-200.
- Wood, A. M. & Leatham, T. (1992).** The species concept in phytoplankton ecology. *Journal of Phycology*, 28(6), 723-729.
- Woodworth, L. M., Montgomery, M. E., Briscoe, D. A. & Frankham, R. (2002).** Rapid genetic deterioration in captive populations: causes and conservation implications. *Conservation Genetics*, 3(3), 277-288.
- Worden, A. Z., Nolan, J. K. & Palenik, B. (2004).** Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton: the importance of the eukaryotic component. *Limnology and Oceanography*, 49(1), 168-179.
- Wu, Z., Duangmanee, P., Zhao, P., Juntawong, N. & Ma, C. (2016).** The effects of light, temperature, and nutrition on growth and pigment accumulation of three *Dunaliella salina* strains isolated from saline soil. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(1), e26732.
- Wu, Z., Dejitsakdi, W., Kermanee, P., Ma, C., Arirob, W., Sathasivam, R. & Juntawong, N. (2017).** Outdoor cultivation of *Dunaliella salina* KU 11 using brine and saline lake water with raceway ponds in northeastern Thailand. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 64(6), 938-943.
- Xia, S., Wang, K., Wan, L., Li, A., Hu, Q. & Zhang, C. (2013).** Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Marine Drugs*, 11(7), 2667-2681.
- Xu, D., Gao, Z., Li, F., Fan, X., Zhang, X., Ye N., Mou, S., Liang, C. & Li, D. (2013).** Detection and quantitation of lipid in the microalga *Tetraselmis subcordiformis* (Wille) Butcher with BODIPY 505/515 staining. *Bioresource Technology*, 127, 386-390.

- Xue, L., Pan, W., Jiang, G. & Wang, J. (2006).** U.S. Patent No. 7,081,567. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M. & Takriff, M. S. (2014).** An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21(1), 6.
- Yadala, S. & Cremaschi, S. (2014).** Design and optimization of artificial cultivation units for algae production. *Energy*, 78, 23-39.
- Yamamoto, M., Nozaki, H., Miyazawa, Y., Koide, T. & Kawano, S. (2003).** Relationship between presence of a mother cell wall and speciation in the unicellular microalga *Nannochloris* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 39(1), 172-184.
- Yan-Xia, Z. H. A. O., Zheng, W. F. & Jiang-Chun, W. E. I. (2007).** Effects of Abscisic Acid on The accumulation of β -carotene and polysaccharides in *Dunaliella salina* SZ-05. *Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 1.
- Yao, C., Ai, J., Cao, X., Xue, S. & Zhang, W. (2012).** Enhancing starch production of a marine green microalga *Tetraselmis subcordiformis* through nutrient limitation. *Bioresource Technology*, 118, 438-444.
- Ying, K., Zimmerman, W. B. & Gilmour, D. J. (2014).** Effects of CO and pH on growth of the microalga *Dunaliella salina*. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 6(3), 167-173.
- Young, A. J. & Lowe, G. L. (2018).** Carotenoids—antioxidant properties. *Antioxidants* 7(2), 28.
- Zamenhof, S. & Eichhorn, H. H. (1967).** Study of microbial evolution through loss of biosynthetic functions: establishment of "defective" mutants. *Nature*, 216(5114), 456-458.
- Zeisel, S. H. (1999).** Regulation of "nutraceuticals". *Science* 285(5435), 1853--1855.
- Zeyl, C. & Bell, G. (1997).** The advantage of sex in evolving yeast populations. *Nature*, 388(6641), 465-468.
- Zhang, J., Sun, Z., Sun, P., Chen, T. & Chen, F. (2014).** Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health. *Food & Function*, 5(3), 413-425.
- Zhong, W., Zhang, Z., Luo, Y., Qiao, W., Xiao, M. & Zhang, M. (2012).** Biogas productivity by co-digesting Taihu blue algae with corn straw as an external carbon source. *Bioresource Technology*, 114, 281-286.
- Zhu, C., Zhai, X., Jia, J., Wang, J., Han, D., Li, Y., Tang, Y., Chi, Y. & Chi, Z. (2018).** Seawater desalination concentrate for cultivation of *Dunaliella salina* with floating photobioreactor to produce β -carotene. *Algal Research*, 35, 319-324.
- Zhu, Y. H. & Jiang, J. G. (2008).** Continuous cultivation of *Dunaliella salina* in photobioreactor for the production of β -carotene. *European Food Research and Technology*, 227(3), 953-959.
- Zhukova, N. V. & Aizdaicher, N. A. (1995).** Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, 39(2), 351-356.
- Zingone, A., Montresor, M. & Marino, D. (1990).** Summer phytoplankton physiognomy in coastal waters of the Gulf of Naples. *Marine Ecology*, 11(2), 157-172.
- Zingone, A., Philips, E. J. & Harrison, P. J. (2010).** Multiscale variability of twenty-two coastal phytoplankton time series: a global scale comparison. *Estuaries and Coasts* 33, 224–229 (2010).
- Zittelli, G. C., Rodolfi, L., Biondi, N. & Tredici, M. R. (2006).** Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, 261(3), 932-943.
- Zullaikah, S., Utomo, A. T., Yasmin, M., Ong, L. K. & Ju, Y. H. (2019).** Ecofuel conversion technology of inedible lipid feedstocks to renewable fuel, in: Azad, K. (Ed), *Advances in Eco-Fuels for a Sustainable Environment*. Woodhead Publishing, Sawston, pp. 237-276.
- Zuluaga, M., Gueguen, V., Pavon-Djavid, G. & Letourneur, D. (2017).** Carotenoids from microalgae to block oxidative stress. *BiolImpacts*, 7(1), 1.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.

Συνταγή Θρεπτικού Διαλύματος Walne (Walne 1970)

A. Πυκνά διαλύματα (stocks)

(1) Διάλυμα Ιχνοστοιχείων (TMS)

	ανά 100 mL
ZnCl ₂	2.1 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	2.0 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.9 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	2.0 g

Συμπληρώνουμε έως τα 100mL με απεσταγμένο H₂O. Το διάλυμα είναι συνήθως νεφελώδες. Προσθέτουμε λίγες σταγόνες πυκνού διαλύματος HCl ώστε να γίνει διαυγές.

(2) Διάλυμα Βιταμινών

	ανά 100 mL
Vitamin B12. (Cyanocobalamin)	10.0 mg
Vitamin B1 (Thiamine.HCl)	10.0 mg
Vitamin H (Biotin)	200.0 μg

Συμπληρώνουμε έως τα 100mL με απεσταγμένο H₂O

(3) Θρεπτικό Διάλυμα

	ανά 1L
FeCl ₃ .6H ₂ O	1.3 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.36 g
H ₃ BO ₃	33.6 g
EDTA (Disodium salt)	45.0 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	20.0 g
NaNO ₃	100.0 g
TMS (1)	1.0 ml

Συμπληρώνουμε έως το 1L με απεσταγμένο H₂O

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.

Ενδεικτικά πρωτόκολλα PCR όπου αναγράφονται οι αναλογίες αντιδραστηρίων και οι παράμετροι της διαδικασίας για κάθε γονίδιο, και οι αντίστοιχες εικόνες των ηλεκτροφορήσεων του προϊόντος.

A. Γονίδιο *rbcl*

Number of PCR: 5						Date: 23/05/14	
Description (locus): <i>rbcl</i>							
PCR MEGA-MIX					Composition of Cycles		
	STOCK	Concentration	One reaction (25 µL)	Total reactions volume (x 19) =475	Stage	°C	Time
Taq buffer	5X	1X	5	135	Pro-incubation	95	3'
MgCl ₂	25mM	5 mM	5	135	Denaturation	94	15"
dNTP's	10mM	0,2 mM	0,5	13,5	Annealing	48	1'
Primer A	10µM	0,4 µM	1	27	Extension	72	1,5'
Primer B	10µM	0,4 µM	1	27	Another Step	72	10'
Taq polymerase	5u/λ	0,02	0,1	2,7	Number of cycles	40	
Detergent W					Standby temp.	16	
BSA	10 mg/ml	1 µg/µl	2,5	67,5	Programme	COD_COI	48
ddH ₂ O			8,9	240,3			
TOTAL MIX				648			
number of DNA samples (volume 1λ of DNA)			27	675	Hytest		
4,0uL							
Primer A: RH_15							
Primer B: Cen 1161							
Samples				Gel picture			
1	Mes 20	22	T.suecica 1/50				
2	Mes 20 1/100	23	T.suecica 1/100				
3	Mes 20 1/200	24	PS. V 2_2				
4	Mes_5	25	Blank				
5	Mes_5 1/50						
6	Mes_17						
7	Mes_17 1/50						
8	V 2_3						
9	V 2_3 1/50						
10	R 1_1						
11	R 1_1 1/50						
12	R 1_2						
13	R 1_2 1/50						
14	R 1_3						
15	R 1_3 1/50						
16	T 3_1						
17	T 3_1 1/50						
18	T. chuii						
19	T. chuii 1/50						
20	T. chuii 1/100						
21	T.suecica						

B. Γονίδιο 18S rRNA

Number of PCR: 1					Date: 08/02/16	
Description (locus): 18S						
PCR MEGA-MIX					Composition of Cycles	
	STOCK	Concentration	One reaction (25 µL)	Total reactions volume (x 19) =475	Stage	°C Time
Taq buffer	10X	1X	2,5	45	Pro-incubation	95 3'
MgCl ₂	25mM	5 mM	5	90	Denaturation	94 15"
dNTP's	10mM	0,2 mM	0,5	9	Annealing	48 1'
Primer A	10µM	0,4 µM	1	18	Extension	72 1,5'
Primer B	10µM	0,4 µM	1	18	Another Step	72 10'
Taq polymerase	5u/λ	0,02	0,1	1,8	Number of cycles	40
Detergent W					Standby temp.	16
BSA	10 mg/ml	1 µg/µl	2,5	45	Programme	COD_COI 48
ddH ₂ O			11,4	205,2		
TOTAL MIX				432		
number of DNA samples (volume 1λ of DNA)			18	450	Hystest	
2,0uL						
Primer A: Euk328f						
Primer B: Eukr329F						
Samples					Gel picture	
1	R 1-1	25	49	73		
2	R 1-2	26	50	74		
3	R 1-3	27	51	75		
4	R 9-2	28	52	76		
5	R 9-3	29	53	77		
6	T 3-1	30				
7	T 3-2	31				
8	V 2-2	32				
9	V 2-3	33				
10	Mes 5	34				
11	Mes 17	35				
12	Mes 20	36				
13	T. Chui	37				
14	T.sue	38				
15	66/6	39				
16	blank	40				
17		41				
18		42				
19		43				
20		44	68	92		
21		45	69	93		
22		46	70	94		
23		47	71	95		
24		48	72	96		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3.

Στοιχεία δειγματοληψιών πεδίου στο σύστημα Μεσολόγγι-Αιτωλικό την περίοδο 2015-2016.

Α. Αβιοτικές Παράμετροι

Ημ/νία	Σταθμός	Συντεταγμένες	Ώρα	Δείγμα	T (°C)	S (‰)	pH
29/03/2015		38 26 15.79°N	07.45	1	15	12	7,8
29/03/2015	A	21 21 23.73°E	07.54	2	15,7	12,1	7,8
29/03/2015			08.10	3	15,8	12,2	7,8
29/03/2015			08.24	1	14,9	16,3	8,2
29/03/2015	M1	38 25 17.43°N	08.35	2	15,1	16,2	8
29/03/2015		21 21 42.25°E	08.42	3	15,3	16,1	7,83
29/03/2015			09.05	1	16,7	34,5	7,26
29/03/2015	M2	38 19 56.82°N	09.17	2	16,8	34,7	7,28
29/03/2015		21 25 33.22°E	09.24	3	16,9	34,3	7,3
29/03/2015			09.34	1	16,6	38,1	8,01
29/03/2015	M3	38 19 33.75°N	09.42	2	16,6	38,1	8,02
29/03/2015		21 25 02.80°E	09.55	3	16,9	38,1	8
12/7/2015		38 26 15.79°N	07.15	1	24,2	14,5	7,9
12/7/2015	A	21 21 23.73°E	07.28	2	24,6	14,1	7,6
12/7/2015			07.35	3	24,1	14	
12/7/2015			07.54	1	22,3	19,5	8,21
12/7/2015	M1	38 25 17.43°N	08.11	2	22,3	19,5	8,2
12/7/2015		21 21 42.25°E	08.22	3	22	19,5	8,22
12/7/2015			08.48	1	31,2	62,2	7
12/7/2015	M2	38 19 56.82°N	08.59	2	31,4	60,8	7,2
12/7/2015		21 25 33.22°E	09.12	3	31	60	7,1
12/7/2015			09.25	1	24,3	40	7,91
12/7/2015	M3	38 19 33.75°N	09.36	2	24,3	40	7,89
12/7/2015		21 25 02.80°E	09.47	3	24,3	40	7,96
15/10/2015		38 26 15.79°N	08.45	1	22,7	10,3	7,8
15/10/2015	A	21 21 23.73°E	08.57	2	22,5	10,2	7,8
15/10/2015			09.06	3	22,9	10,4	7,8
15/10/2015			09.24	1	22,1	13,7	8,11
15/10/2015	M1	38 25 17.43°N	09.38	2	22,1	13,7	8,1
15/10/2015		21 21 42.25°E	09.49	3	22,1	13,7	8,12
15/10/2015			10.02	1	27,3	40	7,5
15/10/2015	M2	38 19 56.82°N	10.13	2	27	37,9	7,98
15/10/2015		21 25 33.22°E	10.24	3	27	37,3	8,07
15/10/2015			10.38	1	22,6	37,9	8,2
15/10/2015	M3	38 19 33.75°N	10.45	2	22,6	37,9	8,2
15/10/2015		21 25 02.80°E	10.57	3	22,6	37,9	
31/01/2016		38 26 15.79°N	07.58	1	13,2	11,7	7,8
31/01/2016	A	21 21 23.73°E	08.10	2	13	11,7	7,7
31/01/2016			08.21	3	13,1	11,8	7,7
31/01/2016			08.40	1	12,3	15,5	8
31/01/2016	M1	38 25 17.43°N	08.54	2	12,3	15,5	7,98
31/01/2016		21 21 42.25°E	09.05	3	12,3	15,5	7,97
31/01/2016			09.33	1	16,9	39	7,92
31/01/2016	M2	38 19 56.82°N	09.42	2	16,9	37,1	7,92
31/01/2016		21 25 33.22°E	09.55	3	17	35,2	7,93
31/01/2016			10.12	1	15,9	37	8,2
31/01/2016	M3	38 19 33.75°N	10.27	2	16	37	8,2
31/01/2016		21 25 02.80°E	10.42	3	15,9	37	8,2

B. Σύνθεση Βιοκοινωνιών

Μέσος όρος μετρήσεων 140 μικροσκοπικών πεδίων ανά δείγμα και αναγωγή στο 1L.

B1. Σταθμός Αιτωλικού

Σταθμός	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Εποχή	Άνοιξη			Καλοκαίρι			Φθινόπωρο			Χειμώνας		
Ημ/νια	29/03/2015			12/7/2015			15/10/2015			31/01/2016		
Δείγμα	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Πεδία	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140
Αφθονία (κύπαρα/L)	83090	80690	76130	423170	352540	336780	60030	50700	52500	47260	32240	38340
Nanoplankton	35200	36410	31290	365020	285630	299150	25900	22550	21750	32900	25300	24750
Diatoms	12450	11870	12580	26130	32080	17090	12780	12540	11280	12740	5960	12200
Cryptophytes	300	240	420	210	100	290	960	20	520	430	360	320
Haptophytes	80	50	20	160	90	110	0	10	20	0	20	70
Cyanobacteria	34080	31600	31220	31120	34570	20140	20360	15430	18810	1100	600	1000
Dinoflagellates	980	520	600	530	70	0	30	150	120	90	0	0

B2. "Υφάλμυρος" σταθμός Μεσολογίου (M1)

Σταθμός	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1	M1
Εποχή	Άνοιξη			Καλοκαίρι			Φθινόπωρο			Χειμώνας		
Ημ/νια	29/03/2015			12/7/2015			15/10/2015			31/01/2016		
Δείγμα	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Πεδία	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140
Αφθονία (κύπαρα/L)	78930	64070	83800	78430	67300	86500	61950	48250	57200	62150	40000	54510
Nanoplankton	34500	28940	33160	30960	27520	30320	38100	39100	35900	34600	32100	36800
Diatoms	10900	12630	13070	22500	21600	29400	14200	7200	12500	17400	5800	13100
Cryptophytes	1020	870	1080	1320	80	1000	3300	1600	4700	4300	1200	2600
Haptophytes	410	230	590	210	60	360	2900	50	950	50	0	10
Cyanobacteria	21800	20200	30300	20400	15800	24100	1900	0	2000	3300	600	1200
Dinoflagellates	10300	1200	5600	3040	2240	1320	1550	300	1150	2500	300	800

B3. Σταθμός Αλυκών Μεσολογίου (M2)

Σταθμός	M2	M2	M2	M2	M2	M2	M2	M2	M2	M2	M2	M2
Εποχή	Άνοιξη			Καλοκαίρι			Φθινόπωρο			Χειμώνας		
Ημέρα	29/03/2015			12/7/2015			15/10/2015			31/01/2016		
Δείγμα	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Πεδία	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140
Αφθονία (κύπαρα/L)	334	194	375	111	202	20	313	175	31	102	293	466
Nanoplankton	136	90	200	85	99	5	200	100	6	80	190	420
Diatoms	160	80	120	0	32	4	31	45	20	13	54	26
Cryptophytes	0	0	0	0	0	0	36	0	0	0	28	8
Haptophytes	20	0	10	0	30	0	0	0	0	0	0	0
Cyanobacteria	0	24	0	0	0	0	25	0	5	0	0	0
Dinoflagellates	18	0	45	26	41	11	21	30	0	9	21	12

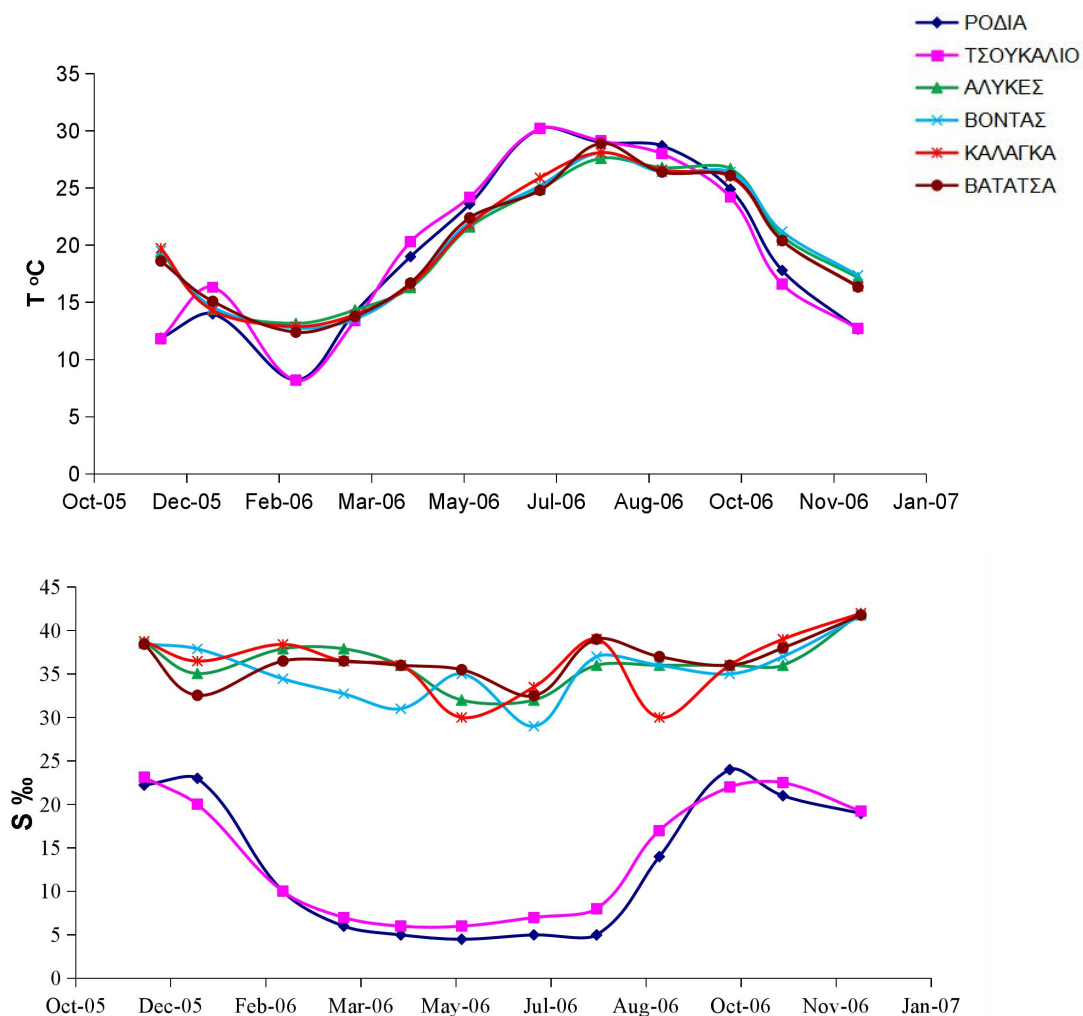
B3. “Θαλάσσιος σταθμός Μεσολογίου (M3)

Σταθμός	M3	M3	M3	M3	M3	M3	M3	M3	M3	M3	M3	M3
Εποχή	Άνοιξη			Καλοκαίρι			Φθινόπωρο			Χειμώνας		
Ημέρα	29/03/2015			12/7/2015			15/10/2015			31/01/2016		
Δείγμα	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Πεδία	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140
Αφθονία (κύπαρα/L)	100130	93580	84510	87385	69110	65112	94710	104424	85284	68940	77088	76869
Nanoplankton	41200	38900	36000	22780	21960	30650	45120	48200	39880	46020	39730	43850
Diatoms	23050	22630	19120	21750	11230	8480	16900	15700	19600	6930	11650	12110
Cryptophytes	1240	2920	1180	490	390	680	14500	17700	9200	6800	15200	11600
Haptophytes	1540	980	810	970	1040	1098	140	78	91	204	90	0
Cyanobacteria	10400	7800	9100	18245	13600	4164	6970	12540	6590	236	498	859
Dinoflagellates	22700	20350	18300	23150	20890	20040	11080	10206	9923	8750	9920	8450

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4.

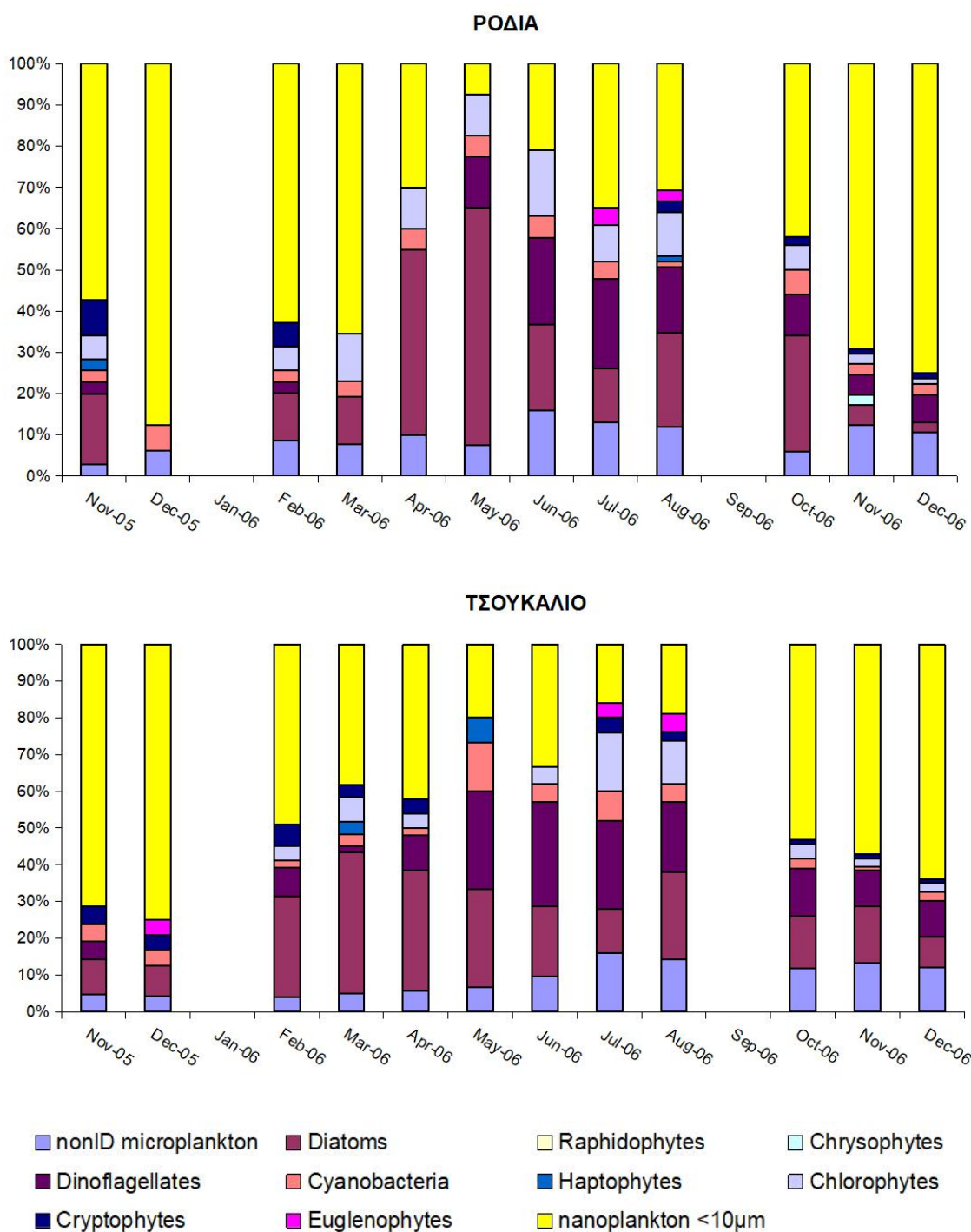
Δεδομένα αβιοτικών παραμέτρων και σύνθεσης φυκο-κοινωνιών στους σταθμούς δειγματοληψίας στις λιμνοθάλασσες της Ηπείρου κατά την περίοδο 2005-2006. Επεξεργασία αδημοσίευτων δεδομένων από Tzovenis, Kladas, Chantzistrountsiou, Kantourou, Economidou-Amilli.

Α. Αβιοτικές Παράμετροι



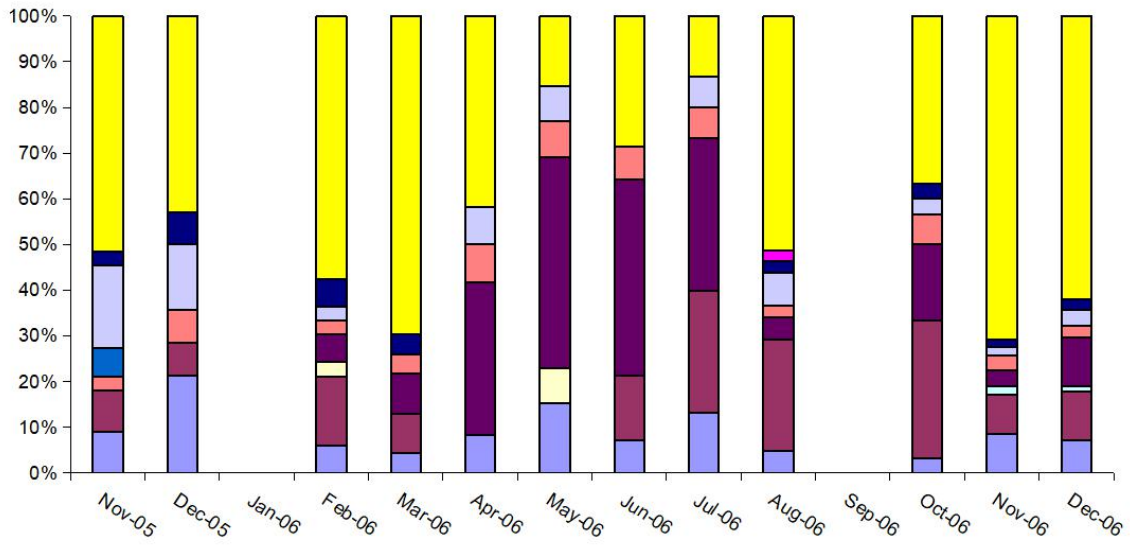
Ετήσια κατανομή θερμοκρασίας και αλατότητας στους σταθμούς δειγματοληψίας των λιμνοθαλασσών της Ηπείρου κατά τη δειγματοληπτική περίοδο (2005-2006).

Β. Σύνθεση Βιοκοινωνιών

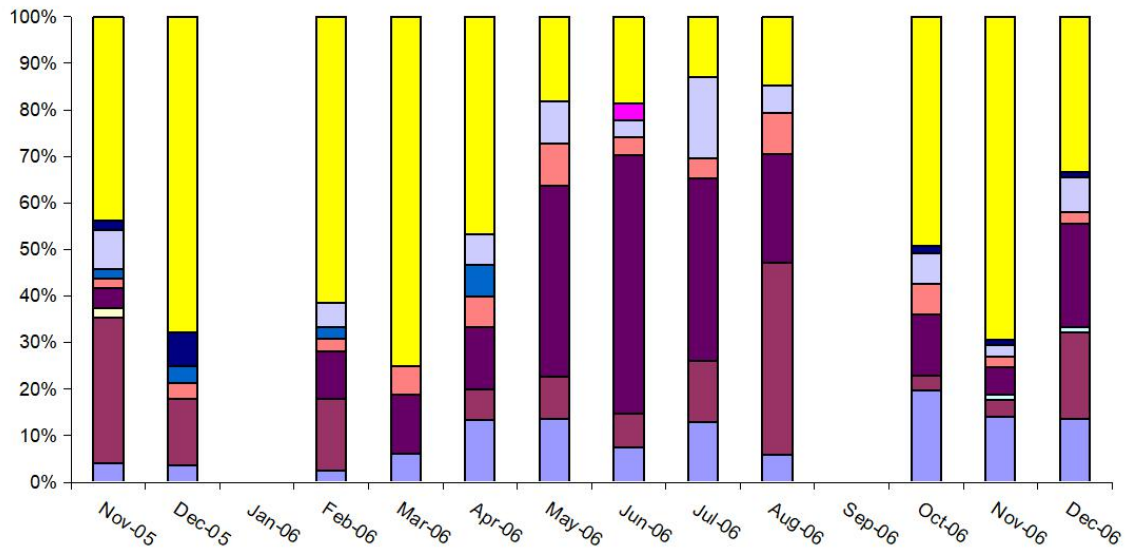


Ετήσια κατανομή της αφθονίας των διαφόρων ομάδων μικροφυκών στους σταθμούς δειγματοληψίας των λιμνοθαλασσών της Ηπείρου κατά τη δειγματοληπτική περίοδο (2005-2006). (i) Ροδιά και Τσουκαλιό (Δέλτα ποταμού Λούρου, Αμβρακικός κόλπος).

ΚΑΛΑΓΚΑ

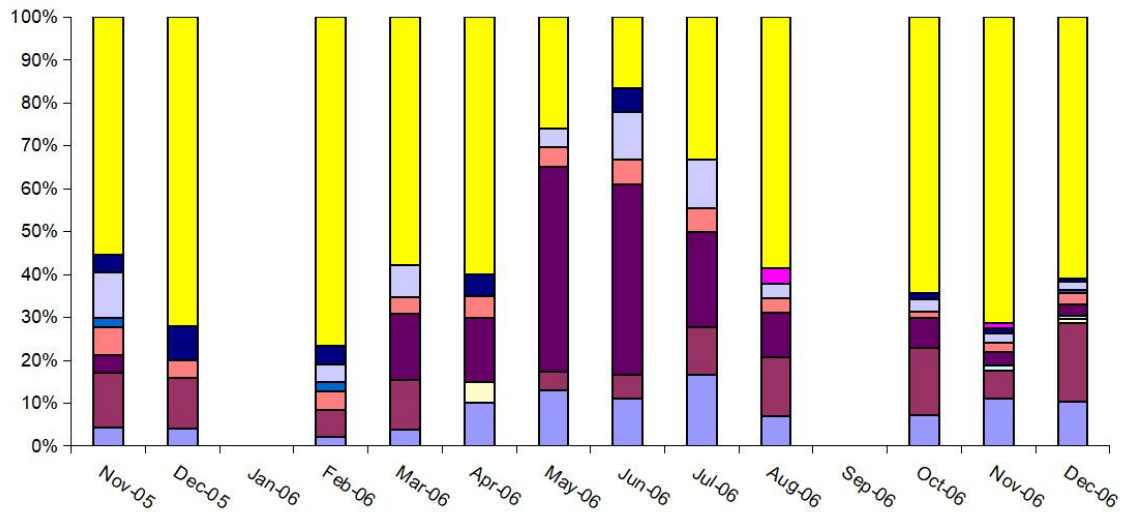


ΒΑΤΑΤΣΑ

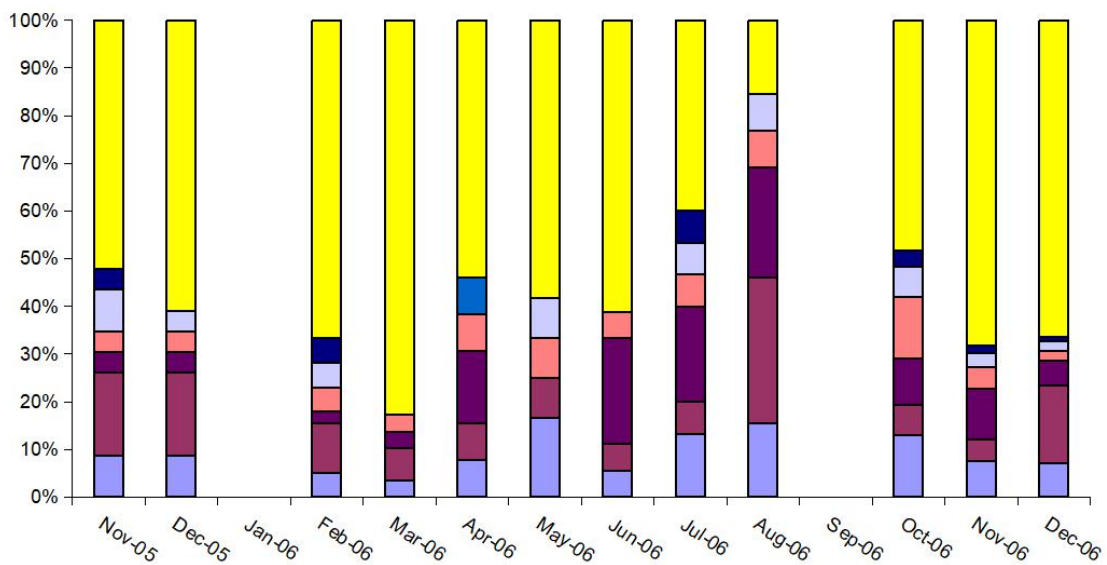


Ετήσια κατανομή της αφθονίας των διαφόρων ομάδων μικροφυκών στους σταθμούς δειγματοληψίας των λιμνοθαλασσών της Ηπείρου κατά τη δειγματοληπτική περίοδο (2005-2006). (ii) Βατάτσα και Καλάγκα (Δέλτα ποταμού Καλαμά).

ΑΛΥΚΕΣ



ΒΟΝΤΑΣ



Ετήσια κατανομή της αφθονίας των διαφόρων ομάδων μικροφυκών στους σταθμούς δειγματοληψίας των λιμνοθαλασσών της Ηπείρου κατά τη δειγματοληπτική περίοδο (2005-2006). (iii) Αλυκές και Βόντας (Δέλτα ποταμού Καλαμά).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5.

A. Βιομετρικά στοιχεία των μελετηθέντων στελεχών AthU-AI *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens*.

A/A	H (μm)	W (μm)	Βιο-όγκος (μm ³ ·cell ⁻¹)	H/W (L/2r)
1	12,89	7,25	354,75	1,78
2	10,94	6,95	276,57	1,57
3	14,38	8,51	545,06	1,69
4	13,39	8,81	544,00	1,52
5	11,88	8,88	490,56	1,34
6	12,00	9,75	597,39	1,23
7	13,39	11,01	849,32	1,22
8	15,20	10,39	858,45	1,46
9	11,70	9,45	546,94	1,24
10	12,13	8,88	500,81	1,37
11	12,57	8,88	519,11	1,42
12	10,69	10,57	624,81	1,01
13	11,51	9,20	509,94	1,25
14	10,82	11,38	733,40	0,95
15	13,39	10,07	710,53	1,33
16	10,94	7,94	361,23	1,38
17	11,19	9,38	515,09	1,19
18	11,70	9,82	590,89	1,19
19	14,08	8,81	572,10	1,60
20	10,51	8,39	387,01	1,25
21	10,94	9,70	538,52	1,13
22	12,32	10,44	703,33	1,18
23	9,79	8,14	339,24	1,20
24	8,88	8,81	360,99	1,01
25	11,38	7,82	364,21	1,46
26	9,75	8,81	396,29	1,11
27	11,95	6,95	302,12	1,72
28	11,70	10,44	667,91	1,12
29	13,44	8,81	546,16	1,53
30	10,50	7,75	329,78	1,35
31	9,82	7,25	270,33	1,35
32	11,19	7,13	297,46	1,57
33	15,20	9,45	710,19	1,61
34	10,82	8,81	439,53	1,23
35	10,64	7,45	308,74	1,43
36	12,39	8,94	517,94	1,39
37	11,83	9,45	552,74	1,25
38	9,33	5,50	147,45	1,70
39	10,94	8,26	390,84	1,32
40	11,51	9,95	595,82	1,16
41	10,76	8,01	361,75	1,34
42	10,82	9,08	466,46	1,19
Average	11,69	8,84	492,76	1,34
std	1,47	1,23		
max	15,20	11,38		
min	8,88	5,50		

AthU-AI R 9-2

A/A	H (μm)	W (μm)	Βιο-όγκος (μm ³ ·cell ⁻¹)	H/W (L/2r)
1	13,76	12,57	1137,88	1,09
2	13,63	9,57	654,12	1,42
3	12,13	9,08	523,04	1,34
4	13,71	8,56	526,04	1,60
5	12,07	8,51	457,69	1,42
6	13,63	8,14	472,60	1,68
7	15,57	11,76	1125,80	1,32
8	11,19	8,51	424,09	1,31
9	11,13	9,45	520,42	1,18
10	11,19	8,26	399,71	1,35
11	10,39	7,25	285,95	1,43
12	12,20	9,26	546,85	1,32
13	11,70	8,69	462,25	1,35
14	12,32	9,82	622,22	1,25
15	13,88	11,63	982,90	1,19
16	12,39	9,63	601,20	1,29
17	12,32	10,14	663,31	1,22
18	14,33	10,27	790,15	1,40
19	12,07	9,57	579,26	1,26
20	10,20	8,07	347,24	1,26
21	12,89	8,44	480,50	1,53
22	12,32	10,27	679,65	1,20
23	11,19	8,81	454,66	1,27
24	14,08	10,07	747,24	1,40
25	12,57	9,20	557,09	1,37
26	13,01	9,20	576,73	1,41
27	12,70	9,38	584,47	1,35
28	13,26	10,76	803,93	1,23
29	12,20	8,44	454,72	1,45
30	11,06	10,32	616,55	1,07
31	10,27	8,19	360,50	1,25
32	10,57	8,32	382,41	1,27
33	11,51	8,19	404,08	1,40
34	10,89	9,20	482,44	1,18
35	10,94	7,45	317,49	1,47
36	9,50	8,81	386,21	1,08
37	10,51	7,50	309,51	1,40
38	9,70	7,45	281,47	1,30
39	13,44	10,00	703,35	1,34
40	10,69	9,20	473,80	1,16
41	12,07	8,81	490,68	1,37
42	12,64	9,57	606,48	1,32
43	12,32	9,20	546,09	1,34
44	10,82	8,32	391,40	1,30
45	10,82	7,94	357,13	1,36
46	12,25	10,64	725,64	1,15
47	13,71	9,88	699,57	1,39
48	11,88	9,20	526,44	1,29
49	13,14	8,01	441,61	1,64
50	12,39	10,39	700,19	1,19

AthU-AI R 9-3

51	11,19	8,39	411,81	1,33
52	11,51	7,96	381,66	1,45
53	12,25	9,45	572,63	1,30
54	14,01	10,51	810,36	1,33
55	12,77	10,07	677,60	1,27
56	13,32	11,45	914,21	1,16
57	13,14	9,63	637,32	1,36
58	13,58	9,63	658,82	1,41
59	11,33	8,39	417,03	1,35
60	10,32	7,82	330,17	1,32
Average	12,14	9,22	557,94	1,32
std	1,29	1,13		
max	15,57	12,57		
min	9,50	7,25		

A/A	H (μm)	W (μm)	Βιο-όγκος (μm ³ ·cell ⁻¹)	H/W (L/2r)
1	12,89	9,66	628,71	1,33
2	8,38	6,29	173,38	1,33
3	9,25	8,79	373,80	1,05
4	8,51	6,91	212,40	1,23
5	6,50	5,52	103,86	1,18
6	6,63	4,16	59,99	1,59
7	6,38	5,03	84,39	1,27
8	8,51	4,53	91,41	1,88
9	7,76	6,41	166,95	1,21
10	5,76	3,66	40,42	1,57
11	11,89	10,54	691,71	1,13
12	7,89	7,28	218,71	1,08
13	12,76	10,79	777,61	1,18
14	8,51	6,78	204,83	1,25
15	8,76	6,91	218,60	1,27
16	10,88	8,41	403,23	1,29
17	8,88	9,03	379,31	0,98
18	9,00	4,53	96,74	1,99
19	8,26	5,52	131,89	1,50
20	10,26	8,29	369,10	1,24
21	11,01	10,29	610,36	1,07
22	9,52	7,65	291,63	1,24
23	7,39	6,16	146,87	1,20
24	5,39	4,53	57,88	1,19
25	8,01	6,53	179,02	1,23
26	9,13	7,28	253,12	1,25
27	9,64	7,78	305,10	1,24
28	9,13	8,04	308,92	1,14
29	6,75	4,66	76,58	1,45
30	8,51	4,53	91,41	1,88
31	8,51	6,91	212,40	1,23
Average	8,73	6,88	256,78	1,31
std	1,84	1,97		
max	12,89	10,79		
min	5,39	3,66		

AthU-AI V 2-2

A/A	H (μm)	W (μm)	Βιο-όγκος ($\mu\text{m}^3\cdot\text{cell}^{-1}$)	H/W (L/2r)
1	14,95	8,01	502,40	1,87
2	13,01	9,50	615,13	1,37
3	13,76	9,20	609,73	1,50
4	11,13	6,63	256,24	1,68
5	13,01	7,13	346,01	1,83
6	13,19	9,88	673,32	1,34
7	10,64	7,32	298,53	1,45
8	14,33	8,26	511,83	1,73
9	14,01	8,76	562,37	1,60
10	11,26	8,14	390,25	1,38
11	12,00	7,82	384,07	1,54
12	11,51	7,45	333,95	1,55
13	11,19	6,83	272,83	1,64
14	13,63	8,44	508,25	1,62
15	13,14	7,20	356,30	1,83
16	14,13	7,82	452,14	1,81
17	13,88	8,07	472,85	1,72
18	11,83	7,13	314,43	1,66
19	9,63	7,89	313,66	1,22
20	11,19	8,51	424,09	1,31
21	11,19	7,50	329,35	1,49
22	11,38	7,70	352,74	1,48
23	12,94	9,26	580,24	1,40
24	12,39	10,51	717,01	1,18
25	11,63	7,57	348,90	1,54
26	13,44	9,63	651,94	1,40
27	13,28	10,07	704,89	1,32
28	14,08	9,13	614,29	1,54
29	10,51	7,77	331,85	1,35
30	13,14	8,88	542,54	1,48
31	12,70	8,94	530,54	1,42
Average	12,52	8,29	461,38	1,52
std	1,33	1,01		
max	14,95	10,51		
min	9,63	6,63		

AthU-AI Mes 5

AthU-AI Mes 17

A/A	H (μm)	W (μm)	Βιο-όγκος (μm ³ ·cell ⁻¹)	H/W (L/2r)
1	15,89	11,76	1148,88	1,35
2	11,38	8,39	418,98	1,36
3	12,25	10,89	759,90	1,13
4	11,51	9,01	488,55	1,28
5	9,50	7,62	289,10	1,25
6	9,63	6,26	197,37	1,54
7	9,38	7,13	249,37	1,32
8	11,51	6,63	264,81	1,74
9	10,76	8,51	407,95	1,26
10	8,76	5,76	152,21	1,52
11	14,89	12,64	1245,66	1,18
12	10,89	9,38	501,21	1,16
13	15,76	12,89	1370,60	1,22
14	11,51	8,88	475,18	1,30
15	11,76	9,01	499,09	1,31
16	13,88	10,51	803,18	1,32
17	11,88	11,13	770,79	1,07
18	12,00	6,63	276,23	1,81
19	11,26	7,62	342,49	1,48
20	13,26	10,39	749,27	1,28
21	14,01	12,39	1125,96	1,13
22	12,52	9,75	622,98	1,28
23	10,39	8,26	371,20	1,26
24	8,39	6,63	192,99	1,26
25	11,01	8,63	429,63	1,28
26	12,13	9,38	558,35	1,29
27	12,64	9,88	645,27	1,28
28	12,13	10,14	652,81	1,20
29	9,75	6,76	232,89	1,44
30	11,51	6,63	264,81	1,74
31	11,51	9,01	488,55	1,28
Average	11,73	8,98	548,27	1,33
std	1,84	1,97		
max	15,89	12,89		
min	8,39	5,76		

B. Στατιστική Επεξεργασία - One-Way Anova + post-hoc Tukey HSD Test

(Πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του διαδικτυακού λογισμικού που είναι διαθέσιμο στην ιστοσελίδα: <https://astatsa.com>)

I. Μηκος κυτάρου (H)

Descriptive statistics

Treatment →	A	B	C	D	E	Pooled Total
observations N	42	60	31	31	31	195
sum $\sum x_i$	491.1702	728.5638	363.6348	270.6348	388.1028	2,242.1064
mean \bar{x}	11.6945	12.1427	11.7302	8.7302	12.5194	11.4980
sum of squares $\sum x_i^2$	5,832.0419	8,944.5560	4,366.7173	2,463.9088	4,911.8269	26,519.0509
sample variance s^2	2.1473	1.6577	3.3742	3.3742	1.7665	3.8111
sample std. dev. s	1.4654	1.2875	1.8369	1.8369	1.3291	1.9522
std. dev. of mean SE_x	0.2261	0.1662	0.3299	0.3299	0.2387	0.1398

One-Way Anova

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	298.0678	4	74.5169	32.0840	1.1102e-16
error	441.2856	190	2.3226		
total	739.3533	194			

Tukey-test (έλεγχος πραγματικής σημαντικότητας)

treatments pair	Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-value	Tukey HSD inference
A vs B	2.0673	0.5768875	insignificant
A vs C	0.1396	0.8999947	insignificant
A vs D	11.6174	0.0010053	** p<0.01
A vs E	3.2329	0.1539825	insignificant
B vs C	1.7309	0.7111290	insignificant
B vs D	14.3169	0.0010053	** p<0.01
B vs E	1.5805	0.7711689	insignificant
C vs D	10.9602	0.0010053	** p<0.01
C vs E	2.8836	0.2514831	insignificant
D vs E	13.8438	0.0010053	** p<0.01

II. Πλάτος κυττάρου (W)

Descriptive statistics

Treatment →	A	B	C	D	E	Pooled Total
observations N	42	60	31	31	31	195
sum $\sum x_i$	371.2943	553.2092	278.5106	213.4106	256.9326	1,673.3574
mean \bar{x}	8.8403	9.2202	8.9842	6.8842	8.2881	8.5813
sum of squares $\sum x_i^2$	3,344.0637	5,176.4414	2,619.0389	1,586.0042	2,159.8797	14,885.4280
sample variance s^2	1.5048	1.2842	3.8947	3.8947	1.0128	2.7104
sample std. dev. s	1.2267	1.1332	1.9735	1.9735	1.0064	1.6463
std. dev. of mean $SE_{\bar{x}}$	0.1893	0.1463	0.3544	0.3544	0.1808	0.1179

One-Way Anova

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	124.2860	4	31.0715	14.7029	1.7544e-10
error	401.5258	190	2.1133		
total	525.8119	194			

Tukey-test (έλεγχος πραγματικής σημαντικότητας)

treatments pair	Tukey HSD Q statistic	Tukey HSD p-value	Tukey HSD inference
A vs B	1.8366	0.6689688	insignificant
A vs C	0.5911	0.8999947	insignificant
A vs D	8.0367	0.0010053	** p<0.01
A vs E	2.2687	0.4963247	insignificant
B vs C	1.0377	0.8999947	insignificant
B vs D	10.2738	0.0010053	** p<0.01
B vs E	4.0991	0.0336997	* p<0.05
C vs D	8.0430	0.0010053	** p<0.01
C vs E	2.6659	0.3288374	insignificant
D vs E	5.3771	0.0017899	** p<0.01

III. Βιο-όγκος κυττάρου (Biovol.)

Descriptive statistics

Treatment →	A	B	C	D	E	Pooled Total
observations N	42	60	31	31	31	195
sum $\sum x_i$	20,695.7415	33,476.3273	16,996.2926	7,960.3206	14,302.6679	93,431.3499
mean \bar{x}	492.7557	557.9388	548.2675	256.7845	461.3764	479.1351
sum of squares $\sum x_i^2$	11,256,137.9810	20,789,116.0062	12,439,440.8256	3,186,188.6263	7,175,412.5741	54,846,296.0132
sample variance s^2	25,809.5698	35,786.0092	104,030.8640	38,070.0467	19,216.6447	51,959.0425
sample std. dev. s	160.6536	189.1719	322.5382	195.1155	138.6241	227.9453
std. dev. of mean $SE_{\bar{x}}$	24.7894	24.4220	57.9296	35.0438	24.8976	16.3235

One-Way Anova

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	2,070,960.6782	4	517,740.1695	12.2824	6.6616e-09
error	8,009,093.5628	190	42,153.1240		
total	10,080,054.2409	194			

Tukey-test (έλεγχος πραγματικής σημαντικότητας)

A vs B	2.2317	0.5112883	insignificant
A vs C	1.6148	0.7574458	insignificant
A vs D	6.8644	0.0010053	** p<0.01
A vs E	0.9128	0.8999947	insignificant
B vs C	0.3012	0.8999947	insignificant
B vs D	9.3783	0.0010053	** p<0.01
B vs E	3.0071	0.2132805	insignificant
C vs D	7.9046	0.0010053	** p<0.01
C vs E	2.3564	0.4587257	insignificant
D vs E	5.5482	0.0011448	** p<0.01

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με ανεξάρτητη μεταβλητή το στέλεχος και εξαρτημένη μεταβλητή την εκάστοτε διάσταση του κυττάρου (μήκος, πλάτος και βιο-όγκο). Στις αναλύσεις τα δείγματα αναφέρονται ως εξής:

A: AthU-AI R 9-2

B: AthU-AI R 9-3

C: AthU-AI Mes17

D: AthU-AI V 2-2

E: AthU-AI Mes 5

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6.

Αριθμοί καταχώρησης (accession numbers) και κωδικοί αναφοράς (reference codes) όλων των παραχθέντων και χρησιμοποιηθέντων αλληλουχιών στο φυλογενετικό δέντρο της Εικόνας 41.

Ταξον/Στέλεχος	Αριθμός Καταχώρησης (Accession Number)		Κωδικός Αναφοράς (Reference Code)
	rbcl	18 rRNA	
<i>Acetabularia acetabulum</i>	AY177738	AF493616	Acetab_acetab
<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> SAG 202-5	EF113406	X56100	Ankis_stipitatus
<i>Ascochloris multinucleata</i> UTEX 2013	EF113411	U63106	Ascochlor_multinucl
<i>Asterochloris phycobiontica</i>	KP318702	KP318695	Asterochl_phycob
<i>Auxenochlorella protothecoides</i> SAG 211-7a	AM260440	X56101	Auxen_prot_SAG_211_7a
<i>Auxenochlorella protothecoides</i> UTEX 2341	KT158712	KT158711	Auxen_prot_UTEX_2341
<i>Botryococcus braunii</i> AGB-Bb01	GU951521	GU951518	Botryo_braunii
<i>Bracteacoccus</i> sp. KF-2011e HKN28	HM770957	U63105	Bractea_sp
<i>Bryopsis plumosa</i>	FJ432637	FJ432630	Bryo_plumosa
<i>Bulbochaete</i> sp. ACOI 552	DQ481216	EF616484	Bulbo_sp
<i>Carteria crucifera</i>	D63431	D86501	Cart_cruc
<i>Cephaleuros virescens</i> SAG25.83	FJ534597	KM020143	Cephal_vires
<i>Characiochloris sasae</i> NIES-567	AB084338	AB360741	Charac_sasae
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90	AB511845	AB511834	Chlamyd_rein
<i>Chlorella vulgaris</i>	AB260909	AB488575	Chlor_vul_NIES_227
<i>Chlorella vulgaris</i>	AF499684	X13688	Chlor_vul_SAG_211_11b
<i>Chlorochytrium lemnae</i> CAUP:H6905	HE860266	HE860252	Chloroch_lem
<i>Chlorogonium euchlorum</i> SAG12-2d	AB010229	AJ410443	Chlorog_euchlorum

<i>Chloromonas reticulata</i>	AB022530	JN904006	Chloromonas_ret
<i>Chlorosarcinopsis eremi</i> BCP-FI5LVF16	HQ246346	HQ246313	Chlorosrc_eremi
<i>Chlorotetraedron incus</i> SAG 43.81	KC145512	AF288363	Chlorotet_incus
<i>Choricystis minor</i> SAG 251.1	DQ219818	X89012	Chori_minor
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i> SAG 216-7	JF502548	KF673358	Coccomyxa_sub
<i>Codium platylobium</i> KZN2K4-10 (GENT)	EF108067	FJ535849	Codium_plat
<i>Crustomastix stigmatica</i>	AF509626	AF509628	Crust_stig
<i>Desmodesmus serratus</i> KLL-G012	KP698037	KP726235	Desmod_serr
<i>Dictyochloropsis splendida</i> CAUP H8601	KC333607	GU017662	Dict_sple_CAUP_H8601
<i>Dunaliella salina</i> UTEX 200	DQ313197	DQ009779	Dun_salina
<i>Eudorina elegans</i>	D63432	LC086352	Eudor_elegans
<i>Geminella minor</i> GR36	EF113440	AF387151	Gemin_minor
<i>Gloeotilopsis planctonica</i>	AF499681	Z28970	Gloe_planct
<i>Hafniomonas laevis</i> NIES-257	AB101510	AB101517	Hafn_laevis
<i>Hamakko caudatus</i>	AB451193	AB451188	Hamakko_caudatus
<i>Hydrodictyon reticulatum</i> Carolina Biological Supply	EF078306	AY779858	Hydro_retic
<i>Micromonas pusilla</i> CCMP2099	AY955035	DQ025753	Micro_pusilla
<i>Monoraphidium griffithii</i> KLL-G017	KP698056	KP726255	Monoraph_griff
<i>Muriella</i> sp. BCP-ANP1VF3	KF693824	KF693790	Muriella_sp
<i>Mychonastes homosphaera</i> CAUP H6502	KC145515	GQ477056	Mychon_homos
<i>Myrmecia biatorellae</i>	AF499685	AY095367	Myrmecia_biator
<i>Nannochloris normandinae</i> SAG 9.82	JF502540	KM020167	Nannochl_norman
<i>Oedogonium cardiacum</i> SAG 575-1b	EF587355	EU123943	Oedog_cardiacum
<i>Oltmannsiellopsis viridis</i>	NC_008099	FN562431	Oltman_viridis

<i>Ourococcus multisporus</i>	KT369475	AF277648	Ourococcus_multi
<i>Pabia signiensis</i> SAG:7.90	NC_025529	AJ416108	Pabia_sign
<i>Pediastrum duplex</i> UTEX LB1364	EF078313	EF078312	Pediastrum_duplex
<i>Pedinomonas minor</i>	NC_016733	JN592588	Pedino_minor
<i>Picochlorum oculatum</i> UTEX LB 1998	EF113455	GQ122335	Picochl_ocul
Prasinophyceae sp. CCMP1205	AB491624	U40921	Prasino_sp_CCMP1205
<i>Prasiola crispa</i> isolate Gal	AY694195	EF200532	Pras_cri_GALW010001
<i>Prasiola crispa</i> SAG 43.96	AM260441	AJ416106	Pras_cri_SAG_43_96
<i>Protosiphon botryoides</i> FRT2000	JN880462	JN880459	Prot_botr_FRT2000
<i>Protosiphon botryoides</i> UTEX B 99	JN880463	JN880460	Prot_botr_UTEX_B_99
<i>Pseudoschroederia antillarum</i> SAG B 15.86	EF113466	AF277649	Pseudoschro_antill
<i>Pseudoscourfieldia marina</i>	U30279	AJ132619	Pseudosc_marina
<i>Pycnococcus provasolii</i>	NC_012097	X91264	Pycnoc_provas
<i>Pyramimonas tetrarynchus</i>	L34833	FN562441	Pyramim_tetrarynchus
<i>Rosenvingiella polyrhiza</i> isolate GC	AY694206	EF200515	Rosen_polyr
<i>Scenedesmus deserticola</i> strain BCP-YPG-Char	HQ246361	AY510463	Scened_desert
<i>Scherffelia dubia</i> SAG:17.86	NC_029807	HE610128	Scherf_dubia
<i>Selenastrum</i> sp. LU21	JQ415917	JQ360530	Selenastrum_sp
Sphaeropleales sp. KF-2013b strain BCP-WJT54VFNP11	KC145509	KC145434	Sphaeropleales_sp
<i>Stauridium tetras</i> KLL-G013	KP698068	KP726270	Staurid_tetras
<i>Tetraselmis</i> sp. MBTD-CMFRI-S028	KM202123	JF708135	Tetr_sp_MBTD_CMFRI_S028
<i>Tetraselmis</i> sp. MBTD-CMFRI-S057	KM202124	JF708151	Tetr_sp_MBTD_CMFRI_S057
<i>Tetraselmis</i> sp. MBTD-CMFRI-S075	KM202125	JF708160	Tetr_sp_MBTD_CMFRI_S075
<i>Tetraselmis</i> sp. MBTD-CMFRI-S081	KM202126	JF708167	Tetr_sp_MBTD_CMFRI_S081

<i>Tetraselmis</i> sp. MBTD-CMFRI-S082	KM202127	JF708168	Tetr_sp_MBDT_CMFRI_S082
<i>Tetraselmis</i> sp. MBTD-CMFRI-S101	KM202128	JF708178	Tetr_sp_MBDT_CMFRI_S101
<i>Trebouxia arboricola</i> P-360-IIa	AJ969665	AJ969609	Treb_arbor
<i>Trentepohlia aurea</i> SAG 483-1	FJ715722	KM020148	Trentep_aurea
<i>Trichophilus welckeri</i>	EF203012	AY762601	Trich_welck
<i>Ulothrix zonata</i>	AF499683	KU865575	Uloth_zonata
<i>Uronema belkae</i> UTEX 1179	EF113481	AF182821	Uro_belkae
<i>Volvox globator</i>	GU325797	AB542923	Volvox_globator
<i>Watanabea reniformis</i> SAG 211-9b	KM464714	X73991	Watan_renif
<i>Xylochloris irregularis</i> CAUP H 7801	KM438451	EU105209	Xylochl_irreg
<i>Tetraselmis verrucosa</i> f. <i>rubens</i> CCAP 66/6	KX904694	KX904700	Tetr_66_6
<i>Tetraselmis verrucosa</i> f. <i>rubens</i> strain Mes 5	KX904696	KX904702	Tetr_Mes_5
<i>Tetraselmis verrucosa</i> f. <i>rubens</i> strain Mes 17	KX904695	KX904701	Tetr_Mes_17
<i>Tetraselmis verrucosa</i> f. <i>rubens</i> strain R 9-2	KX904697	KX904703	Tetr_R_9_2
<i>Tetraselmis verrucosa</i> f. <i>rubens</i> strain R 9-3	KX904698	KX904704	Tetr_R_9_3
<i>Tetraselmis verrucosa</i> f. <i>rubens</i> strain V 2-2	KX904699	KX904705	Tetr_V_2_2

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 7.

Ανάλυση Διακύμανσης - One-Way Ανοva για κάθε συνθήκη (στέλεχος x αλατότητα) βάσει των αποτελεσμάτων του προκαταρκτικού πειράματος αλατότητας για κάθε ένα από τα στελέχη AthU-AI *Dunaliella* cf. *salina*. Σε όλες τις αναλύσεις ως ανεξάρτητη μεταβλητή λαμβάνεται η αλατότητα. Η ανάλυση έγινε σε 3 μετρήσεις ανά στέλεχος ανά αλατότητα.

1. Στέλεχος AthU-AI **Dun 2**

A. Εξαρτημένη μεταβλητή: κυτταρική πυκνότητα (cells·mL⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	1,303,578,112,747.8652	9	144,842,012,527.5406	367.5317	1.1102e-16
error	7,881,877,736.0010	20	394,093,886.8000		
total	1,311,459,990,483.8662	29			

B. Εξαρτημένη μεταβλητή: περιεκτικότητα κυτάρου σε β-καρωτένιο (pg·cell⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	892.6637	9	99.1849	624.0396	1.1102e-16
error	3.1788	20	0.1589		
total	895.8425	29			

2. Στέλεχος AthU-AI **Dun 3**

A. Εξαρτημένη μεταβλητή: κυτταρική πυκνότητα (cells·mL⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	768,594,000,000.0000	8	96,074,250,000.0000	352.1540	1.1102e-16
error	4,910,740,000.0000	18	272,818,888.8889		
total	773,504,740,000.0000	26			

B. Εξαρτημένη μεταβλητή: περιεκτικότητα κυτάρου σε β-καρωτένιο (pg·cell⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	464.0951	8	58.0119	4,801.7197	1.1102e-16
error	0.2175	18	0.0121		
total	464.3126	26			

3. Στέλεχος AthU-AI Dun 4

A. Εξαρτημένη μεταβλητή: κυτταρική πυκνότητα (cells·mL⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	51,242,580,000.0000	8	6,405,322,500.0000	1,301.8948	1.1102e-16
error	88,560,000.0000	18	4,920,000.0000		
total	51,331,140,000.0000	26			

B. Εξαρτημένη μεταβλητή: περιεκτικότητα κυτάρου σε β-καρωτένιο (pg·cell⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	103.6574	8	12.9572	49.5228	1.0794e-10
error	4.7095	18	0.2616		
total	108.3669	26			

4. Στέλεχος AthU-AI Dun 5

A. Εξαρτημένη μεταβλητή: κυτταρική πυκνότητα (cells·mL⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	2,805,372,080,000.0010	9	311,708,008,888.8890	664.8050	1.1102e-16
error	9,377,426,666.6660	20	468,871,333.3333		
total	2,814,749,506,666.6670	29			

B. Εξαρτημένη μεταβλητή: περιεκτικότητα κυτάρου σε β-καρωτένιο (pg·cell⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	0.0029	8	0.0004	529.4650	1.1102e-16
error	0.0000	18	0.0000		
total	0.0029	26			

5. Στέλεχος AthU-AI Dun 6

A. Εξαρτημένη μεταβλητή: κυτταρική πυκνότητα (cells·mL⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	179,625,713,666.6666	9	19,958,412,629.6296	709.7082	1.1102e-16
error	562,440,000.0000	20	28,122,000.0000		
total	180,188,153,666.6666	29			

B. Εξαρτημένη μεταβλητή: περιεκτικότητα κυτάρου σε β-καρωτένιο (pg·cell⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	298.0442	9	33.1160	600.2396	1.1102e-16
error	1.1034	20	0.0552		
total	299.1476	29			

6. Στέλεχος AthU-AI Dun 7

A. Εξαρτημένη μεταβλητή: κυτταρική πυκνότητα (cells·mL⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	475,996,285,714.2856	6	79,332,714,285.7143	1,503.5984	1.1102e-16
error	738,666,666.6665	14	52,761,904.7619		
total	476,734,952,380.9521	20			

B. Εξαρτημένη μεταβλητή: περιεκτικότητα κυτάρου σε β-καρωτένιο (pg·cell⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	22.4975	6	3.7496	1,215.1435	1.1102e-16
error	0.0432	14	0.0031		
total	22.5407	20			

7. Στέλεχος AthU-AI **Dun 8**

A. Εξαρτημένη μεταβλητή: κυτταρική πυκνότητα (cells·mL⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	105,485,625,000.0000	7	15,069,375,000.0000	703.6421	1.1102e-16
error	342,660,000.0000	16	21,416,250.0000		
total	105,828,285,000.0000	23			

B. Εξαρτημένη μεταβλητή: περιεκτικότητα κυτάρου σε β-καρωτένιο (pg·cell⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	339.8903	7	48.5558	983.8471	1.1102e-16
error	0.7896	16	0.0494		
total	340.6800	23			

8. Στέλεχος AthU-AI **Dun 29**

A. Εξαρτημένη μεταβλητή: κυτταρική πυκνότητα (cells·mL⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	210,632,485,333.3330	9	23,403,609,481.4814	719.2111	1.1102e-16
error	650,813,333.3335	20	32,540,666.6667		
total	211,283,298,666.6665	29			

B. Εξαρτημένη μεταβλητή: περιεκτικότητα κυτάρου σε β-καρωτένιο (pg·cell⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	12.9560	9	1.4396	191.6844	1.1102e-16
error	0.1502	20	0.0075		
total	13.1062	29			

9. Στέλεχος AthU-AI Dun 30

A. Εξαρτημένη μεταβλητή: κυτταρική πυκνότητα (cells·mL⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	16,920,300,000.0000	9	1,880,033,333.3333	40.7816	6.2771e-11
error	922,000,000.0000	20	46,100,000.0000		
total	17,842,300,000.0000	29			

B. Εξαρτημένη μεταβλητή: περιεκτικότητα κυτάρου σε β-καρωτένιο (pg·cell⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	437.1287	9	48.5699	214.1150	1.1102e-16
error	4.5368	20	0.2268		
total	441.6655	29			

10. Στέλεχος AthU-AI Dun 31

A. Εξαρτημένη μεταβλητή: κυτταρική πυκνότητα (cells·mL⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	8,585,200,000.0001	9	953,911,111.1111	40.3630	6.9106e-11
error	472,666,666.6666	20	23,633,333.3333		
total	9,057,866,666.6667	29			

B. Εξαρτημένη μεταβλητή: περιεκτικότητα κυτάρου σε β-καρωτένιο (pg·cell⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	501.1306	9	55.6812	64.0497	8.8229e-13
error	17.3869	20	0.8693		
total	518.5175	29			

11. Στέλεχος AthU-AI Dun 32

A. Εξαρτημένη μεταβλητή: κυτταρική πυκνότητα (cells·mL⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	13,916,700,000.0000	9	1,546,300,000.0000	17.9223	1.0091e-07
error	1,725,560,000.0000	20	86,278,000.0000		
total	15,642,260,000.0000	29			

B. Εξαρτημένη μεταβλητή: περιεκτικότητα κυτάρου σε β-καρωτένιο (pg·cell⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	670.9732	9	74.5526	69.4855	4.0445e-13
error	21.4585	20	1.0729		
total	692.4317	29			

12. Στέλεχος AthU-AI Dun 35

A. Εξαρτημένη μεταβλητή: κυτταρική πυκνότητα (cells·mL⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	2,760,868,800,000.0000	9	306,763,200,000.0000	1,798.1430	1.1102e-16
error	3,412,000,000.0000	20	170,600,000.0000		
total	2,764,280,800,000.0000	29			

B. Εξαρτημένη μεταβλητή: περιεκτικότητα κυτάρου σε β-καρωτένιο (pg·cell⁻¹)

source	sum of squares SS	degrees of freedom ν	mean square MS	F statistic	p-value
treatment	218.5765	9	24.2863	727.7878	1.1102e-16
error	0.6674	20	0.0334		
total	219.2439	29			

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 8.

Έλεγχος πραγματική σημαντικότητα (Tukey-Test) στα πλαίσια της πολυπαραγοντικής ανάλυσης διακύμανσης (MANOVA) βάσει των αποτελεσμάτων του διερευνητικού πειράματος αλατότητας (αεριζόμενες καλλιέργειες 260 mL) για κάθε ένα από τα στελέχη *AthU-AI Dunaliella cf. salina*. Σε όλες τις αναλύσεις ως ανεξάρτητες μεταβλητές λαμβάνονται το “στέλεχος” και η “αλατότητα”. Η ανάλυση έγινε σε 3 μετρήσεις ανά στέλεχος ανά αλατότητα.

(α) Κυτταρική πυκνότητα (Cell yield, cells·mL⁻¹)

TukeyHSD test; variable cell yield (cells/ml) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 4252E6, df = 48,000

strain	salinity	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}	{19}	{20}	{21}	{22}	{23}	{24}		
1 D 19/18	80		0,000189	0,0002	0,00051	0,000307	0,000189	0,000189	0,00019	0,000198	0,000246	0,000192	0,000189	0,000189	0,000189	0,073488	0,000215	0,190298	0,328033	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,076115	0,00025		
2 D 19/18	100	0,000189		0,956692	0,47658	0,666707	0,024998	0,957415	0,999798	0,968256	0,791175	0,993551	0,896942	1	1	0,007033	0,893794	0,002041	0,000916	0,007142	0,145025	0,033844	0,310346	0,006737	0,780574		
3 D 19/18	120	0,0002	0,956692		1	1	0,000233	0,058318	1	1	1	1	0,034397	0,492299	0,945169	0,567044	1	0,300553	0,171599	0,000197	0,000745	0,000256	0,00215	0,557122	1		
4 Dun 2	80	0,00051	0,47658		1		1	0,00019	0,004801	0,996279	0,999999	1	0,999917	0,002633	0,087571	0,443801	0,978949	1	0,85965	0,695627	0,000189	0,00021	0,000191	0,000279	0,977083	1	
5 Dun 2	100	0,000307	0,666707		1	1		0,000193	0,010833	0,999776		1	0,999999	0,005979	0,164414	0,633381	0,916732	1	0,701526	0,505978	0,000189	0,00025	0,000195	0,000438	0,91179	1	
6 Dun 2	120	0,000189	0,024998	0,000233	0,00019	0,000193		0,843501	0,000668	0,000244	0,000198	0,000326	0,925697	0,205816	0,028582	0,000189	0,000209	0,000189	0,000189		1	1	1	0,999984	0,000189	0,000197	
7 Dun 8	80	0,000189	0,957415	0,058318	0,004801	0,010833	0,843501		0,256439	0,067759	0,019037	0,122242	1	0,99999	0,966968	0,000197	0,033971	0,00019	0,000189	0,568337	0,996509	0,89324	0,999949	0,000196	0,018073		
8 Dun 8	100	0,00019	0,999798		1	0,996279	0,999776	0,000668	0,256439		1	0,999986	1	0,170525	0,893568	0,999639	0,187759	1	0,072323	0,03467	0,00029	0,004911	0,000895	0,014963	0,18225	0,999981	
9 Dun 8	120	0,000198	0,968256		1	0,999999	1	0,000244	0,067759		1	1	0,040302	0,533189	0,958967	0,525738	1	0,269456	0,150929	0,000199	0,000868	0,000272	0,002561	0,515906	1		
10 Dun 5	80	0,000246	0,791175		1	1		0,000198	0,019037	0,999986		1		1	0,010678	0,245832	0,762357	0,832174	1	0,566735	0,376859	0,00019	0,000315	0,000202	0,000678	0,824735	1
11 Dun 5	100	0,000192	0,993551		1	0,999917	0,999999	0,000326	0,122242		1	1	1	0,075669	0,702358	0,990759	0,364175	1	0,163967	0,085439	0,000216	0,001734	0,000398	0,005329	0,355632	1	
12 Dun 5	120	0,000189	0,896942	0,034397	0,002633	0,005979	0,925697		1	0,170525	0,040302	0,010678	0,075669		0,999819	0,914871	0,000192	0,019467	0,000189	0,000189	0,706304	0,999516	0,95537	0,999998	0,000192	0,010126	
13 Dun 6	80	0,000189		1	0,492299	0,087571	0,164414	0,205816	0,99999	0,893568	0,533189	0,245832	0,702358	0,999819		1	0,0006	0,358884	0,000281	0,000221	0,076797	0,627271	0,256037	0,857177	0,000581	0,237273	
14 Dun 6	100	0,000189		1	0,945169	0,443801	0,633381	0,028582	0,966968	0,999639	0,958967	0,762357	0,990759	0,914871		1	0,006076	0,873336	0,001772	0,000802	0,008245	0,161309	0,038553	0,005824	0,751172		
15 Dun 6	120	0,073488	0,007033	0,567044	0,978949	0,916732	0,000189	0,000197	0,187759	0,525738	0,832174	0,364175	0,000192	0,0006	0,006076		0,708127		1	1	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	1	0,841457	
16 Dun 30	80	0,000215	0,893794		1	1		0,000209	0,033971		1	1	1	0,019467	0,358884	0,873336	0,708127		0,424117	0,260166	0,000192	0,000462	0,00022	0,001197	0,698769	1	
17 Dun 30	100	0,190298	0,002041	0,300553	0,85965	0,701526	0,000189	0,00019	0,072323	0,269456	0,566735	0,163967	0,000189	0,000281	0,001772		1	0,424117		1	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	1	0,579456	
18 Dun 30	120	0,328033	0,000916	0,171599	0,695627	0,505978	0,000189	0,000189	0,03467	0,150929	0,376859	0,085439	0,000189	0,000221	0,000802		1	0,260166		1	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	1	0,388155	
19 Dun 31	80	0,000189	0,007142	0,000197	0,000189	0,000189		1	0,568337	0,00029	0,000199	0,00019	0,000216	0,706304	0,076797	0,008245	0,000189	0,000192	0,000189	0,000189		0,999963		1	0,997108	0,000189	0,00019
20 Dun 31	100	0,000189	0,145025	0,000745	0,00021	0,00025		1	0,996509	0,004911	0,000868	0,000315	0,001734	0,999516	0,627271	0,161309	0,000189	0,000462	0,000189	0,000189	0,999963		1	1	0,000189	0,000307	
21 Dun 31	120	0,000189	0,033844	0,000256	0,000191	0,000195		1	0,89324	0,000895	0,000272	0,000202	0,000398	0,95537	0,256037	0,038553	0,000189	0,00022	0,000189	0,000189		1	1		0,999998	0,000189	0,000201
22 Dun 32	80	0,000189	0,310346	0,00215	0,000279	0,000438	0,999984	0,999949	0,014963	0,002561	0,000678	0,005329	0,999998	0,857177	0,338069	0,000189	0,001197	0,000189	0,000189	0,997108		1	0,999998		0,000189	0,000648	
23 Dun 32	100	0,076115	0,006737	0,557122	0,977083	0,91179	0,000189	0,000196	0,18225	0,515906	0,824735	0,355632	0,000192	0,000581	0,005824		1	0,698769		1	1	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,834235	
24 Dun 32	120	0,00025	0,780574		1	1	1	0,000197	0,018073	0,999981		1	1	1	0,010126	0,237273	0,751172	0,841457		1	0,579456	0,388155	0,00019	0,000307	0,000201	0,000648	0,834235

Έντονη γραφή: στατιστικά σημαντικές τιμές (p<0.05)

(Λογισμικό εξαγωγής αποτελεσμάτων: TIBCO STATISTICA © TIBCO Software Inc.)

(β) Βιομάζα σε ξηρό βάρος (dry weight g·L⁻¹)

Tukey HSD test; variable dry weight (g/L) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00011, df = 48,000

	strain	salinity	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}	{19}	{20}	{21}	{22}	{23}	{24}
1	D 19/18	80		0,000193	0,019359	0,00847	0,000201	0,000189	0,000189	0,015197	0,19873	0,006475	0,000189	0,000189	0,000196	0,000189	0,998502	0,929078	1	0,999862	0,58198	1	0,609985	0,160933	0,000189	0,000189
2	D 19/18	100	0,000193		0,749113	0,89661	1	0,036567	0,999872	0,799651	0,183644	0,928261	0,998362	1	1	0,994104	0,001176	0,006424	0,000189	0,000661	0,038364	0,000191	0,034455	0,000189	0,000189	0,000189
3	D 19/18	120	0,019359	0,749113		1	0,882945	0,0002	0,096542	1	0,999999	1	0,054847	0,310777	0,822214	0,037197	0,480943	0,852268	0,005155	0,344857	0,994617	0,013543	0,992667	0,000189	0,000189	0,000189
4	Dun 2	80	0,00847	0,89661	1		0,967356	0,000224	0,183718	1	0,999872	1	0,110829	0,490575	0,938745	0,077685	0,303	0,6835	0,002197	0,201045	0,96508	0,005837	0,957012	0,000189	0,000189	0,000189
5	Dun 2	100	0,000201	1	0,882945	0,967356		0,01817	0,997935	0,915558	0,301201	0,980608	0,987411	0,999999	1	0,968991	0,002424	0,013487	0,000191	0,001313	0,073584	0,000196	0,066571	0,000189	0,000189	0,000189
6	Dun 2	120	0,000189	0,036567	0,0002	0,000224	0,01817		0,4891	0,000205	0,000189	0,000238	0,64734	0,182885	0,025935	0,745126	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189
7	Dun 8	80	0,000189	0,999872	0,096542	0,183718	0,997935	0,4891		0,117872	0,007581	0,221175	1	1	0,999425	1	0,0002	0,00029	0,000189	0,000193	0,001128	0,000189	0,001013	0,000189	0,000189	0,000189
8	Dun 8	100	0,015197	0,799651	1	1	0,915558	0,000205	0,117872		0,999994	1	0,068057	0,360041	0,864496	0,046573	0,424149	0,808132	0,004	0,296827	0,989848	0,010587	0,986652	0,000189	0,000189	0,000189
9	Dun 8	120	0,19873	0,183644	0,999999	0,999872	0,301201	0,000189	0,007581	0,999994		0,999614	0,003838	0,03676	0,237283	0,002469	0,967935	0,999744	0,07044	0,912743	1	0,152248	1	0,000192	0,000189	0,000189
10	Dun 5	80	0,006475	0,928261	1	1	0,980608	0,000238	0,221175	1	0,999614		0,136237	0,553049	0,960421	0,096688	0,256243	0,621718	0,00169	0,166204	0,945142	0,004458	0,934129	0,000189	0,000189	0,000189
11	Dun 5	100	0,000189	0,998362	0,054847	0,110829	0,987411	0,64734	1	0,068057	0,003838	0,136237		1	0,995052	1	0,000193	0,000232	0,000189	0,000191	0,000614	0,000189	0,000559	0,000189	0,000189	0,000189
12	Dun 5	120	0,000189	1	0,310777	0,490575	0,999999	0,182885	1	0,360041	0,03676	0,553049	1		1	0,999999	0,000282	0,000922	0,000189	0,000231	0,005722	0,000189	0,005077	0,000189	0,000189	0,000189
13	Dun 6	80	0,000196	1	0,822214	0,938745	1	0,025935	0,999425	0,864496	0,237283	0,960421	0,995052	1		0,985503	0,001675	0,009332	0,00019	0,000923	0,053395	0,000193	0,04812	0,000189	0,000189	0,000189
14	Dun 6	100	0,000189	0,994104	0,037197	0,077685	0,968991	0,745126	1	0,046573	0,002469	0,096688	1	0,999999	0,985503		0,000191	0,000213	0,000189	0,00019	0,000444	0,000189	0,000411	0,000189	0,000189	0,000189
15	Dun 6	120	0,998502	0,001176	0,480943	0,303	0,002424	0,000189	0,0002	0,424149	0,967935	0,256243	0,000193	0,000282	0,001675	0,000191		1	0,961037	1	0,999896	0,995447	0,99994	0,003279	0,000189	0,000189
16	Dun 30	80	0,929078	0,006424	0,852268	0,6835	0,013487	0,000189	0,00029	0,808132	0,999744	0,621718	0,000232	0,000922	0,009332	0,000213		1		0,701758	1	0,883549	1	0,00642	0,000189	0,000189
17	Dun 30	100	1	0,000189	0,005155	0,002197	0,000191	0,000189	0,000189	0,004	0,07044	0,00169	0,000189	0,000189	0,00019	0,000189	0,961037	0,701758		0,989155	0,291746	1	0,313613	0,382014	0,000189	0,000189
18	Dun 30	120	0,999862	0,000661	0,344857	0,201045	0,001313	0,000189	0,000193	0,296827	0,912743	0,166204	0,000191	0,000231	0,000923	0,00019	1	1	0,989155		0,998785	0,999394	0,9992	0,006191	0,000189	0,000189
19	Dun 31	80	0,58198	0,038364	0,994617	0,96508	0,073584	0,000189	0,001128	0,989848	1	0,945142	0,000614	0,005722	0,053395	0,000444	0,999896	1	0,291746	0,998785		0,495118	1	0,000235	0,000189	0,000189
20	Dun 31	100	1	0,000191	0,013543	0,005837	0,000196	0,000189	0,000189	0,010587	0,152248	0,004458	0,000189	0,000189	0,000193	0,000189	0,995447	0,883549	1	0,999394	0,495118		0,522758	0,209342	0,000189	0,000189
21	Dun 31	120	0,609985	0,034455	0,992667	0,957012	0,066571	0,000189	0,001013	0,986652	1	0,934129	0,000559	0,005077	0,04812	0,000411	0,99994	1	0,313613	0,9992	1	0,522758		0,000243	0,000189	0,000189
22	Dun 32	80	0,160933	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000192	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189
23	Dun 32	100	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189
24	Dun 32	120	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189

Έντονη γραφή: στατιστικά σημαντικές τιμές (p<0.05)

(Λογισμικό εξαγωγής αποτελεσμάτων: TIBCO STATISTICA © TIBCO Software Inc.)

(γ) Περικτικότητα κυττάρου σε β-καρωτένιο (b-carotene conten, $\mu\text{g} \cdot \text{cell}^{-1}$)

Tukey HSD test; variable b-carotene pg/cell Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,13612, df = 48,000

strain	salinity	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}	{19}	{20}	{21}	{22}	{23}	{24}	
1 D 19/18	80		0,000189	0,134332	0,000189	1	0,000189	0,124526	0,999995	0,000193	0,000189	0,995203	0,000189	0,000189		1	0,000212	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189
2 D 19/18	100	0,000189		0,000189	0,000189	0,000189	0,467149	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,014082	0,000189	0,000189	0,000189	
3 D 19/18	120	0,134332	0,000189		0,000189	0,124526	0,000189	0,00019	0,699987	0,263169	0,000189	0,958308	0,000189	0,000191	0,077264	0,000189	0,000189	0,000246	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,002588	0,000189	
4 Dun 2	80	0,000189	0,000189	0,000189		0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,721861	0,000189	0,000189	0,009543	0,000189	0,000189	0,932943	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
5 Dun 2	100	1	0,000189	0,124526	0,000189		0,000189	0,134332	0,999992	0,000193	0,000189	0,993741	0,000189	0,000189		1	0,000215	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
6 Dun 2	120	0,000189	0,467149	0,000189	0,000189	0,000189		0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
7 Dun 8	80	0,124526	0,000189	0,00019	0,000189	0,134332	0,000189		0,008573	0,000189	0,000189	0,001589	0,000189	0,000189	0,206763	0,536367	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
8 Dun 8	100	0,999995	0,000189	0,699987	0,000189	0,999992	0,000189	0,008573		0,000406	0,000189	1	0,000189	0,000189	0,999844	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
9 Dun 8	120	0,000193	0,000189	0,263169	0,000189	0,000193	0,000189	0,000189	0,000406		0,000189	0,001694	0,000189	0,086166	0,00019	0,000189	0,000189	0,454421	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000342	0,981556	0,000189	
10 Dun 5	80	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189		0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,986657	0,000189	0,000189	0,827235	0,000189	0,09858	0,001276	0,000189	0,699987	
11 Dun 5	100	0,995203	0,000189	0,958308	0,000189	0,993741	0,000189	0,001589	1	0,001694	0,000189		0,000189	0,000189	0,975872	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000191	0,000189	
12 Dun 5	120	0,000189	0,000189	0,000189	0,721861	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189		0,000189	0,000189	0,00019	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
13 Dun 6	80	0,000189	0,000189	0,000191	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,086166	0,000189	0,000189	0,000189		0,000189	0,000189	0,000514	1	0,000189	0,002269	0,000189	0,000189	0,915063	0,958308	0,004265	
14 Dun 6	100	1	0,000189	0,077264	0,000189	1	0,000189	0,206763	0,999844	0,00019	0,000189	0,975872	0,000189	0,000189		0,000245	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
15 Dun 6	120	0,000212	0,000189	0,000189	0,009543	0,000215	0,000189	0,536367	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,00019	0,000189	0,000245		0,000189	0,000189	0,000197	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
16 Dun 30	80	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,986657	0,000189	0,000189	0,000514	0,000189	0,000189		0,000203	0,000189	1	0,000189	0,000814	0,142938	0,000189	1	
17 Dun 30	100	0,000189	0,000189	0,000246	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,454421	0,000189	0,000189	0,000189	1	0,000189	0,000189	0,000203		0,000189	0,000305	0,000189	0,000189	0,410557	0,999986	0,000442	
18 Dun 30	120	0,000189	0,000189	0,000189	0,932943	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	1	0,000189	0,000189	0,000197	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
19 Dun 31	80	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,827235	0,000189	0,000189	0,002269	0,000189	0,000189	1	0,000305	0,000189		0,000189	0,000276	0,410557	0,00019	1	
20 Dun 31	100	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
21 Dun 31	120	0,000189	0,014082	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,09858	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000814	0,000189	0,000189	0,000276	0,000189		0,000189	0,000189	0,000228	
22 Dun 32	80	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000342	0,001276	0,000189	0,000189	0,915063	0,000189	0,142938	0,410557	0,000189	0,410557	0,000189	0,000189		0,040027	0,554096	
23 Dun 32	100	0,000189	0,000189	0,002588	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,981556	0,000189	0,000191	0,000189	0,000189	0,958308	0,000189	0,999986	0,000189	0,00019	0,000189	0,000189	0,000189	0,040027		0,000193	
24 Dun 32	120	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,699987	0,000189	0,000189	0,004265	0,000189	0,000189	1	0,000442	0,000189	1	0,000189	0,000228	0,554096	0,000193		

Έντονη γραφή: στατιστικά σημαντικές τιμές ($p < 0.05$)

(Λογισμικό εξαγωγής αποτελεσμάτων: TIBCO STATISTICA © TIBCO Software Inc.)

(δ) Ημερήσια παραγωγικότητα καλλιέργειας σε β-καρωτένιο (b-carotene productivity, mg·L⁻¹·day⁻¹)

Tukey HSD test; variable b-carotene mg/L/day (Dunastats in DunaStats2.stw) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00006, df = 48,000 Include condition: v3>60 AND v3<140

strain	salinity	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}	{14}	{15}	{16}	{17}	{18}	{19}	{20}	{21}	{22}	{23}	{24}			
1 D 19/18	80		0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	1	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,001696	0,945852	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,999643	0,008534		
2 D 19/18	100	0,000189		0,007861	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,001156	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000336	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000207		
3 D 19/18	120	0,000189	0,007861		0,000189	0,000691	0,000189	0,000189	0,000189		1	0,000189	0,000191	0,000189	0,000189	0,000678	0,000196	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189		
4 Dun 2	80	0,000189	0,000189	0,000189		0,000189	0,000202	0,000192	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000271	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,945991	0,000189	0,018715	0,000202	0,385049	0,000189	0,000189			
5 Dun 2	100	0,000189	0,000189	0,000691	0,000189		0,000189	0,000189	0,150004	0,004452	0,000189	0,998032	0,000189	0,002823		1	0,999957	0,000189	0,000189	0,000189	0,000196	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189		
6 Dun 2	120	0,000189	0,000189	0,000189	0,000202	0,000189			1	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,815089	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,004452	0,000189		1	0,150004	0,000189	0,000189		
7 Dun 8	80	0,000189	0,000189	0,000189	0,000192	0,000189				1		0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,945991	0,000189	0,011709	0,000189		1	0,069471	0,000189	0,000189	
8 Dun 8	100	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,150004	0,000189	0,000189		0,000189	0,000189	0,945991	0,000189	0,998221	0,151809	0,815089	0,000189	0,000189	0,000691	0,000189	0,290385	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
9 Dun 8	120	0,000189	0,001156		1	0,000189	0,004452	0,000189	0,000189	0,000189		0,000189	0,000214	0,000189	0,000189	0,00438	0,000275	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
10 Dun 5	80		1	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189		0,000189		0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,007139	0,720476	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189		1	0,033698	
11 Dun 5	100	0,000189	0,000189	0,000191	0,000189	0,998032	0,000189	0,000189	0,945991	0,000214	0,000189		0,000189		0,15363	0,998129		1	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,001693	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
12 Dun 5	120	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,815089	0,945991	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189		0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,716947	0,000189	0,815089	0,000351	0,000189	0,000189	
13 Dun 6	80	0,000189	0,000189	0,000189	0,000271	0,002823	0,000189	0,000189	0,998221	0,000189	0,000189	0,15363	0,000189		0,002869	0,071383	0,000189	0,000189	0,044424	0,000189	0,991665	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
14 Dun 6	100	0,000189	0,000189	0,000678	0,000189		1	0,000189	0,000189	0,151809	0,00438	0,000189	0,998129	0,000189	0,002869		0,99996	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000196	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
15 Dun 6	120	0,000189	0,000189	0,000196	0,000189	0,999957	0,000189	0,000189	0,815089	0,000275	0,000189		1	0,000189	0,071383	0,99996		0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000691	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
16 Dun 30	80	0,001696	0,000336	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,007139	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189			0,00019	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,069471		1
17 Dun 30	100	0,945852	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,720476	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,00019		0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,21194	0,000189	0,000197
18 Dun 30	120	0,000189	0,000189	0,000189	0,945991	0,000189	0,000189	0,000189	0,000691	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,044424	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189		0,000189	0,815089	0,000189	0,000189	0,002733	0,000189	0,000189	0,000189	
19 Dun 31	80	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,004452	0,011709	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,716947	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189		0,000189	0,004452	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
20 Dun 31	100	0,000189	0,000189	0,000189	0,018715	0,000196	0,000189	0,000189	0,290385	0,000189	0,000189	0,001693	0,000189	0,991665	0,000196	0,000691	0,000189	0,000189	0,815089	0,000189		0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	
21 Dun 31	120	0,000189	0,000189	0,000189	0,000202	0,000189			1		1	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,815089	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,150004	0,000189	0,000189	
22 Dun 32	80	0,000189	0,000189	0,000189	0,385049	0,000189	0,150004	0,069471	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000351	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,002733	0,000189	0,000189	0,150004		0,000189	0,000189	
23 Dun 32	100	0,999643	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189		1	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,069471	0,21194	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,236216	
24 Dun 32	120	0,008534	0,000207	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,033698	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189		1	0,000197	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,000189	0,236216	

Έντονη γραφή: στατιστικά σημαντικές τιμές (p<0.05)

(Λογισμικό εξαγωγής αποτελεσμάτων: TIBCO STATISTICA © TIBCO Software Inc.)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 9.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: ΞΑΝΘΗ ΧΑΝΤΖΗΣΤΡΟΥΝΤΣΙΟΥ

Ημερομηνία γέννησης: 9 Ιουνίου 1985

Πόλη κατοικίας: Αθήνα

Τηλέφωνο: 210-7274042 (τηλ. γραφείου), 6949177297 (κιν.)

E-mail: xanthi.biol@gmail.com

Επάγγελμα/Ιδιότητα: Βιολόγος

Ίδρυμα: Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), (Γραφείο 42, Τομέας Οικολογίας και Ταξινομικής, Τμήμα Βιολογίας)

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Δευτεροβάθμια: 7ο Γυμνάσιο & Λύκειο Ζωγράφου, Αθήνα, 1997-2003

Τριτοβάθμια:

2011 – Πτυχίο Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ).

2011-2014: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Εξειδίκευσης, Δι-υδρυματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Ωκεανογραφία και Διαχείριση Θαλασσίου Περιβάλλοντος», ΕΚΠΑ.

2014-: Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής με θέμα «Συστηματική μελέτη φυτοπλαγκτού από μεταβατικά υδατικά οικοσυστήματα της Δυτικής Ελλάδος (Ιόνιο)».

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά: Certificate of Proficiency in English (CPE), University of Cambridge
(Επίπεδο συνομιλίας: Άριστο)

Γαλλικά: Delf 1 (Unités A1, A2, A3, A4), Centre international d'études pédagogiques
(Επίπεδο συνομιλίας: Αρκετά καλό)

Ισπανικά: Χωρίς πτυχίο (Επίπεδο συνομιλίας: Καλό)

ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Χρήση Η/Υ: Χωρίς πτυχίο. Εξαιρετική ευχαίρεια στη χρήση των λειτουργικών συστημάτων XP/Vista/07/08/10 και Ubuntu 12.10 (Linux) και των λογισμικών Microsoft Office και Adobe Photoshop, Adobe Flash και Adobe Illustrator καθώς και στη χρήση του διαδικτύου.

Στατιστικά Πακέτα: PRIMER E (ver.6), STATISTICA, STAT-GRAPHICS, MATlab.

Συστήματα Γεωγραφικών Πληροφοριών: ArcGIS, Surfer.

ΠΕΔΙΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ-ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

- Συστηματική, Ταξινομική και Οικολογία φυκών (ιδιαίτερα φυτοπλαγκτικών μικροφυκών).
- Βιοποικιλότητα λιμνοθαλάσσιου και ωκεάνιου φυτοπλαγκτού.
- Οικολογική κατάσταση παράκτιων υδατικών συστημάτων.
- Οικολογία και βιοποικιλότητα μεταβατικών υδάτων.
- Βιοποικιλότητα και οικολογία οργανισμών από ακραία οικοσυστήματα (περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας και θερμοπηγές).
- Καλλιέργεια και μικροφυκών σε εργαστηριακή και βιομηχανική κλίμακα.
- Συντήρηση και ανανέωση φυσικού υλικού (μονοκαλλιέργειες μικροφυκών).
- Βιομηχανικές εφαρμογές των μικροφυκών (τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα, καλλυντικά, υδατοκαλλιέργειες, βιοκαύσιμα).
- Ecological engineering. Διαχείριση και βελτιστοποίηση φυσικών ανθίσεων των φυκών (Natural Algal Blooms) και καλλιεργουμένων φυκών προς παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Τρίμηνη προπτυχιακή **πρακτική άσκηση** στο Εργαστήριο Ανοσολογίας-Ιστοσυμβατότητας του ΓΝΑ Ευαγγελισμός ως εργαστηριακή

βοηθός (προετοιμασία αντιδραστηρίων, εργαστηριακή ανάλυση ELISA για την διενέργεια προμεταμοσχευτικού ελέγχου ιστοσυμβατότητας και την ανάλυση HLA αντισωμάτων), στα πλαίσια του Προγράμματος “**Πρακτική Άσκηση Φοιτητών (ΕΠΕΑΕΚ II)**” (ΓΝΑ Ευαγγελισμός, 2006).

- Εκπόνηση **προπτυχιακής διπλωματική εργασίας** με τίτλο: «Μικροοργανισμοί σε λιμναίο/θαλάσσιο περιβάλλον: Ταξινομική μελέτη στελεχών του γένους *Tetraselmis* STEIN (Prasinophyceae) από λιμνοθάλασσες της Δυτικής Ελλάδας.» (Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ, 2009-2011).
- Συμμετοχή στο Πρόγραμμα «**Συντήρηση καλλιεργειών μικροφυκών για ταξινομικούς και οικολογικούς σκοπούς**» ως αναλύτρια και συντονιστής της Τράπεζας Στελεχών AthU-AI στον Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του Τμήματος Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ, 2009-2011).
- Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία με θέμα «**Συστηματική μελέτη στελεχών μικροφυκών του γένους *Tetraselmis* STEIN (Chlorodendtrales, Prasinophyceae) από λιμνοθάλασσες της Δυτικής Ελλάδας με τη χρήση μικροσκοπικών, βιοχημικών και μοριακών μεθόδων**» στα πλαίσια του Δι-ιδρυματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Ωκεανογραφία και Διαχείριση Θαλασσίου Περιβάλλοντος», ΕΚΠΑ (Τμήμα Βιολογίας, 2012-2014).
- Συμμετοχή στην ωκεανογραφική αποστολή «**ReDEco (Regional Drivers of Ecosystem Change and its Influence on Deep-Sea Populations in the Mediterranean)**» του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσιών Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., Κρητικό και Λυβικό Πέλαγος, 8-14 Ιουνίου 2012).
- Συμμετοχή στο Διεθνές Πρόγραμμα “**MED ALGAE: Production of biodiesel from Algae in selected Mediterranean Countries**” ως βοηθός εργαστηρίου και οργανωτικό προσωπικό (προετοιμασία εκδρομών και διαλέξεων) στον Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του Τμήματος Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ, 2012-2016).

- Συμμετοχή στο **Training Workshop “Algae Culture & Identification Techniques”** ως βοηθός εργαστηρίου και οργανωτικό προσωπικό (προετοιμασία εκδρομών και διαλέξεων), (11-15 Φεβρουαρίου 2013, Αθήνα).
- Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής με θέμα **«Συστηματική μελέτη φυτοπλαγκτού από μεταβατικά υδατικά οικοσυστήματα της Δυτικής Ελλάδος (Ιόνιο)»** (Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, 2014-2020)
- Ανάθεση έργου στα πλαίσια του Προγράμματος: **«Λοιμώδη και διατροφικά νοσήματα εκτρεφόμενων ψαριών»** του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών, με αντικείμενο τις αναλύσεις προσδιορισμού NSP (non-starch polysaccharides, μη-αμυλούχοι πολυσακχαρίτες) σε τροφές και περιττώματα ψαριών, (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε., Μάιος 2015).
- Συμμετοχή στο Πρόγραμμα **«Χαρακτηρισμός και επιλογή στελεχών μικροφύκους για μαζική καλλιέργεια»** για την “Άρατος Βιολειτουργικά Τρόφιμα ΙΚΕ” ως ερευνήτρια (δειγματοληψίες πεδίου, εργαστηριακή καλλιέργεια μικροφυκών, σχεδιασμός και υλοποίηση πειραμάτων). (2015-2017).
- Συμμετοχή στο Διεθνές Πρόγραμμα Erasmus+ **“Trans-regional environmental awareness for sustainable usage of water resources - TREASURE-WATER”** ως διοικητικό και τεχνικό προσωπικό (προετοιμασία και παρουσίαση διαλέξεων, συμμετοχή στην οργάνωση εκπαιδευτικών εκδρομών, συνεδρίων και συμμετοχή στην προετοιμασία παραδοτέων και διοικητικών εγγράφων). (ΕΚΠΑ, 2018-2019).

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1ο Πανελλήνιο συνέδριο «Η Βιολογία στην Εκπαίδευση», Αθήνα, 6-8 Απριλίου 2012.
- 10ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας και Αλιείας (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε), Αθήνα, Μάιος 2012.
- 5ο Ευρωπαϊκό Συνέδριο Φυκολογίας (EPCV), Ρόδος 04-09 Σεπτεμβρίου 2011. Αναρτημένη παρουσίαση με τίτλο: “Strains of the genus *Tetraselmis*

from Greek coastal lagoons of the Ionian Sea”.

- 51ο Διεθνές Συμπόσιο “Research & Management of transitional waters”, Klaipeida, Λιθουανία, 23-27 Σεπτεμβρίου 2012. Αναρτημένη παρουσίαση με τίτλο: “Phytoplankton analysis of two transitional ecosystems in Epirus (Western Greece)”.
- 6ο Πανελλήνιο Συνέδριο Οικολογίας (Ελληνική Οικολογική Εταιρία) «Οικολογική Έρευνα στην Ελλάδα: τάσεις, προκλήσεις, εφαρμογές», Αθήνα, 04-07 Οκτωβρίου 2012. Αναρτημένη παρουσίαση με τίτλο: «Μελέτη του φυτοπλαγκτού έξι μεταβατικών υδάτινων συστημάτων της Ηπείρου (δελταϊκά συστήματα των ποταμών Καλαμάς και Λούρος)».
- 2^ο Meta-barcoding Spring School του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Κρήτης, Ηράκλειο Κρήτης, 13-17 Μαΐου 2013 στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού Προγράμματος, MARBIGEN.
- 13^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο της Ελληνικής Βιολογικής Εταιρίας (ΕΒΕ), Θεσσαλονίκη, 03-06 Οκτωβρίου 2013. Προφορική παρουσίαση με θέμα: «Μελέτη της λεπτής δομής στελεχών του γένους *Tetraselmis* (Prasinophyceae, Chlorodendrales) από λιμνοθάλασσες της Δυτικής Ελλάδας».
- 1^ο Θερινό Σχολείο SAHYOG, Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο, Αθήνα, 9-16 Ιουνίου 2013. Βραβείο Φοιτητικής Εργασίας.
- 6^ο Συμπόσιο ISAP, Σίδνευ, Αυστραλία, 22-27 Ιουνίου 2016. Αναρτημένη παρουσίαση: Tzovenis et al., “Development of natural algal blooms for production of Biodiesel”.
- 2^ο Διεθνές Συνέδριο Εφαρμοσμένης Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος HydroMediT (Applied Ichthyology & Aquatic Environment), Μεσολόγγι, 10-12 Νοεμβρίου 2016. Προφορική παρουσίαση: Chantzistrountsiou et al., “Effects of salinity on the growth and productivity of 12 strains of *Dunaliella* Teodoresco (Chlorophyceae) isolated from coastal lagoons of Greece”.
- 16ο Συμπόσιο INA (International Nannoplankton Association): Advanced Nannoplankton studies through Geological Time: Geobiology, Environment and Industrial Applications. Αθήνα, 24-28 Σεπτεμβρίου 2017. Προφορική παρουσίαση: Chantzistrountsiou et al., “The microalgae strain bank AthU-AI at the University of Athens (NKUA)”.
- 3^ο Διεθνές Συνέδριο Εφαρμοσμένης Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος HydroMediT (Applied Ichthyology & Aquatic Environment), Βόλος, 08-11 Νοεμβρίου 2018. Προφορική παρουσίαση: Chantzistrountsiou et al.,

“Sampling for microalgal strains suitable for aquaculture in the lagoonal system of Messolonghi-Aetoliko”.

- 16^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Ελληνικής Βοτανικής Εταιρείας (ΕΒΕ), Αθήνα 10-13 Οκτωβρίου 2019 . Προφορική παρουσίαση με θέμα: “Η τράπεζα στελεχών μικροφυκών AthU-AI (Athens Univerisity Algae) του Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ).

Δημοσιευμένες εργασίες

1. Chantzistrountsiou X., I. Tzovenis, A. Parmakelis & A. Economou-Amilli (2016) “Characterization of *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* (Chlorodendrophyceae) strains from coastal lagoons of Western Greece using a multivariate approach. *Phytotaxa*, 278(3), 225–240. doi: <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.278.3.3>

2. Omirou M., Tzovenis., I. Tzovenis P.Charalampous, P. Tsaousis, P. Polycarpou, **X. Chantzistrountsiou**, A. Economou-Amilli & I. M. Ioannides (2018) “Development of marine multi-algae cultures for biodiesel production”. *Algal Research* 33, 462-469.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.025>

Characterization of *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* (Chlorodendrophyceae) strains from coastal lagoons of Western Greece using a multivariate approach

XANTHI CHANTZISTROUNTSIOU¹, IOANNIS TZOVENIS¹, ARISTEIDIS PARMAKELIS¹ & ATHENA ECONOMOU-AMILLI^{1*}

¹Faculty of Biology, Department of Ecology and Systematics, National and Kapodistrian University of Athens (NKUA)

*Corresponding author (aamilli@biol.uoa.gr)

Abstract

Strains of *Tetraselmis*, a genus with systematic and biotechnological interest and one of the most prominent genera in marine phytoplankton, were studied. Five strains of *T. verrucosa* f. *rubens*, a taxon first documented in coastal lagoons of Greece, are examined herein under a multivariate approach i.e. in relation to their morphological variability under light and transmission electron microscopy (LM and TEM, respectively), and taking into account certain molecular and biochemical attributes as taxonomic markers, including the plastid-encoded *rbcL* and nuclear-encoded 18S rRNA gene sequences, and the fatty acid profile. The molecular markers were used to verify the phylogenetic position of the strains within the genus *Tetraselmis* and the class Chlorodendrophyceae. For that purpose, the original *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* isolate (CCAP strain 66/6) was included in the analysis. The molecular data are in agreement with the classification based on morphology. The five strains grouped firmly together and formed a monophyletic group with the original *T. verrucosa* f. *rubens* isolate. Lipid analysis of the strains was performed using the FAME (Fatty Acid Methyl-Ester) method and the resulting profile might be used as an additional taxonomic marker.

Introduction

Tetraselmis F. Stein (1878) represents a genus of particular systematic interest with two theories having been proposed about its taxonomic position. The first one (Adl *et al.* 2012) traditionally places this genus within the class Prasinophyceae separating it from the UTC group and core chlorophytes. However, based on most recent molecular data on Chlorophyta, the second and currently accepted theory, places *Tetraselmis*, along with only one additional genus, i.e. *Scherffelia* Pascher (1911: 341), in a separate class, Chlorodendrophyceae; the latter is placed in the ‘core chlorophytes’, along with Chlorophyceae, Trebouxiophyceae and Ulvophyceae (UTC), because of the greater similarities with the UTC group, compared to prasinophytes (Massjuk & Lilitska 2006, Leliaert *et al.* 2012).

Tetraselmis is an ecologically interesting, widespread genus that can be found in all types of aquatic ecosystems as an important component of primary productivity (Norris 1982), especially in oceanic systems (Worden *et al.* 2004) with various species commonly found in transitional and marine water samples but also in freshwater and in hypersaline environments like salt lakes or marshes (Fon-Sing & Borowitzka 2015). Moreover, *Tetraselmis* is a biotechnologically exploited genus with certain species [e.g. *T. suecica* (Kyllin 1935: 5) Butcher (1959: 70) and *T. chui* Butcher (1959: 65)] widely used in aquaculture and in the wider microalgae related industry (Papandroulakis *et al.* 2002, Spolaore *et al.* 2006).

In addition to the morphological and molecular characteristics, certain biochemical properties of microalgae—among them the photosynthetic pigments and the fatty acids being most prominent—have been used as taxonomic markers. Furthermore, the study of microalgal fatty acid profiles has been shown to be of taxonomic value (Mourente *et al.* 1990, Cohen *et al.* 1995, Mostaert *et al.* 1998, Lang *et al.* 2011, Sahu *et al.* 2013), and it has been proposed that the fatty acid composition of different taxa reflects their phylogeny (Pohl & Zurheide 1979).

In general, microalgae thriving in lagoons manifest certain special ecological and physiological characteristics (low surface/volume ratio, high growth rates, wide range of tolerance in changes of limiting abiotic factors) compared to their marine or freshwater relatives, something that gives them an opportunistic character, and as a result, they respond faster and more efficiently to gradients characteristic of transitional systems (Ferreira *et al.* 2005). In addition

to their ecological importance the microalgae in lagoons have been exploited in a variety of commercial uses (Carcamo *et al.* 2005, Knuckey *et al.* 2005, Ronquillo *et al.* 1997, Tzovenis *et al.* 2009, Brown & Jeffrey 1992, Dunstan *et al.* 1992, Cañizares *et al.* 1994, Serval *et al.* 1994, Olaizola 2003, Hossain *et al.* 2008).

In plankton samples collected earlier from various coastal lagoons of Western Greece (Dolapsakis *et al.* 2008), several representatives of the genus *Tetraselmis* were isolated and preserved as monocultures in the 'Algal Strain Bank' of the Department of Ecology and Systematics (Faculty of Biology, University of Athens). In the present study, five of those strains identified as *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* (Butcher 1959: 69) Hori, Norris & Chihara (1983: 391) are presented. Taxonomy was based on cell morphology using Light Microscopy (LM) and Transmission Electron Microscopy (TEM), and also on molecular data using the *rbcL* and 18S rRNA sequences. Moreover, the fatty acid profiles of the strains are also presented as supplementary information for a more integrated characterization. The aim of the present study was the characterization of the *Tetraselmis* isolates under a multivariate approach, including 1) morphological description and taxonomic identification, 2) analysis of the fatty acid profile as a potential supplementary taxonomic marker, and 3) use of phylogenetic methods to verify the position of the isolates studied herein within the genus *Tetraselmis* and the class Chlorodendrophyceae.

Material and Methods

Sampling sites:—The studied coastal lagoons of Western Greece were: 'Rhodia' (39° 06' N, 20° 49'19' E), 'Vatatsa' (39° 31' N 20° 11' E) and 'Messolonghi' (38° 15' N 21°04' E) (Fig. 1). 'Rhodia' is a closed lagoon in Amvrakikos Bay, and part of the deltaic system of the river Louros. 'Vatatsa' is a semi-closed lagoon of the NE Ionian Sea belonging to the deltaic system of the river Kalamas. 'Messolonghi' is a high salinity lagoon located southern, in Aetoloakamania, encompassing a salt-marsh area of very high salinity, where the sampling was carried out.



FIGURE 1. A map of Greece showing the location of the lagoons 'Vatatsa', 'Rhodia' and 'Messolonghi'.

The lagoons of Rhodia and Vatatsa are located in the interface between the land of Epirus and the adjacent Ionian Sea, and in particular within the deltaic system of two major rivers, Louros and Kalamas, thus being part of an area rich in nutrients and with high biotic productivity and are characterized by a constant fluctuation of conditions both in space and in time, creating a rather intense gradient of physical and chemical parameters (such as salinity, temperature, light regime, pH fluctuations etc) (Tagliapietra & Volpi-Ghirardini 2006). The lagoon of Messolonghi is one of the most important lagoonal systems in Greece, consisting of a complex of smaller lagoons, all ending up in the Gulf of Patras and the Ionian Sea and is located between the rivers Acheloos and Evinos. The area is heavily exploited by the Greek state for fishery and aquaculture. Moreover, the salt marshes located near the interface between the lagoon and the sea, have been used for industrial production of natural salt. As a result, the studied areas are the receptors of human activity not only upon the water bodies themselves but also the surrounding drainage basin (Smith 2003, Alonso-Pérez *et al.* 2003, Newton *et al.* 2003, Cullaj *et al.* 2005), adding even more to the diversity of the indigenous conditions. The

strains isolated from such diverse environments, may originate from marine or freshwater habitats, and are adjusted to sudden changes in salinity, but some of them are characteristic of brackish waters, whereas species adjusted in high salinities can be found in hypersaline sites (Borowitzka 1981, Gilabert 2001).

Sampling:—Samplings took place monthly during the years 2005–2006. A Ruttner 11 sampler (Windaus, Germany) was used, and the samples were collected in 11 screwcap plastic bottles and transported to the lab in isothermal containers. Physical/chemical parameters (salinity, temperature, dissolved oxygen, pH) were monitored (Table 1) using a digital recorder, equipped with sensors adjusted on a sinking wire (YSI 550, USA).

TABLE 1. Physical and chemical parameters monitored in the lagoons ‘Rhodia’, ‘Vatatsa’ and ‘Messolonghi’ during the sampling period ‘November 2005–December 2006’ (see also Dolapsakis *et al.* 2006): Surface Area (SA), Depth Range (DR), Temperature (T), Salinity (S), Dissolved Oxygen (DO) and pH.

Lagoon	SA (m ²)	DR (m)	T (°C)	S (psu)	DO (ppm)	pH
‘Rhodia’	26.000,000	1-3.5	8.24–30.2	4.5–24.22	3.31–14.25	7.22–8.28
‘Vatatsa’	750,000	0-2	12.4–28.9	32.5–41.77	5.9–11.4	7.6–8.32
‘Messolonghi’	647.520,000	1-33	12.5–28.2	18.2–40.00	1.5–8.9	-

Strain isolation and culture:—Water samples collected in the lagoons were transferred to the lab and cultured in sterile seawater, enriched with Walne’s medium (Walne 1970), resulting in the development of a natural algal bloom containing several taxonomic groups of algae. The single-strain isolation was carried out using the micropipette technique as described in Dolapsakis *et al.* (2006), and the obtained cultures are now part of the ‘Algal Strain Bank’ of the Department of Ecology and Systematics (Faculty of Biology, University of Athens). This bank consisting of 120 strains of microalgae is preserved in a closed culture chamber (temp: 21–23°C, light intensity: 25–42 µmoles photons m⁻²s⁻¹, photoperiod: 12h day–12h night, relative humidity: ~35%). All strains are maintained after re-culturing on monthly basis, under sterile conditions in a Laminar Flow Cabinet (LFC).

Studied strains:—Two isolates from the ‘Rhodia’ lagoon [Tetr_R_9_2, Tetr_R_9_3], one isolate from the ‘Vatatsa’ lagoon [Tetr_V_2_2] and two isolates from the ‘Messolonghi’ lagoon [(Tetr_Mes_5, Tetr_Mes_17] were selected for this study. The strain numbering corresponds to the order of sampling and isolation as is recorded in the ‘Algal Strain Bank’ [e.g. the strain Tetr_R_9_2 comes from the ‘Rhodia’ lagoon representing the second isolate from the 9th sampling].

Light microscopy (LM):—Living and fixed (in Lugol’s solution) cells were observed and photographed under a Zeiss Axioplan light microscope equipped with differential interference contrast system (Nomarski), epifluorescence system and an MRc 5 Axiocam digital camera. The keys used for the taxa identification were those of Lee (2008) and Tomas (1997).

Transmission Electron Microscopy (TEM):—For TEM observations, cells were prepared according to Luong-Van & Hayward (2007). Fresh liquid cultures of 5–7 days old were mixed with 3% sodium alginate in a 1:1 proportion and were pipetted, drop by drop in a 0.03 M CaCl₂ solution with the help of a sterile glass Pasteur pipette, resulting in the formation of hardened alginic acid beads of 2.5–3 µm in diameter, that contained trapped living cells. The beads were cultured in sterile seawater enriched with Walne’s medium, just like the original cultures, and they were incubated in the ‘Algal Strain Bank’’s culture chamber for about a week. Inside the beads, *Tetraselmis* cells grow and reproduce normally, but cast off their flagella and form immobile palmellae. As a result the cell density within the beads increases with incubation and the beads appear green after a few days. After a week, the cells were fixed in 3% glutaraldehyde and 1% tannic acid in sodium cacodylate buffer (100 mM in SW) and dehydrated in successively increasing ethanol concentrations. The beads were then embedded in Spurr’s resin (Spurr 1969), using successively increasing concentrations of resin in propylene oxide. After incubation in 100% resin for 48 hours in 60 °C the resulting blocks were used to produce semi-thin sections in an LKB microtome with a glass knife. The sections were dyed with toluidine blue in 1% borax buffer and observed under a light microscope to determine the position of the cells and the quality of the embedding. The blocks were then used to produce ultrathin sections in accordance to the determined position of the cells. The sections were dyed with uranyl acetate and molybdenum citrate and observed under a Philips 300 TEM. The keys used for the taxa identification were those of Hori *et al.* (1982, 1983 & 1986), which are the only available for ultrastructural characters of the genus *Tetraselmis*.

Molecular methods:—Total genomic DNA from single unialgal cultures of all strains was extracted using the ‘Genomic DNA from Plant’ kit (Macherey Nagel), following the manufacturer’s protocol. Polymerase Chain Reaction (PCR) for the *rbcL* and the 18S rRNA fragments were conducted using the primer combinations RH-1S 5’-ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT-3’/Ce1161R 5’-CAT GTG CAA TAC GTG AAT ACC-3’ (Daugbjerg *et al.* 1994) and Euk328f (5’-ACC TGG TTG ATC CTG CCA G-3’)/Euk329r (5’-TGA TCC TTC YGC AGG TTC AC-3’) (Romari & Vaout 2004), respectively. In the PCR amplifications of the *rbcL* fragment, 1X reaction buffer, 3 mM MgCl₂, 0.25 mM of each deoxynucleotide (dNTP’s), 0.4 μM of each primer and 1U of Taq DNA polymerase (Hytest 7T1, Turku, Finland), were used in a 25 μl total reaction volume. For amplifying the 18S rRNA gene fragment, the reaction volume was the same, but the concentration of MgCl₂ was lowered to 1.5 mM, and 0.5 mM of each deoxynucleotide (dNTP’s) and 1.5 μM of each primer, were used. The amplification reactions were optimized for each gene fragment. The PCR for the *rbcL* fragment involved an initial denaturation step at 94 °C for 1 min followed by 25 cycles consisting of 94 °C for 45 sec, 48 °C for 1 min and 72 °C for 1.5 min and a 10 min final extension step at 72 °C. In the 18S rRNA amplification, the PCR comprised an initial denaturation step at 95 °C for 1 min followed by 34 cycles consisting of 94 °C for 1 min, 57 °C for 1.5 min and 72 °C for 1.5 min and a 10 min final extension step at 72 °C. In order to verify that the targeted gene fragments were amplified, and for quantification reasons, the PCR amplicons were visualized in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. Automated sequencing of both strands of each PCR amplicon was performed in an automated sequencer (using Big-Dye terminator chemistry). The primers in the sequencing reactions were the same as in the PCR amplifications. The generated sequences were edited in CodonCode Aligner v. 2.0.6 (CodonCode Corporation, Centerville, USA) and evaluated for their homology to the *rbcL* and 18S rRNA genes of Chlorophyta through a BLAST search.

The morphological features pointed to the genus *Tetraselmis* and more specifically to the taxon *T. verrucosa f. rubens* as described by Hori *et al.* (1983). Therefore, we compiled a dataset including our sequences and all the *Tetraselmis* sequences available in GenBank. Considering that there were no existing sequences for the *rbcL* gene of the aforementioned species in GenBank, the original *Tetraselmis verrucosa f. rubens* isolate that was described by Hori *et al.* (CCAP strain 66/6) was sequenced and included in the analysis. Additionally, and taking into consideration the general uncertainty concerning the taxonomic position of the genus within the algal phyla, we included in the dataset the *rbcL* and 18S rRNA sequences of several representatives of Prasinophyceae (where the genus was previously placed) and Chlorophyceae, based on both molecular and morphological relationships with the studied genus (Lealiart *et al.* 2012, BLAST search). Using this dataset we performed a phylogenetic analysis in order to verify the relationship between our strains and the original *Tetraselmis verrucosa f. rubens* strain and examined the relationships between our strains and the available/sequenced *Tetraselmis* strains, as well as the position of our strains and the genus *Tetraselmis* overall within the Chlorodendrophyceae.

The sequences of the phylogenetic analysis were aligned using CodonCode Aligner and the Clustal X algorithm. Phylogeny was performed within a Bayesian framework (BI) using the software MrBayes 3.2.2 (Ronquist, Teslenko, van der Mark, Ayres, Darling, Höhna, Larget, Liu, Suchard & Huelsenbeck 2012). The GTR+I+G model of substitution was implemented in the BI analyses for both gene fragments. Sequence data were partitioned according to gene fragment, and all parameters were estimated independently for the two gene fragments during the BI analyses. Model selection and partition scheme was assessed using PartitionFinder (Lanfear, Calcott, Ho & Guindon 2012), and the Bayesian Information Criterion (Schwarz 1978). In MrBayes four independent runs were run simultaneously. The chain length was set to 20·10⁶, parameters were sampled every 500 generations and a random starting tree was used. Parameters receiving effective sample sizes (ESS) values above 200 were considered as having been sufficiently sampled (Kuhner 2009). The results of the four converged and independent runs were combined (after removing of 25% burn-in). The sampled posterior trees (120,004 trees) from all four analyses combined, were summarized to generate a 50% majority-rule consensus tree. No outgroup species was used to root the tree.

In all pairwise genetic distances comparisons we used MEGA v.6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski & Kumar 2013) and the Kimura (1980) model.

Lipid profile analysis:—Liquid cultures were filtered on GFC filters, and cells per ml were quantified and were preserved in -4 °C until analysis. Lipid analysis of the strains was done using the FAME (Fatty Acid Methyl-Ester) method described by Lepage & Roy (1986). The GFC filters were boiled in esterification factors (methanol/toluol 3:2 and acetyl-chloride/methanol 1:20 v/v) for one hour and then centrifuged with hexane to obtain the fatty phase, which was filtered with anhydrous sodium sulfate in order to remove any residual humidity. The hexane was evaporated, and the fatty acid methyl-esters were collected in a gas chromatography glass vial in octane, analyzed using a gas chromatographer (GLC Varian 3300, Sugar Land, TX, USA) with a flame ionization detector, and identified using nonadecyclic acid (19:0) as an internal standard.

Statistical analysis:—Statistical analysis was carried out using the E-Primer software (Clarke & Gorley 2006) including Bray-Curtis similarity index analysis for the data concerning fatty acid profiles.

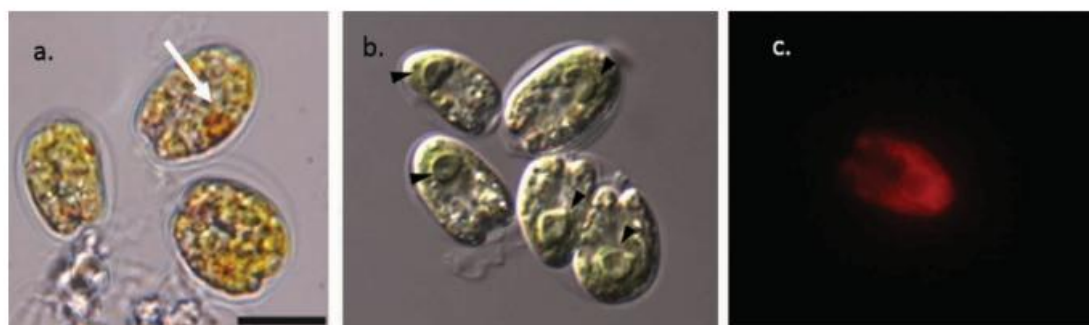


FIGURE 2. Cells of *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* [strain Tetr_R_9_2] under LM. a. Bright-field microscopy observation; arrow points to the eyespot. b. Nomarski system observation; arrowheads point to the cell pyrenoids. c. Epifluorescence system observation; note shape and lobes of the chloroplast.

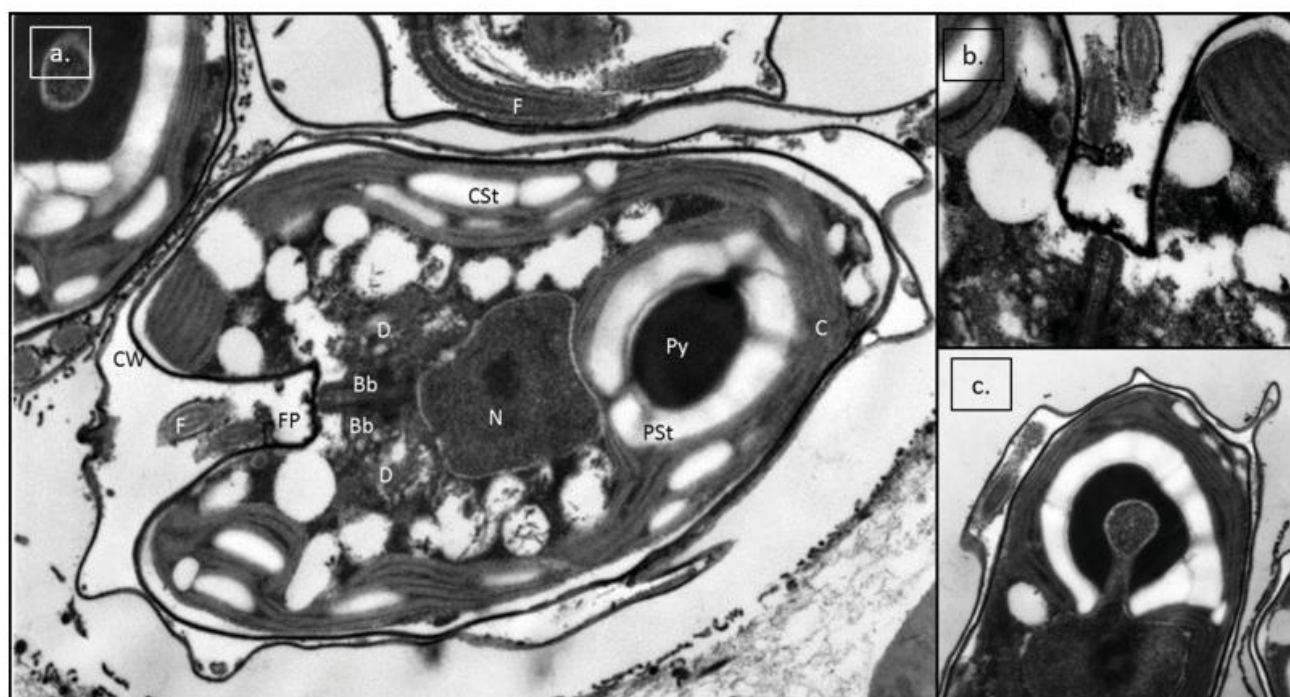


FIGURE 3. a. Ultrastructural characteristics of *T. verrucosa* f. *rubens* as observed in cells of the strain Tetr_V_2_2 isolated from ‘Vatatsa’ lagoon. F: flagella. CW: cell wall. FP: flagellar pit. Py: pyrenoid. PSt: pyrenoid starch grains. CSt: chloroplast starch grains. D: dictyosome. Bb: basal body. C: chloroplast. N: nucleus. b. Flagellar pit without hairs. c. Pyrenoid penetrated by a large cavity containing a lobe of the nucleus.

Results

Morphological description:—All isolated strains were similar in cell morphology under light (Fig. 2) and transmission electron microscopy (Fig. 3), showing the typical characteristics of the genus *Tetraselmis*. The cell shape was found to be ovate to ellipsoid, compressed, rounded or slightly acute posteriorly, at times cordiform (heart-shaped). Motile cells were 5–9 μm long and 3–7 μm wide, and they were sheathed by a thin cell wall layer. Four (4) flagella (Fig. 3a: F) of the same length and slightly shorter than the cell body (about 3/4) emerge from base of the distinct for the genus, anterior cavity in a cross-shaped manner. The anterior cavity (‘flagellar pit’) was present in all strains and was visible under light microscopy (Fig. 2, Fig. 3a: FP). The chloroplast (Fig. 3a: C) was massive posteriorly and lobed anteriorly with large convex or/and biconvex matrix starch grains (Fig. 3a: Cst). The eyespot was not always distinct, and was typically located in the anterior half of the cell, in lateral, sub-central position near the pyrenoid. The cells acquire one large, sub-central, U-shaped pyrenoid, penetrated by a large cavity containing chloroplast matrix material and a lobe

of the nucleus (Fig. 3a: Py, Fig. 3c), surrounded by a sheath of convex starch grains and separated from the chloroplast matrix via a distinct thylakoid band. The nucleus (Fig. 3a: N) was large and irregularly shaped, located under the flagellar apparatus and separated from it by two dictyosomes (Fig. 3a: D), located one on each side of the flagellar apparatus. The exterior of the flagellar pit was practically bare, with few or without flagellar hairs (Fig. 3b). The strains presented accumulation of red-orange colored spots, identified as haematochrome (assemblages of carotenoid droplets), within the cell. Non-motile, enlarged, rounded cells, surrounded by several layers of mucilaginous cell wall material (palmelloid cells, Fig. 4: P) were common in most cultures. Furthermore, the culture medium of all strains, when macroscopically observed, showed a red coloration. According to morphological criteria, all strains were assigned to the taxon *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* (Butcher) Hori *et al.* (1983).

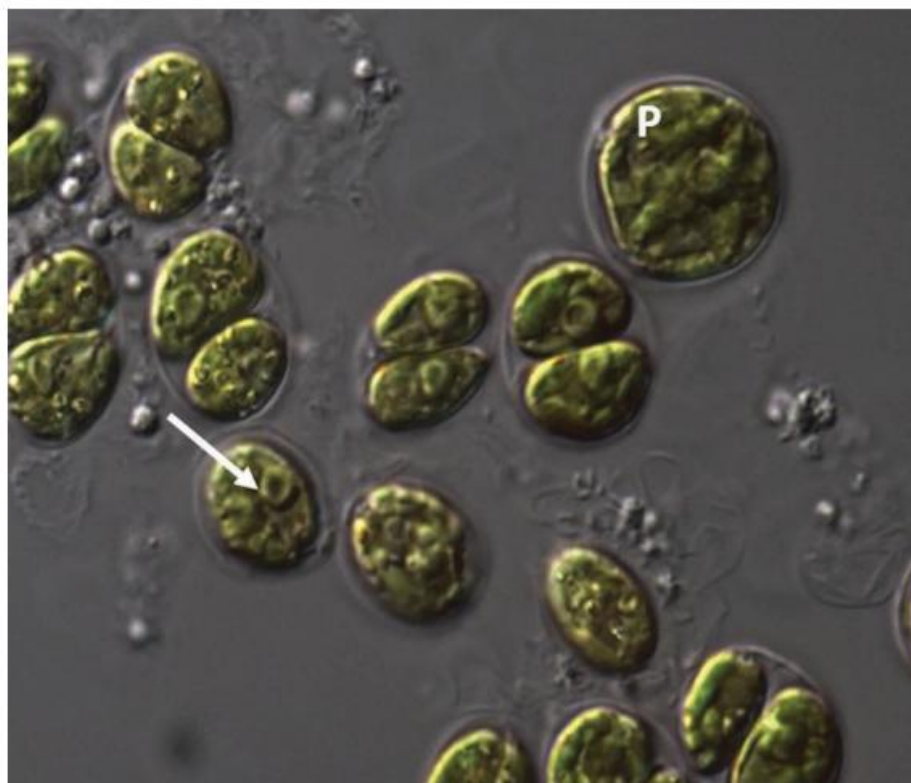


FIGURE 4. Cells of *T. verrucosa* f. *rubens* [strain Tetr_Mes_5] under LM (Nomarski system). P: palmelloid cells. Certain cells (arrow) appear to have more than one pyrenoid (considered as an artifact).

Some special features should be noted: certain cells of the Tetr_Mes_5 strain appeared to have more than one pyrenoids under light microscopy (Fig. 4, arrow); however, after close examination under electron microscopy, it was clear that the extra pyrenoids should be considered an artifact. Also mean cell size of the strain Tetr_Mes_17 was considerably larger (8.5–15 μm long and 6–10.5 μm wide) compared to all other strains.

Molecular analyses: The primers used in the amplification of the *rbcL* gene were targeting the whole sequence of the *rbcL* gene, approximately 1161 bp (Daugbjerg *et al.* 1994). A sequence of 1061 bp long was obtained only from the strain Tetr_V_2_2. In four out of the remaining five strains (including strain Tetr_66_6), the fragments of the *rbcL* gene amplified were in the range of 377 to 407 bp long. The remaining parts of the sequences could not be used because they were of low quality. In addition, from the strains Tetr_R_9_2 and Tetr_R_9_3, we only obtained fragments of 161 and 127 bp long. Nevertheless we used all generated sequences in the phylogenetic analyses. The accession numbers of all generated/used sequences are provided in Table 1 of the supplementary file. The compiled (aligned) dataset that included the generated sequences and the sequence data retrieved from GenBank, was 1428 bp long and included 772 variable sites out of which 658 were parsimony informative. For the 18S rRNA gene we obtained on average a sequence 1594 bp long from all six strains (including strain Tetr_66_6). The compiled 18S rRNA dataset was 2287 bp long and included 1398 variable sites out of which 808 were parsimony informative. The average divergence over all sequence pairs of distinct and clearly defined species, as estimated with MEGA v.6, was 20.1% for the *rbcL* gene and 11.2% for the 18S rRNA gene. The divergence values between the five strains investigated herein were 2.4% and 0.3% for the *rbcL* and the 18S rRNA gene fragments, respectively. The average distance between the studied strains and the taxon *T. verrucosa* f. *rubens* (strain Tetr_66_6) was 3.2% for the *rbcL* and 0.3% for the 18S rRNA. Finally, the average

divergence of the *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* group and the rest of the *Tetraselmis* strains was 7.5% for the rbcL and 1% for the 18S rRNA.

Phylogenetic analyses: The unrooted Bayesian tree is shown in Fig. 5. The tree is not fully resolved. However, there are many clades that are strongly supported statistically. Furthermore, the analyses unquestionably indicates that the five strains analyzed herein group firmly together and form a monophyletic cluster with *T. verrucosa* f. *rubens* (Fig. 5).

FAME profile:—FAME profiles of the strains Tetr_V_2_2, Tetr_Mes_5 and Tetr_Mes_17 were analysed. The profiles of the strains Tetr_R_9_2 and Tetr_R_9_3 presented in Tzovenis *et al.* (2009) and the profile of *Tetraselmis suecica* presented in Tzovenis (2001)—the latter taxon commonly used in aquaculture—were additionally included in the analysis (Table 2). The fatty acid content of all strains was clustered based on Bray-Curtis similarity (Fig. 6), revealing two distinct groups, ‘Rhodia’ and ‘Messolonghi’ respectively. The Tetr_Mes_5 and Tetr_Mes_17 strains showed a 94.9% resemblance, and the Tetr_R_9_2 and Tetr_R_9_3 strains showed a 92.8% resemblance. The ‘Vatatsa’ strain was found to be closer related to the ‘Messolonghi’ group (~75% similarity). The profiles of the ‘Messolonghi’ strains are dominated by 16:0 (25–26%), 18:3n-3 (~17–19%), 18:00 (~11.5–13%), 18:4n-3 (~9–10%), 18:1n-7 and 18:2n-6 (7–8%), also containing 20:1n-9 (3–4%) and 20:5n-3 (eicosapentaenoic acid, EPA: ~4–4.5%). Both ‘Messolonghi’ strains have a similar content in poly-unsaturated fatty acids (PUFAs) (about 45%), higher than that of the ‘Rhodia’ strains (27–34%) but lower than that of the ‘Vatatsa’ strain (60.55%). Their monounsaturated fatty acids (MUFAs) content is also similar (13–14.5%) and lower than that of the ‘Rhodia’ strains (35–38%) and similar to that of the ‘Vatatsa’ strain (~15%).

TABLE 2. Fatty acid profiles of the strains Tetr_Mes_5, Tetr_Mes_17 and Tetr_V_2_2 as analyzed in this paper, in comparison with the fatty acid profiles of the strains Tetr_R_9_2, Tetr_R_9_3 as presented in Tzovenis *et al.* (2009), and of the species *T. suecica* as cited in Tzovenis (2001). The saturated (SAFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acid content of the above strains is also presented.

Strain	Mes_5	Mes_17	R_9_2	R_9_3	V_2_2	<i>T. suecica</i>
14:00	1.35	1.21	0.83	0.24	0.94	0.50
16:00	25.90	25.54	29.50	28.10	20.15	17.60
16:1n-7	1.96	2.06	1.33	0.54	0.66	3.70
16:1n-9	0.00	0.00	3.00	3.18	1.51	0.00
16:2n-4	0.00	0.00	1.03	1.46	2.94	0.80
16:2n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.60
16:4n-3	2.25	1.63	5.29	7.38	9.49	20.80
18:00	11.75	12.94	2.13	1.19	0.74	0.80
18:1n-9	0.06	0.36	28.60	26.43	0.58	9.50
18:1n-7	7.79	7.57	2.72	2.95	4.37	2.60
18:2n-9	2.22	2.33	0.00	0.00	0.00	0.00
18:2n-6	7.40	7.89	5.90	6.95	5.11	4.60
18:3n-3	19.24	17.01	7.08	8.54	21.07	14.40
18:4n-3	9.16	10.39	2.60	3.15	11.04	11.20
20:1n-9	4.09	3.78	2.25	1.35	6.09	0.00
20:5n-3	4.21	4.41	3.67	3.76	5.92	4.30
22:5n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	4.01	0.00
SAFA	38.99	40.43	33.29	30.17	21.83	18.90
MUFA	13.90	14.45	38.06	34.77	15.35	16.50
PUFA	45.69	45.10	27.20	33.25	60.55	56.80

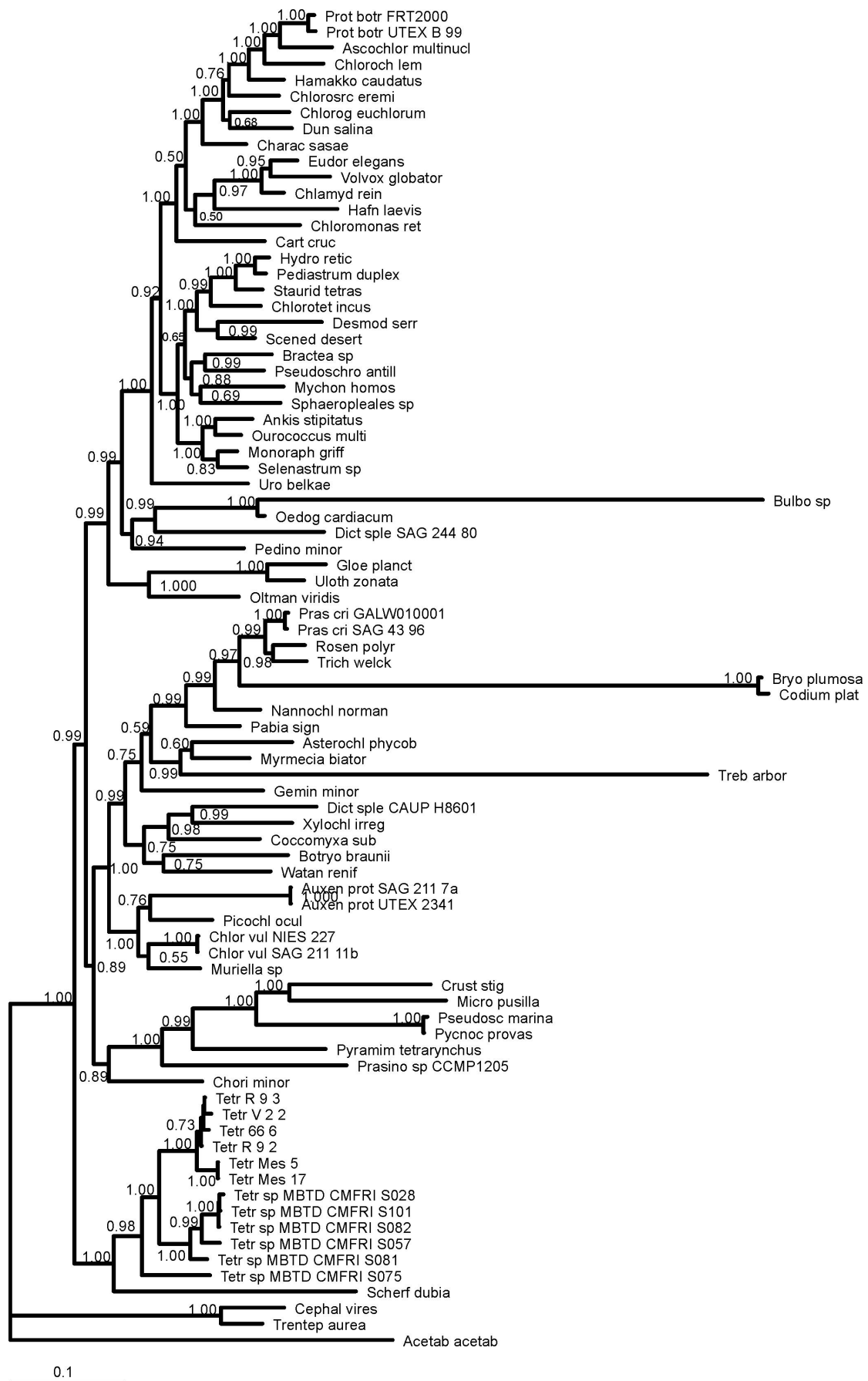


FIGURE 5. 50% majority-rule consensus tree inferred with MrBayes using the *rbcL* and 18S rRNA sequence data. Numbers in nodes correspond to the posterior probability support (only values above 0.5 are indicated). The tree is unrooted. Scale corresponds to substitutions per site. The accession numbers of the sequences used in the analyses are provided in Table 1 of the Supplementary File.

Discussion

Habitat:—The genus *Tetraselmis* represents one of the most versatile genera in terms of tolerance to environmental change. The isolated strains of *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* represent the first ever documented appearance of this taxon in coastal lagoons of Greece, enhancing our understanding on the genus variability in the coastal lagoonal phytoplankton and its possible future exploitation.

Taxonomy:—All the strains examined in this study under LM and TEM, were found to be identical with those identified as *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens* by Hori *et al.* (1983). In particular, the pyrenoid structure of the cells is characteristic of the subgenus *Prasinocladia* Hori, Norris & Chihara (1983: 385), in having a large and broad cavity invading the matrix on the nuclear side that is filled with a lobe of the nucleus (Hori *et al.* 1983) (Fig. 3c). This feature had previously been used to distinguish the genera *Prasinocladus* (Cienkowski) Waern (1952:85) and *Platymonas* West (1916: 3) by Parke & Manton (1965) but that notion was rejected by Chihara & Hori (1972) who pointed out that cells of the species *Prasinocladus ascus* Proskauer (1950: 65) have no nuclear lobe filling the pyrenoid cavity (see also Norris *et al.* 1980). Because of the invagination of a lobe of nucleus into the matrix, the pyrenoid can be seen as being petaloid in form ('horse-shoe shaped') under the light microscope. The subgenus *Prasinocladia* is also characterized by the presence of a thylakoid surrounding the pyrenoid matrix and being continuous into the chloroplast lamellae. Unlike all other subgenera of the genus, no (or a few) hair-like appendages are present on the theca at the bottom of the flagellar pit (Fig. 3b). The structure of the pyrenoid matrix is the key characteristic that led Parke (Parke & Dixon 1968) to transfer *T. verrucosa* Butcher (1959: 69) to the genus *Prasinocladus*. However, Norris *et al.* (1980) concluded that there is no sufficient distinction between the genera *Tetraselmis* and *Prasinocladus* and proposed the latter to be considered as a synonym of the former. Furthermore, Hori *et al.* (1983) proposed that the species presenting the basic features that were previously considered characteristic of the genus *Prasinocladus* (such as the distinct pyrenoid matrix structure) be assigned to the subgenus *Prasinocladia* under the genus *Tetraselmis*. According to the aforementioned authors, this referred to 3 species and in particular, *T. marina* (Cienkowski) R.E. Norris, Hori & Chihara (1980: 337), *T. verrucosa* and *T. rubens* Butcher (1959: 69). After close examinations, Hori *et al.* (1983) concluded that the species *T. verrucosa* and *T. rubens* showed no significant differences in external and internal characteristics, thus rendering the two species fundamentally identical. The only way to distinguish them would be the coloration of the cell; *T. verrucosa* is green while *T. rubens* is reddish with haematochrome (accumulation of red/orange pigment within the cells). The verrucose (warty) appearance of the posterior end of the cell body that was described by Butcher (1959) was not observed by Hori *et al.* (1983) upon examination of the authentic culture of *T. verrucosa* (isolated by Butcher), leading the authors of that study to conclude that the two species should be treated as one with two different forms. Therefore, the green cells of the species belong to *T. verrucosa* f. *verrucosa*, while the red (because of haematochrome accumulation) cells of the species belong to *T. verrucosa* f. *rubens*.

The five strains from the Greek lagoons studied herein, show all the key morphological characteristics of the species *T. verrucosa*, as described by Hori *et al.* (1983), and furthermore accumulate haematochrome within the cell and exhibit a red/violet coloration of the culture medium, something that is consistent with the taxon *T. verrucosa* f. *rubens* described above.

The taxonomic position of the strain Tetr_Mes_5 was originally uncertain, due to the presence of more than one pyrenoid within the chloroplast of some cells, based on LM observations (Nomarski system). Additionally taking into account the culture medium coloration, the strain could have been classified as *Tetraselmis wettsteinii* (J.Schiller) Throndsen (1988: 227). However, upon further TEM examination of the pyrenoid structure it was clear that the strain is indeed a representative of *T. verrucosa* f. *rubens*, since the pyrenoid morphology of *T. wettsteinii* is quite dissimilar.

Molecular analysis: The morphological similarity of the studied strains with the *T. verrucosa* f. *rubens* is validated through the phylogenetic analysis. The studied strains are forming a monophyletic group that hosts the *T. verrucosa* f. *rubens* specimen (Tetr_66_6 or CCMP 66/6) as well (Fig 5). At this point the phylogenetic tree presented herein is not fully resolved (see further discussion below), but is highly supportive of the firm placement of our strains within a monophyletic group that includes the typical *T. verrucosa* f. *rubens* strain. Fully resolving the respective tree would require additional sequence data from all the species involved and this was not the aim of the present study. The molecular divergence data provide additional evidence supporting the taxonomic placement of all the strains within the species and the class Chlorodendrophyceae as it has been proposed by Massjuk & Lilitska (2006). The average pairwise distances between distinct and clearly defined algal species, between the studied strains and the *T. verrucosa* f. *rubens* CCAP 66/6 isolate and the pairwise distance between the *T. verrucosa* f. *rubens* group and the rest of the strains belonging to the genus *Tetraselmis* for both genes, are in such a range that conclusively verify the position of the strains within the *T. verrucosa* species and distinguish them from all other morphologically similar taxa.

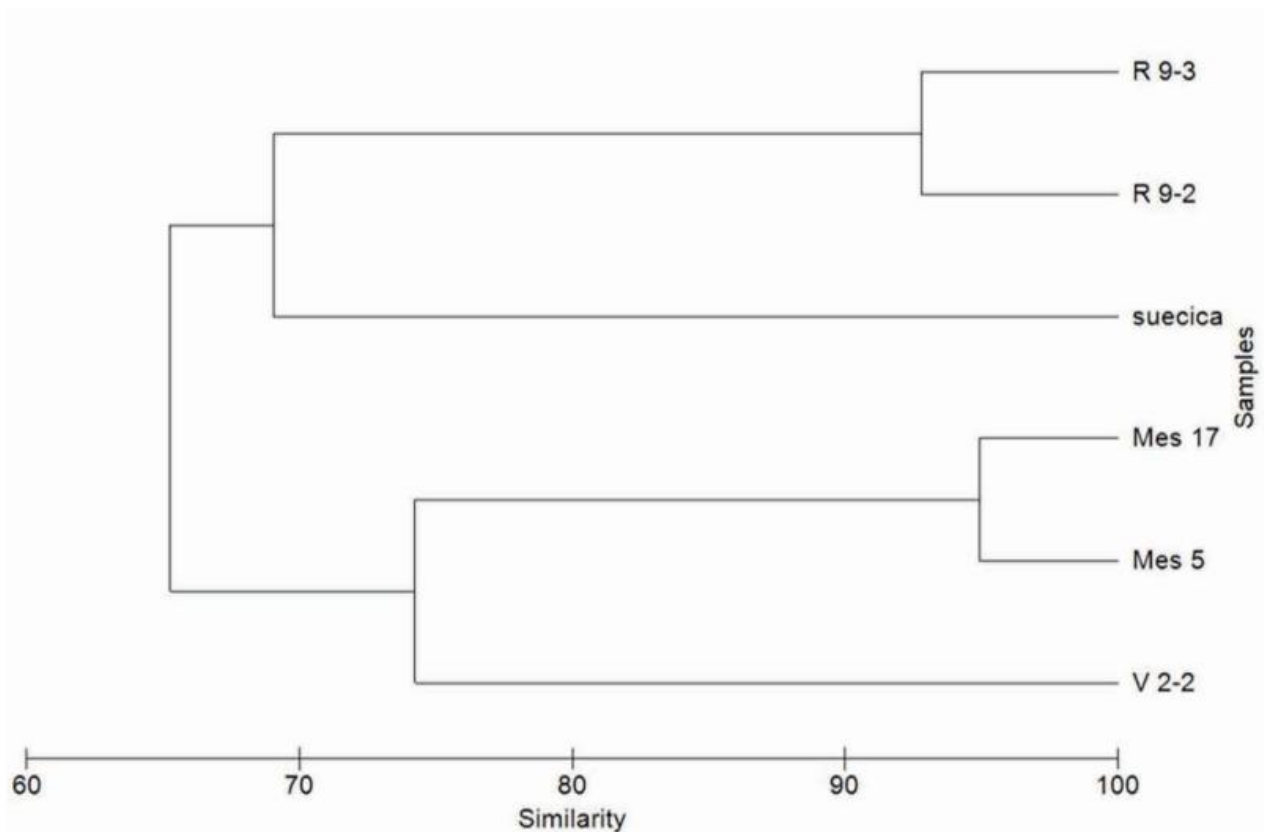


FIGURE 6. Resemblance of the isolated strains Tetr_R_9_2, Tetr_R_9_3, Tetr_V_2_2, Tetr_Mes_5, and Tetr_Mes_17 together with the taxon *T. suecica* that is commonly used in aquaculture, as far as the fatty acid content is concerned, according to Bray-Curtis similarity.

In the phylogenetic tree of Fig. 5, the studied strains form a strongly supported monophyletic clade with the other representatives of the genus *Tetraselmis*, that is the sister clade to the genus' closest relative, *Scherffelia*. Even though the phylogenetic tree that resulted from this analysis shows strong support in individual clades it is not sufficiently resolved, despite the fact that it was a two gene analysis. Apart from the verification of the positioning of the investigated strains there seem to be quite a few controversies relatively to what has been shown so far concerning the prasinophycean clade's position (Leliaert *et al.* 2012, 2014). However, the positioning of the clade is not strongly supported (0.89 bootstrap value) indicating that further data is required in order to obtain a more robust topology. Another interesting point is the monophyly of the classes Trebouxiophyceae and Ulvophyceae as well as that of the entire UTC clade that has been previously questioned (Ruhfel *et al.* 2014, Fučíková *et al.* 2014). Even though there is a lower representation of Ulvophyceae taxa in the current study (much as in Fučíková *et al.* 2014), our data corroborates the observation that Ulvophyceae's monophyletic origin is not strongly supported. Once again it should be noted that the tree presented here is not fully resolved and any conclusions deriving from it should be considered with caution and keeping in mind that additional data and further analysis are required in order to elucidate the phylogenetic relationships depicted therein. It is clear that a multi-gene approach in a large number of species is required to reach a more reliable conclusion, especially in an early derived group such as the green algae (Philippe & Telford 2006). It is evident from the present study that a two locus analysis is insufficient in resolving the phylogenetic relationships between core chlorophytes and prasinophytes. In fact, it has been shown that the amount of information required for such an analysis even exceeds an eight gene approach (Fučíková *et al.* 2014). Therefore, additional data covering a larger number of representatives and genetic markers, are necessary in order to assess the phylogenetic relationships beyond the class level.

However, there is strong evidence that the phylogenetic relationships within the Chlorophyta and the monophyly of the UTC clade require further investigation.

Lipid profile:—Biochemical profiles of marine algae had long been rather obscure due to changes of marine algal biochemical properties, as an adaptation to environmental conditions. Furthermore, the inadequacies of technologically efficient processes for their study, the uncertainty of taxonomic position of most representatives and the lack of standard

culture conditions made it even more difficult to obtain reliable biochemical data on marine algae (Chuecas & Riley 1969, Volkman *et al.* 1989, Dunstan *et al.* 1992). However, in the past few decades, with the increased interest in essential fatty acids that are primarily and *de novo* synthesized by marine algae (Ackman 1989, Adarme-Vega *et al.* 2012, Siriwardhana *et al.* 2012) and the implementation of algae in biofuel production, there has been an increasing number of relevant reports (Patil *et al.* 2007, Lang *et al.* 2011, Liu *et al.* 2011, Griffiths *et al.* 2012, Stansell *et al.* 2012, Nascimento *et al.* 2013). The remarkable fatty acid range of marine algae, comprising significant amounts of ω 3 highly unsaturated lipids, are among the reasons for the great ecological and industrial significance of the group.

The studied strains showed fatty acid profiles coarsely characterizing the class of Prasinophyceae. The typical prasinophycean fatty acid profile was ascertained for the 'Messolonghi' and 'Vatatsa' strains that were analysed in this study, much like the 'Rhodia' strains previously analysed by Tzovenis *et al.* (2009). Furthermore, the 'Vatatsa' strain seems to have a noteworthy amount of EPA (6%), one of the essential fatty acids for animal and human nutrition. Therefore, this strain is a possible candidate for future industrial exploitation possibly after manipulation of culture conditions as well.

Since algal fatty acid profile elucidation is at its infancy, and there is still a lack of valid profiles for the majority of known algal strains, any report on even previously analyzed strains is of significant value. Additionally, the limitation of existing fatty acid profiles to a few representatives (in particular, those of commercial value) further biases the overall picture. In this study, we present the fatty acid profiles of 3 new microalgal *Tetraselmis* strains from Greek coastal lagoons, that have not been previously analyzed [Tetr_Mes_5, Tetr_Mes_17 and Tetr_V_2_2] along with a thorough taxonomic description of them, in addition with the description of two more strains [Tetr_R_9_2, Tetr_R_9_3] whose lipid profiles have previously been presented (Tzovenis *et al.* 2009); this contribution to the elucidation of the variability of microalgal fatty acid content even within the same species and between strains of the same locality, can be not only of industrial but also of taxonomic value, since the increasing estimation and documentation of fatty acid profile could potentially result in their use as supplementary taxonomic markers.

Concluding remarks

Despite the great scientific progress of the past decades, the systematics of green algae remains elusive to the most part, due to the vast variability and wide distribution of this large group (Leliaert *et al.* 2012). In the green algal group of prasinophytes, many researchers discussed the phylogenetic relationships among genera and higher- or lower-level taxa by focusing on the molecular techniques together with the traditional classification based on morphology, leading to taxonomic clarifications and rearrangements (e.g. Massjuk 2006, Massjuk & Lilitska 2006, Leliaert *et al.* 2012). In the present study, we analyzed 5 strains from coastal lagoons of western Greece belonging to *Tetraselmis*, one of the most prominent genera traditionally placed in prasinophytes and one of the most versatile genera in terms of tolerance to environmental changes. The morphological similarity of the studied strains with *T. verrucosa* f. *rubens* was validated via a phylogenetic analysis. Apart from the classical taxonomic identification based on morphology, that places all strains within the taxon *T. verrucosa* f. *rubens*, the molecular data provided here are an additional contribution to the elucidation of the phylogenetic relationships of green algal lineages with *rbcL* and 18S rRNA sequence data. The *rbcL* sequence data documented herein are the first ever for the species *Tetraselmis verrucosa* f. *rubens*.

The biochemical data additionally presented herein, and specifically the fatty acid profiles, contribute as potential taxonomic markers for a better understanding of the intraspecific variability of the genus *Tetraselmis* in the same way as in other groups of microalgae (Pohl & Zurheide 1979, Mourente *et al.* 1990, Cohen *et al.* 1995, Mostaert *et al.* 1998, Lang *et al.* 2011, Sahu *et al.* 2013), including Cyanobacteria (e.g. Christodoulou *et al.* 2015). Moreover, they set the base for further biochemical analyses that can lead to a potential industrial use. Finally, this study enhances our knowledge on the lagoonal phytoplankton diversity and sets the pace for future multivariate taxonomic approaches on other poorly studied or even elusive algal representatives.

Acknowledgements

The authors thank Prof. Ch. Katsaros and Dr. P. Livanos (Department of Botany, Faculty of Biology, University of Athens) for assistance in the TEM and LM techniques, and Dr. Fundulaki (Hellenic Center of Marine Research, HCMR) for assistance in lipid profile analysis.

References

- Ackman, R.G. (1989) Fatty acids. In: Ackman, R.G. (Ed.) *Marine biogenic lipids, fats and oils*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 103–137.
- Adarme-Vega, T.C., Lim, D.K., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y. & Schenk, P.M. (2012) Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories* 11 (1): 96.
<http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-11-96>
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J. & Rueckert, S. (2012) Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59: 429–514.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>
- Alonso-Pérez, F., Ruiz-Luna, A., Turner, J., Berlanga-Robles, C.A. & Mitchelson-Jacob, G. (2003) Land cover changes and impact of shrimp aquaculture on the landscape in the Ceuta coastal lagoon system, Sinaloa, Mexico. *Ocean & Coastal Management* 46 (6): 583–600.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0964-5691\(03\)00036-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-5691(03)00036-X)
- Borowitzka, L.J. (1981) The microflora. In: Williams, W.D. (Ed.) *Salt Lakes. Developments in Hydrobiology. Proceedings of the International Symposium on Athalassic (Inland) Salt Lakes, held at Adelaide, Australia, October 1979*. Springer Netherlands, pp. 33–46.
http://dx.doi.org/10.1007/978-94-009-8665-7_4
- Brown, M.R. & Jeffrey, S.W. (1992) Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acids, sugars and pigments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 161 (1): 91–113.
[http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90192-D](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(92)90192-D)
- Butcher, R.W. (1959) An introductory account of the smaller algae of British coastal waters. Part I: Introduction and Chlorophyceae. *Fisheries Investigations Series IV* 1: 1–74.
- Cañizares, R.O., Rivas, L., Montes, C., Dominguez, A.R., Travieso, L. & Benitez, F. (1994) Aerated swine-wastewater treatment with K-carrageenan-immobilized *Spirulina maxima*. *Bioresource Technology* 47 (1): 89–91.
[http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90035-3](http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(94)90035-3)
- Carcamo, C., Comesana, A.S., Winkler, F.M. & Sanjuan, A. (2005) Allozyme identification of mussels (Bivalvia: *Mytilus*) on the Pacific coast of South America. *Journal of Shellfish Research* 24 (4): 1101–1115.
[http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[1101:AIOMBM\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[1101:AIOMBM]2.0.CO;2)
- Chihara, M. & Hori, T. (1972) The fine structure of *Prasinocladus ascus* and *Platymonas* species found in Japan, with special reference to their taxonomy. In: K. Nisizawa (Ed.) *Proceedings of the 7th International Seaweed Symposium*, Sapporo 1971. University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 188–101.
- Christodoulou, M., Meletiou-Christou, M.-S., Parmakelis, A., Economou-Amilli, A. & Pantazidou, A. (2015). Further findings from Daveli Cave (Attica, Greece) enhancing the establishment of the genus *Oculatella* (Pseudanabaenaceae, Cyanobacteria). *Phytotaxa* 202 (3): 169–184.
<http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.202.3.1>
- Chuecas, L. & Riley, J.P. (1969) Component fatty acids of the total lipids of some marine phytoplankton. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 49 (1): 97–116.
<http://dx.doi.org/10.1017/S0025315400046439>
- Cienkowski, L. (1881) An account on the White Sea excursion in 1880. *Proceedings St. Petersburg Imperiale Société des Naturalistes* 12: 130–171.
- Clarke, K.R. & Gorley, R.N. (2006) *PRIMER v6: User Manual/Tutorial*. PRIMER-E, Plymouth, 192 pp.
- Cohen, Z., Norman, H.A. & Heimer, Y.M. (1995) Microalgae as a source of omega 3 fatty acids. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 77: 1–31.
<http://dx.doi.org/10.1159/000424462>
- Cullaj, A., Hasko, A., Miho, A., Schanz, F., Brandl, H. & Bachofen, R. (2005) The quality of Albanian natural waters and the human impact. *Environment International* 31 (1): 133–146.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2004.06.008>
- Daughjerg, N., Moestrup, Ø. & Arctander, P. (1994) Phylogeny of the genus *Pyramimonas* (Prasinophyceae, Chlorophyta) inferred from the *rbcL* gene. *Journal of Phycology* 30: 991–999.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00991.x>
- Dolapsakis, N.P., Kilpatrick, M.W., Economou-Amilli, A. & Tafas, T. (2006) Morphology and rDNA phylogeny of a Mediterranean

- Coolia monotis* (Dinophyceae) strain from Greece. *Scientia Marina* 70 (1): 67–76.
<http://dx.doi.org/10.3989/scimar.2006.70n167>
- Dolapsakis, N.P., Tzovenis, I., Kantourou, P., Bitis, I. & Economou-Amilli, A. (2008) Potentially harmful microalgae from lagoons of the NW Ionian Sea, Greece. *Journal of Biological Research* 9: 89–95. Available from: <http://www.jbr.gr/papers20081/11-Dolapsakis%20et%20al.pdf>
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Jeffrey, S.W. & Barrett, S.M. (1992) Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 2. Lipid classes and fatty acids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 161 (1): 115–134.
[http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90193-E](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(92)90193-E)
- Ferreira, J.G., Wolff, W.J., Simas, T.C. & Bricker, S.B. (2005) Does biodiversity of estuarine phytoplankton depend on hydrology? *Ecological Modelling* 187: 513–523.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.03.013>
- Fon-Sing, S. & Borowitzka, M.A. (2015) Isolation and screening of euryhaline *Tetraselmis* spp. suitable for large-scale outdoor culture in hypersaline media for biofuels. *Journal of Applied Phycology*: 1–14.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10811-015-0560-2PB>
- Fučíková, K., Leliaert, F., Cooper, E. D., Skaloud, P., D'hondt, S., De Clerck, O., Gurgel, F., Lewis, L.A., Lewis, P. O., Lopez-Bautista, J., Delwiche, C. F. & Verbruggen, H. (2014) New phylogenetic hypotheses for the core Chlorophyta based on chloroplast sequence data. *Frontiers in Ecology and Evolution* 2:63.
<http://dx.doi.org/10.3389/fevo.2014.00063>
- Gilbert, J. (2001) Seasonal plankton dynamics in a Mediterranean hypersaline coastal lagoon: the Mar Menor. *Journal of Plankton Research* 23 (2): 207–218.
<http://dx.doi.org/10.1093/plankt/23.2.207>
- Griffiths, M.J., van Hille, R.P. & Harrison, S.T. (2012) Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology* 24(5): 989–1001.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10811-011-9723-y>
- Hori, T., Norris, R.E. & Chihara, M. (1982) Studies on the ultrastructure and taxonomy of the genus *Tetraselmis* (Prasinophyceae). I. Subgenus *Tetraselmis*. *The Botanical Magazine = Shokubutsu-gaku-zasshi* 95(1): 49–61.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02493410>
- Hori, T., Norris, R.E. & Chihara, M. (1983) Studies on the Ultrastructure and Taxonomy of the Genus *Tetraselmis* (Prasinophyceae). II. Subgenus *Prasinocladia*. *The Botanical Magazine = Shokubutsu-gaku-zasshi* 96: 385–392.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02488183>
- Hori, T., Norris, R.E. & Chihara, M. (1986) Studies on the Ultrastructure and Taxonomy of the Genus *Tetraselmis* (Prasinophyceae). III. Subgenus *Parviselmis*. *The Botanical Magazine = Shokubutsu-gaku-zasshi* 99: 123–135.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02488627>
- Hossain, A.S., Salleh, A., Boyce, A.N., Chowdhury, P. & Naquiddin, M. (2008) Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4 (3): 250–254.
<http://dx.doi.org/10.3844/ajbbsp.2008.250.254>
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–20.
<http://dx.doi.org/10.1007/bf01731581>
- Knuckey, R.M., Semmens, G.L., Mayer, R.J. & Rimmer, M.A. (2005) Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinjiensis*: effect of algal species and feed concentration on copepod development. *Aquaculture* 249 (1): 339–351.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.053>
- Kuhner, M.K. (2009) Coalescent genealogy samplers: windows into population history. *Trends in Ecology & Evolution* 24: 86–93.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.007>
- Kylin, H. (1949) Die Chlorophyceen der schwedischen Westküste. *Lunds Universitets Arsskrift N.F. Avd. 2* 45 (4): 1–79.
- Lang, I., Hodac, L., Friedl, T. & Feussner, I. (2011) Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BioMed Central Plant Biology* 11 (1): 124.
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-11-124>
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W. & Guindon, S. (2012) PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1695–1701.
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mss020>
- Lee, R.E. (2008) *Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge (GB), 560 pp.

- Leliaert, F., Smith D.R., Moreau, H., Herron, M.D., Verbruggen, H., Delwiche, C.F. & De Clerck, O. (2012) Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31 (1): 1–46.
<http://dx.doi.org/10.1080/07352689.2011.615705>
- Lepage, G. & Roy, C.C. (1984) Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research* 25: 1391–1396.
- Liu, J., Huang, J., Sun, Z., Zhong, Y., Jiang, Y. & Chen, F. (2011) Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresource Technology* 102(1): 106–110.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1103014108>
- Luong-Van, J.T. & Hayward, E. (2007) Immobilized *Tetraselmis* sp. for ease of TEM processing and for ultrastructure research. *Journal of Applied Phycology* 19: 685–688.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10811-007-9212-5>
- Massjuk, N.P. (2006) Chlorodendrophyceae class. nov. (Chlorophyta, Viridiplantae) in the Ukrainian flora: I. The volume, phylogenetic relations and taxonomical status. *Ukrainian Botanical Journal* 63: 601–614 [in Ukrainian].
- Massjuk, N.P. & Lilitzka, G.G. (2006) Chlorodendrophyceae, class. nov. (Chlorophyta, Viridiplantae) in the Ukrainian flora. II. The genus *Tetraselmis* F. Stein. *Ukrainian Botanical Journal* 63 (6): 741–758 [In Ukrainian].
- Mostaert, A.S., Karsten, U., Hara, Y. & Watanabe, M.M. (1998) Pigments and fatty acids of marine raphidophytes: A chemotaxonomic re-evaluation. *Phycological Research* 46 (4): 213–220.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1835.1998.00138.x>
- Mourente, G., Lubian, L.M. & Odriozola, J.M. (1990) Total fatty acid composition as a taxonomic index of some marine microalgae used as food in marine aquaculture. *Hydrobiologia* 203 (3): 147–154.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00005683PB>
- Nascimento, I.A., Marques, S.S.I., Cabanelas, I.T.D., Pereira, S.A., Druzian, J.I., de Souza, C.O., Vich, D.V., Carvalho, G.C. & Nascimento, M.A. (2013) Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *BioEnergy Research* 6 (1): 1–13.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12155-012-9222-2>
- Newton, A., Icely, J.D., Falcão, M., Nobre, A., Nunes, J.P., Ferreira, J.G. & Vale, C. (2003) Evaluation of eutrophication in the Ria Formosa coastal lagoon, Portugal. *Continental Shelf Research* 23 (17): 1945–1961.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.csr.2003.06.008>
- Norris, R.E., Hori, T. & Chihara, M. (1980) Revision of the genus *Tetraselmis* (Class Prasinophyceae). *The Botanical Magazine= Shokubutsu-gaku-zasshi* 93 (4): 317–339.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02488737>
- Norris, R.E. (1982) Prasinophyceae. In: Parker, S.P. (Ed.) *Synopsis and classification of living organisms*. Vol. 1. McGraw-Hill Book Company, New York, 2424 pp.
- Olaizola, M. (2003) Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering* 20 (4): 459–466.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00076-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00076-5)
- Papandroulakis, N., Dimitris, P. & Pascal, D. (2002) An automated feeding system for intensive hatcheries. *Aquacultural Engineering* 26(1): 13–26.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8609\(01\)00091-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8609(01)00091-7)
- Parke, M. & Manton, I. (1965) Preliminary observations on the fine structure of *Prasinocladus marinus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 45 (2): 525–536.
<http://dx.doi.org/10.1017/S0025315400054989>
- Pascher, A. (1911) *Scherffelia*, eine neue Chlamydomonadine aus Bohmen. *Lotos* 59: 341–342.
- Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G. & Gislerød, H.R. (2007) Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International* 15 (1): 1–9.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10499-006-9060-3>
- Philippe, H. & Telford, M. J. (2006) Large-scale sequencing and the new animal phylogeny. *Trends in Ecology & Evolution* 21(11): 614–620.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2006.08.004>
- Pohl, P. & Zurheide, F. (1979) Fatty acids and lipids of marine algae and the control of their biosynthesis by environmental factors. In: Hoppe, H.A., Levring, T. & Tanaka, Y. (Eds) *Marine algae in pharmaceutical science*. W. de Gruyter, Berlin, New York, pp. 473–523.
<http://dx.doi.org/10.1515/9783110882049.473>
- Proskauer, J. (1950) On *Prasinocladus*. *American Journal of Botany* 37: 59–66.

<http://dx.doi.org/10.2307/2438141>

- Pombert, J.F. & Keeling, P.J. (2010) The mitochondrial genome of the entomoparasitic green alga *Helicosporidium*. *PLoS ONE* 5:e8954.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008954>
- Romari, K. & Vaulot, D. (2004) Composition and temporal variability of picoeukaryote communities at a coastal site of the English Channel from 18S rDNA sequences. *Limnology and Oceanography* 49 (3): 784–798.
- Ronquillo, J.D., Matias, J.R., Saisho, T. & Yamasaki, S. (1997) Culture of *Tetraselmis tetrahele* and its utilization in the hatchery production of different penaeid shrimps in Asia. In: Hagiwara, A., Snell, T.W., E Lubzens, E.E. & Tamaru, C.S. (Eds.) *Live Food in Aquaculture*. Springer Netherlands, pp. 237–244.
http://dx.doi.org/10.1007/978-94-017-2097-7_37
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. & Huelsenbeck, J.P. (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
<http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Ruhfel, B., Gitzendanner, M., Soltis, P., Soltis, D. & Burleigh, J. (2014) From algae to angiosperms-inferring the phylogeny of green plants (Viridiplantae) from 360 plastid genomes. *BMC Evolutionary Biology* 14: 23.
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-14-23>
- Sahu, A., Pancha, I., Jain, D., Paliwal, C., Ghosh, T., Patidar, S. & Mishra, S. (2013) Fatty acids as biomarkers of microalgae. *Phytochemistry* 89: 53–58.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.02.001>
- Schiller, J. (1913) Vorläufige Ergebnisse der Phytoplanktonuntersuchungen auf den Fahrten S. M.S. 'Najade' in der Adria. II. Flagellaten und Chlorophyteen. *Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften in Wien, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse* 122: 621–630.
- Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics* 6: 461–464.
<http://dx.doi.org/10.1214/aos/1176344136>
- Servel, M.O., Claire, C., Derrien, A., Coiffard, L. & De Roeck-Holtzhauer, Y. (1994) Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry* 36 (3): 691–693.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89798-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89798-8)
- Siriwardhana, N., Kalupahana, N.S. & Moustaid-Moussa, N. (2012) Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. In: Kim, S.-K. (Ed.) *Advances in Food and Nutrition Research*. Vol.65. *Marine Medicinal Foods: Implications and Applications-Animals and microbes*. Academic Press, Oxford, pp. 211–222.
- Smith, V.H. (2003) Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems a global problem. *Environmental Science and Pollution Research* 10 (2): 126–139.
<http://dx.doi.org/10.1065/espr2002.12.142>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (2): 87–96.
<http://dx.doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Spurr, A.R. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26(1): 31–43.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5320\(69\)90033-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5320(69)90033-1)
- Stansell, G.R., Gray, V.M. & Sym, S.D. (2012) Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. *Journal of Applied Phycology* 24 (4): 791–801.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10811-011-9696-x>
- Stein, F. von (1878). *Der Organismus der Infusionsthier. III. Flagellaten I*. Engelmann, Leipzig, 154 pp.
- Tagliapietra, D. & Volpi Ghirardini, A. (2006) Notes on coastal lagoon typology in the light of the EU Water Framework Directive: Italy as a case study. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 16 (5): 457–467.
<http://dx.doi.org/10.1002/aqc.768>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Thronsen, J. & Zingone, A. (1988) *Tetraselmis wettsteinii* (Schiller) Thronsen *comb. nov.* and its occurrence in golfo di Napoli. *Plant Biosystem* 122 (3–4): 227–235.
<http://dx.doi.org/10.1080/11263508809429402>
- Tomas, C.R (1997) *Identifying marine phytoplankton*. Academic Press, San Diego, 858 pp.
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-012693018-4/50001-X>

- Turmel, M., Otis, C. & Lemieux, C. (2009) The chloroplast genomes of the green algae *Pedinomonas minor*, *Parachlorella kessleri*, and *Oocystis solitaria* reveal a shared ancestry between the Pedinomonadales and Chlorellales. *Molecular Biology and Evolution* 26, 2317–2331.
<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msp138>
- Tzovenis, I. (2001) *Optimisation of the biomass and fatty acid production of the microalga Isochrysis aff. galbana (clone T-ISO) for aquacultural and industrial purposes*. Diss. Gent University, Gent, 306 pp.
- Tzovenis, I., Fountoulaki, E., Dolapsakis, N., Kotzamanis, I., Nengas, I., Bitis, I., Cladas, Y. & Economou-Amilli, A. (2009) Screening for marine nanoplanktic microalgae from Greek coastal lagoons (Ionian Sea) for use in mariculture. *Journal of Applied Phycology* 21 (4): 457–469.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10811-008-9393-6>
- Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I. & Garland, C.D. (1989) Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 128 (3): 219–240.
[http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981\(89\)90029-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0981(89)90029-4)
- Waern, M. (1952) Rocky-shore algae in the Öregrund Archipelago. *Acta Phytogeographica Suecica* 30: 1–298.
- Walne, P.R. (1970) Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fisheries Investigations, Ministry of Agriculture. Fish Food (GB)* 11: 1–61.
- West, G.S. (1916) Algological notes XVIII–XXIII. *Journal of Botany, British and Foreign* 54: 1–10.
- Worden, A.Z., Nolan, J.K. & Palenik, B. (2004) Assessing the dynamics and ecology of marine picophycoplankton: The importance of the eukaryotic component. *Limnology and Oceanography* 49 (1): 168–179.
<http://dx.doi.org/10.4319/lo.2004.49.1.0168>