

MASARYKOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**MODERNÍ BIOFYZIKÁLNÍ METODY VE STUDIU FOTOSYNTÉZY
POIKILOHYDRICKÝCH ORGANISMŮ**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

ALLA OREKHOVA

VEDOUCÍ PRÁCE: PROF. ING. MILOŠ BARTÁK, CSc.

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

BRNO 2021

Bibliografický záznam

Autor:	Alla Orekhova Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Ústav experimentální biologie
Název práce:	Moderní biofyzikální metody ve studiu fotosyntézy poikilohydrických organismů
Studijní program:	PřF N-EXB Experimentální biologie
Studijní obor:	Anatomie a fyziologie rostlin
Vedoucí práce:	Prof. Ing. Miloš Barták, CSc.
Rok:	2021
Počet stran:	114
Klíčová slova:	mechy, lišejníky, řasy, dehydratace, fotoinhibice, šokové zmrazení, parametry fluorescence chlorofylu

Bibliographic record

Author: Alla Orekhova
Faculty of Science, Masaryk University,
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Modern biophysical methods in the study of
photosynthesis of poikilohydric organisms

Degree Programme: PŘF N-EXB Experimental Biology

Field of Study: PŘF AFYR Plant Physiology and Anatomy

Supervisor: Prof. Ing. Miloš Barták, CSc.

Year: 2021

Number of Pages: 114

Keywords: algae, mosses, lichens, desiccation, photoinhibition, shock
freezing, parameters of chlorophyll fluorescence

Abstrakt

Tématem dizertační práce je využití moderních biofyzikálních metod ve studiu fotosyntézy poikilohydrických autotrofních organismů, jako jsou mechy, lišejníky a řasy. Cílem práce je kvantifikovat odezvu fotosyntetického aparátu modelových druhů poikilohydrických organismů z polárních oblastí Země na stresové faktory prostředí, a to pomocí řízených laboratorních experimentů. Experimentální část doktorské disertační práce je zaměřena na studium primárních procesů fotosyntézy v průběhu vysychání a fotoinhibice u mechů a lišejníků. Další částí práce je studium šokového zmrazení na rychlost obnovení primárních fotosyntetických procesů fotosyntézy ve fotosystému II u mikrořas z Antarktidy. V práci byly použity fluorescenční metody: pomalá Kautského kinetika fluorescence chlorofylu (KK), rychlá indukční kinetika fluorescence chlorofylu (OJIP), a metoda měření fluorescenčních parametrů v průběhu rané fáze fotoinhibice.

Úspěšný růst kryptogamů (mechy, lišejníky a řasy) v Antarktidě je nepochybně způsoben jejich poikilohydrickou povahou, jejich schopností vyrovnávat svůj vodní status s okolním prostředím. Kromě dostupnosti vody, je růst těchto autotrofních organismů také významně omezen nízkou teplotou a vysokými hodnotami záření. Z těchto důvodů byly použity dva dominantní druhy stresu: vysychání a fotoinhibice, respektive odpovědi studovaných organismů na tyto faktory. Dále byl zkoumán vliv extrémně nízké teploty (šokové zmrazení) na životaschopnost buněk mikrořas a obnovení jejich primárních procesů fotosyntézy po šokovém zmrazení.

Dizertační práce shrnuje výsledky 6 odborných článků zaměřených na využití různých metod (zejména fluorescence chlorofylu) při měření (1) stresu způsobeného vysycháním (Orekhova et al. 2018a; Orekhova et al. 2021a; Barták et al. 2021), (2) stresu vysokým zářením (Orekhova et al. 2021b) a stresu šokovým zmrazením (Orekhova et al. 2018b; Orekhova et al. 2019). V doktorské disertační práci byly využity i další biofyzikální metody studia projevů stresu u mechů a lišejníků: měření změn spektrální odrazivosti v průběhu jejich vysychání.

Abstract

The topic of doctoral thesis is the application of modern biophysical methods in photosynthetic studies in poikilohydric autotrophic organisms such as mosses, lichens and algae. The aim of the doctoral thesis was to quantify the response of photosynthetic apparatus to stress factors in model species of poikilohydric autotrophs from Earth polar regions by the controlled laboratory experiments. The experimental part of the doctoral thesis focuses on primary photosynthetic processes in mosses and lichens during their desiccation and photoinhibition. Another part of the thesis deals with the study of a shock freezing effects and the rate of recovery of primary photosynthetic processes in PSII of Antarctic microalgae. In the experiments, the following methods of chlorophyll fluorescence were used: slow Kautsky kinetics of chlorophyll fluorescence (KK), fast induction kinetics of chlorophyll fluorescence (OJIP), and the measurements of chlorophyll fluorescence parameters during the early phase of photoinhibition.

Successful growth of cryptogamic poikilohydric organisms (mosses, lichens, algae) in Antarctica is undoubtedly caused by their poikilohydric character, and the ability to balance their hydration status with surrounding environment. Apart of water availability, low temperature and high radiation in austral summer season may limit their growth substantially. Due to this reason, two dominant stress factors, the response of the organisms, respectively, have been studied, *i.e.* desiccation and photoinhibition. Moreover, the effect of extremely low temperature (shock freezing) on viability of microalgal cells, and the recovery of primary photosynthetic processes have been studied as well.

The doctoral thesis sums up the results that have been presented in 6 scientific papers dealing with the application of different methods (mainly chlorophyll fluorescence) in the measurements of (1) desiccation stress (Orekhova et al. 2018a, Orekhova et al. 2021a, Barták et al. 2021), (2) high light stress (Orekhova et al. 2021b), and shock freezing stress (Orekhova et al. 2018b, Orekhova et al. 2019). In the doctoral thesis, other biophysical methods of the measurements of stress in mosses and lichens, such as spectral reflectance measurements, have been used as well.

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce, prof. Ing. Miloši Bartákovi, CSc., za cenné konzultace při plánování a realizaci experimentů, za neocenitelné rady i čas, který mi věnoval při psaní této disertační práce.

Děkuji rovněž všem svým kolegům, zvláště pak Mgr. Josefu Hájkovi, Ph.D., Mgr. Petru Váczimu, Ph.D., Mgr. Michaele Bednaříkové, Ph.D., Mgr. Janě Morkusové a dalším spolupracovníkům z Oddělení Fyziologie a Anatomie Rostlin za jejich cenné rady, nezištnou pomoc při realizaci a vyhodnocování uskutečněných experimentů.

Děkuji také svým rodičům, synovi a manželovi za jejich lásku, povzbuzení a trpělivost.

Přehled publikací a vymezení podílu autorky dizertační práce

Práce vychází z 6 rukopisů autorky (Alla Orekhova, v dalším textu zkráceno na AO):

Publikace 1 (Příloha 2)

Orekhova A., Barták M., Hájek J., Morkusová J. (2021a) Species-specific responses of spectral reflectance and photosynthetic characteristics in two selected Antarctic mosses to thallus desiccation. *Acta Physiologiae Plantarum* – in press.

AO se podílela na přípravě designu studie, samostatně realizovala laboratorní experimenty v práci popsané, připravila draft rukopisu a zfinalizovala text po připomínkách od spoluautorů.

Publikace 2 (Příloha 3)

Barták M., Hájek J., **Orekhova A.**, Villagra J., Marín C., Palfner G., Casanova-Katny A. (2021) Inhibition of primary photosynthesis in desiccating Antarctic lichens differing in their photobionts, thallus morphology and spectral properties. Special Issue on "Lichen functional traits and Ecosystem Functions". *Microorganisms*, 9: 818. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040818>.

AO se podílela na zpracování literární rešerše vztahující se k tématu článku, na vyhodnocení a zpracování dat z měření uskutečněných spoluautory v rámci antarktické expedice na ostrov krále Jiřího (Antarktida).

Publikace 3 (Příloha 4)

Orekhova A., Marečková M., Hazdrová J., Barták M. (2018a) The effect of upper cortex absence on spectral reflectance indices in Antarctic lichens during thallus dehydration. *Czech Polar Reports*, 8(1): 107-118. doi:10.5817/CPR2018-1-8.

AO připravila design experimentu, samostatně provedla laboratorní měření a podílela se na analýze dat, připravila podklady pro publikaci a podílela se na psaní textu. Připravila pracovní verzi rukopisu (úvod, metody, výsledky, část diskuze) a zpracovala příspěvky spoluautorů.

Publikace 4 (Příloha 5)

Orekhova A., Barták M., Casanova-Katny A., Hájek J. (2021b) Resistance of Antarctic moss *Sanionia uncinata* to photoinhibition: chlorophyll fluorescence analysis of samples from the western and eastern coasts of the Antarctic Peninsula. *Plant Biology*, 23: 653-663. doi: 10.1111/plb.13270.

AO po konzultaci se spoluautory připravila design experimentu, vyhodnotila data, interpretovala získané výsledky. Připravila pracovní verzi rukopisu (úvod, metody, výsledky, část diskuze) a zpracovala příspěvky spoluautorů.

Publikace 5 (Příloha 6)

Orekhova A., Barták M., Hájek J. (2018b) Post rapid freezing growth of Antarctic strain of *Heterococcus* sp. monitored by cell viability and chlorophyll fluorescence. *Cryobiology*, 856: 39-46. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.10.004.

AO připravila design experimentu, samostatně provedla laboratorní měření a podílela se na analýze dat. Připravila pracovní verzi rukopisu (úvod, metody, výsledky, část diskuze) a zpracovala příspěvky spoluautorů.

Publikace 6 (Příloha 7)

Orekhova A., Barták M., Özkar A., Elster J. (2019) The effect of shock freezing on physiological properties and consequent growth of Antarctic filamentous (*Stigeoclonium* sp.) and coccal alga (*Diplosphaera chodatii*) on agar plates. *Czech Polar Reports*, 9(1): 37-48. doi:10.5817/CPR2019-1-4.

AO pod vedením školitele připravila plán experimentů, realizovala studie využívající fluorescenci chlorofylu. Připravila draft rukopisu a finalizovala text po připomínkách od spoluautorů.

Další publikace autorky, které nebyly zahrnuty do dizertační práce:

Publikace v databázi SCOPUS

Barták M., **Orekhova A.**, Nezval J., Oravec M., Hájek J., Špunda V, Tříška J., Bednaříková M., Giudici G.N.M., Pech R. (2020) Light regimen-induced variability of photosynthetic pigments and UV-B absorbing compounds in *Luzula sylvatica* from Arcto-Alpine tundra. *Czech Polar Reports*, 10 (2): 263-280.

Weiss J., **Orekhova A.** (2020) Biometrical analysis and thallus morphology characteristics of *Placopsis antarctica* from King George Island, Antarctica, (short communication). *Czech Polar Reports*, 10 (2): 161-168.

Obsah

1. ÚVOD	13
1.1. Obecná charakteristika poikilohydrických organismů	13
1.2. Odolnost poikilohydrických autotrofních organismů vůči vysychání	15
1.2.1. <i>Odolnost mechů vůči vysychání</i>	15
1.2.2. <i>Odolnost lišejníků vůči vysychání</i>	20
1.2.3. <i>Spektrální odrazivost mechů a lišejníků při vysychání stélky</i>	23
1.3. Odolnost poikilohydrických autotrofních organismů na vysokou úroveň ozáření	25
1.4. Účinky šokového zmrazení na životaschopnost mikrořas	29
1.5. Moderní biofyzikální metody ve studiu fotosyntézy poikilohydrických organismů	31
1.5.1. <i>Fluorescence chlorofylu (KK plus QA)</i>	31
1.5.2. <i>Měření pomalé Kautského kinetiky</i>	34
1.5.3. <i>Metoda OJIP</i>	35
2. MATERIÁL A METODY	40
2.1. Popis místa sběru vzorků	40
2.2. Experimentální druhy, charakteristika použitých metod	41
2.2.1. <i>Experiment 1. VYSYCHÁNÍ</i>	41
2.2.2. <i>Experiment 2. FOTOINHIBICE</i>	46
2.2.3. <i>Experiment 3. ŠOKOVÉ ZMRAZENÍ</i>	47
3. VÝSLEDKY	52
3.1. Experiment 1 – Druhově specifické reakce fotosyntetických charakteristik u dvou vybraných antarktických mechů a lišejníků na vysychání stélek	52
3.2. Experiment 2 – Odolnost <i>Sanionia uncinata</i> vůči fotoinhibici: Analýza parametrů fluorescence chlorofylu	64
3.3. Experiment 3 – Šokové zmrazení a životaschopnost buněk sledovaná pomocí fluorescence chlorofylu	67
4. DISKUSE	72
5. ZÁVĚR	89
6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	92
7. PŘÍLOHY 1 – 7	115

Seznam příloh:

Příloha 1 – Tabulky 1-3.

Příloha 2 – Orekhova et al. 2021a

Příloha 3 – Barták et al. 2021

Příloha 4 – Orekhova et al. 2018a

Příloha 5 – Orekhova et al. 2021b

Příloha 6 – Orekhova et al. 2018b

Příloha 7 – Orekhova et al. 2019

Seznam použitých zkratek

APX	askorbát peroxidáza
CAT	kataláza
EOC (<i>oxygen-evolving complex</i>)	kyslík-vyvíjející komplex
F_V/F_M	potenciální kvantový výtěžek fotosyntetických procesů v PSII
Φ_{PSII}	efektivní kvantový výtěžek fotosyntetických procesů v PSII
GR	glutathionreduktáza
GSH	glutathion
ChlF	fluorescence chlorofylu
JRI	ostrov Jamese Rosse
KGI	ostrov krále Jiřího
KK	pomalá Kautského kinetika
LHC	světlosběrný komplex
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
OJIP – O-J-I-P	fáze rychlé kinetiky indukované fluorescence
POD	peroxid dismutáza
PPK	pigment-proteinový komplex
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
Q_A	plastochinon ve vazbovém místě A
Q_B	plastochinon ve vazbovém místě B
qN, NPQ	nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu
qP	fotochemické zhášení fluorescence chlorofylu
RC	reakční centrum
RfD	relativní koeficient poklesu fluorescence (vitalitní index)
ROS (<i>reactive oxygen species</i>)	volné kyslíkové radikály
RWC	relativní obsah vody
SOD	superoxid dismutáza
VDE	violaxanthin de-epoxidáza

1. ÚVOD

1.1. Obecná charakteristika poikilohydrických organismů

Tato disertační práce je věnována studiu vlivu různých typů stresu na poikilohydrické autotrofní organismy pomocí moderních biofyzikálních metod studia primárních procesů fotosyntézy. V mé experimentální práci jsem používala především mechy, lišejníky a řasy z polárních oblastí Země, zejména Antarktidy. S ohledem na skutečnost, že v práci byly použity rostlinné vzorky z Antarktidy, byly pro experimentální práci zvoleny dva dominantní druhy stresu, které jsou typické pro polární oblast, tedy vysychání stélky a vliv vysokých hodnot fotosynteticky aktivního záření (fotoinhibice). Dále byl zkoumán vliv extrémně nízké teploty (šokové zmrazení) na životaschopnost a fyziologické projevy buněk mikrořas, zejména rychlost obnovení primárních procesů fotosyntézy po rychlém (šokovém) zmrazení řasové kultury.

Vybrané druhy antarktických autotrofů, které byly použity v experimentech, představují organismy vyskytující v prostředí typickém širokou škálou působících environmentálních stresorů. Můžete mezi ně, kromě výše uvedených, počítat časté a rychlé cykly zmrazení-rozmrazování a vystavení vysokým dávkám ultrafialového záření. Tyto stresové faktory, ale hlavně extrémní sucho a teploty pod bodem mrazu výrazně omezují druhovou rozmanitost vegetace na stanovištích, kde se v Antarktidě vyskytuje mechová vegetace. Tento fakt byl potvrzen pro různé druhy antarktických mechů, například ve studii Robinson et al. (2003). V důsledku drsných podmínek panujících v Antarktidě a mimořádně krátkého letního vegetačního období výrazně převažuje druhová rozmanitost kryptogamů (mechorostů, lišejníků a řas – obr. 1) oproti cévnatým rostlinám. Kryptogamy čítají více než 600 druhů, z toho 139 druhů mechů (Bendarek-Ochira et al. 2000; Ochyra et al. 2008) a flóra lišejníků dosahuje přibližně 500 druhů (484 druhů) (Øvstedal a Lewis Smith 2011). V Antarktidě se nachází pouze 2 druhy cévnatých rostlin, a to *Deschampsia antarctica* a *Colobanthus quitensis* (Bednarek-Ochyra et al. 2000; Øvstedal a Lewis Smith 2004; Ochyra et al. 2008). V poslední době se počet druhů cévnatých rostlin zvyšuje díky nově zavlékaným druhům, například *Poa annua* (Chwedorzewska 2008; Chwedorzewska et al. 2014; Galera et al. 2017) nebo druhy, které mohou být považovány za invazivní v rámci pobřežního regionu kvůli zvýšené intenzitě turismu a antropogenního šíření (*Leptinella scariosa* a *Leptinella plumosa*, Hughes et al. 2020). Dalším fenoménem posledních desetiletí, který souvisí s globální změnou klimatu je nástup nepůvodních druhů do flóry Antarktidy, včetně rostlin z čeledí *Brassicaceae*, *Campanulaceae*, *Crassulaceae*, *Juncaceae*,

Loasaceae, *Plantaginaceae* a *Scrophulariaceae* (Bokhorst et al. 2021). Zatím v současnosti však na Antarktidě stále dominují poikilohydrické rostliny.

Úspěšné přežívání kryptogamních rostlin v Antarktidě je nepochybně způsobeno jejich poikilohydrickou povahou a jejich schopností reagovat na změnu dostupnosti vody v oblasti jejich výskytu (Schlensog et al. 2004). Díky morfologickým, biochemickým a anatomickým adaptacím, poikilohydrické organismy mohou vysychat do fyziologicky neaktivního stavu, ve kterém je z protoplasm v důsledku vysychání stélky odstraněna velká část vody a v buňce zůstává jen velmi malé množství pevně vázané vody, co je prokázáno u lišejníků (Haranczyk et al. 2017). Tento stav nastává během nepříznivých období, zejména v chladných, suchých antarktických zimních měsících (Proctor et al. 2007). V suchém stavu mohou pak mechy a lišejníky přežívat v extrémně chladných podmínkách.



Obrázek 1. Příklad zástupců třech skupin poikilohydrických rostlin – mech, lišejník a řasa.

Pro poikilohydrické autotrofní organismy jsou typické unikátní vlastnosti, které je odlišují od homoiohydrických rostlin (Evenari 1985). Tyto vlastnosti jsou: (1) schopnost snášet extrémní a dlouhodobé vysychání; (2) schopnost vstupovat do anabiotického stavu při silném stupni vyschnutí (3) mimořádná odolnost vůči nízké a vysoké teplotě v anabiotickém stavu; (4) schopnost rostliny vyrovnat míru hydratace stélky s atmosférickou vlhkostí tak, že stélka absorbuje vodu ve formě páry, rosy nebo deště; (5) schopnost velmi rychle obnovit metabolickou aktivitu po ovlhčení stélky a naopak; (6) schopnost procházet opakovanými obdobími hydratace a dehydratace bez poškození základních fyziologických funkcí; (7) schopnost udržet významnou fotosyntetickou aktivitu při nízkých teplotách a nízké intenzitě světla.

Nedostatek vody vede k negativním reakcím v rostlinném organismu, který v procesu evoluce vytvořil několik ochranných mechanismů, aby odolal působení tohoto stresového faktoru. Pro zachování celistvosti poikilohydrického organismu jsou na buněčné úrovni při vysychání obvykle pozorovány tři základní mechanismy: detoxikace aktivních forem kyslíku (ROS), syntéza proteinů pozdní embryogeneze (LEAs) a malých bílkovin tepelného šoku (sHsp) a také koncentrace cukrů (např. sacharózy nebo trehalózy) (Alamillo et al. 1995; Farrant 2000; Kranner et al. 2002). O tom bude podrobněji napsáno níže.

1.2. Odolnost poikilohydrických autotrofních organismů vůči vysychání

1.2.1. Odolnost mechů vůči vysychání

Mechy, stejně jako lišejníky, jsou dominantními složkami flóry polárních oblastí. V závislosti na vlhkosti antarktické mechy rychle reagují na změny v dostupnosti kapalné vody a při jejím nedostatku bezprostředně reagují vyschnutím stélky (Robinson et al. 2000; Kappen a Schroeter 2002). Ve studii Davey et al. (1997) bylo zjištěno, že voda, nikoliv teplota, je nejdůležitějším faktorem omezujícím fotosyntézu mechů v Oblasti pobřeží Antarktidy. Dřívější studie Convey (1994) tuto souvislost však nezjistila. Vyschnutí stélky mechů negativně ovlivňuje jak primární, tak sekundární procesy fotosyntézy. Při vysokém obsahu vody však buňkách antarktických mechů může být rychlost čisté fotosyntézy snížena (Robinson et al. 2000) díky fenoménu suprasaturace stélky vodou a jí způsobené snížené difúze molekul CO₂ do vnitřních oblastí stélky (Tuba et al. 1996). Míra tolerance (indikátorem je fotosyntetická aktivita) k úplnému ponoření do vody závisí na druhu mechu (Wasley et al. 2006). Podle této práce druh *Grimmia antarctici* ukázal relativně vysokou toleranci k ponoření do vody a poměrně nízkou toleranci k vysychání. *Ceratodon purpureus*, naopak vykazoval relativně vysokou toleranci k vysychání a relativně špatnou toleranci k ponoření do vody. *Bryum pseudotriquetrum* měl nevyhraněnou reakci jak na vysychání, tak i na ponoření do vody. Důležitým faktorem pro přežití antarktických mechů je vysychání stélky v kombinaci s účinky nízkých teplot. V terénních podmínkách je ovlivnění mechů nízkou teplotou neoddělitelně spojeno s vysycháním stélky.

Většina druhů mechů má vysokou odolnost vůči vysychání, některé druhy jsou však považovány za citlivé na stres suchem, například *Cratoneuron filicinum* (Krochko et al. 1978), *Dicranella palustris* (relativně citlivý na vysychání, Seel 1992b), *Physcomitrella patens* (v přirozeném prostředí – Koster et al. 2010), *Sphagnum* spp. (Jassey a Signarbieux 2019; Rastogi et

al. 2020). Ve studii Marschall et al. (2018) byly rozlišeny druhy tolerantní vůči vysychání (*Porella platyphylla*) a druhy citlivé vůči vysychání (*Sphagnum angustifolium*). Je tedy zřejmé, že odolnost mechů vůči vysychání se mezidruhově značně liší (Proctor 2000; Marschall et al. 2018). Proto se mechy dělí do dvou funkčních skupin, a to na mechy tolerující vyschnutí a mechy vykazující citlivost vůči vyschnutí. Existují však i další klasifikace. Například Wood (2007) navrhl pět kategorií mechorostů lišících se v toleranci k vysychání, a to ve vztahu k přežití mechu ve vzduchu s různou relativní vlhkostí. Zde uvádím dva extrémní případy druhy mechů (klasifikace), které mohou přežívat v rovnováze s relativně suchým vzduchem (tj. 70-80 % RH) až s extrémně suchým vzduchem (tj. 0-30 % RH). U mechů tolerujících vysychání se proces vysychání a rehydratace může opakovat několikrát, aniž by došlo k zásadním změnám ve fungování organismu (Stoklasa-Wojtasz 2012). Bylo zjištěno, že mechy snesou značné vysychání (obsah vody 5-10 % jejich suché hmotnosti), s následným navrácením do normálního fyziologického stavu při následné rehydrataci (Alpert 2000).

Tato schopnost je běžnou vlastností mechů a bylo experimentálně potvrzeno, že velké množství mechů je odolné vůči vysychání (Wood 2007). Mechy si v procesu evoluce kvůli opakovaným cyklům vysychání a následné rehydratace vyvinuly skvělé základní (konstitucionální) a indukované mechanismy odolnosti vůči vysychání pro přežití v suchých podmínkách (Li et al. 2014). Studie Bewley (1979), Bewley a Krochko (1982), Proctor (1990), Oliver et al. (1993), Tuba et al. (1996), Hu et al. (2016), zaměřené na toleranci k vysychání, hodnotily fotosyntézu v různém stupni hydratace stélky, a to v rozmezí od zcela vlhké až po suchou stélku. Tyto studie používaly měření fotosyntézy pomocí výměny CO₂ a/nebo indukované fluorescence chlorofylu (ChlF), aby zhodnotily změny fotosyntézy závislé na hydrataci.

Obecně lze říci, že mechy udržují vysokou rychlost fotosyntézy nejen v optimálně hydratovaném stavu, ale i ve stavu částečného vyschnutí. V poslední době se objevilo několik detailních studií, které se věnovaly mechanismům odolnosti fotosyntézy mechů vůči dehydrataci, například (1) tvorbě skelného přechodu v buňkách stélky u rychle vysychajících mechů, (2) aktivitě violaxanthin deepoxidázy (Fernández-Marín et al. 2011), (3) disipaci absorbované energie chloroplasty při vysychání mechu (Hamerlynck et al. 2000), (4) rychlosti ztráty mRNA při rychlém vysychání a její syntéze při rehydrataci (Oliver et al. 2000).

Pro lepší pochopení mechanismů odolnosti mechů vůči vysychání se používá komplexní přístup. Studie obvykle kombinují několik různých metod, zejména gazometrické v kombinaci se speciálními metodami fluorescence chlorofylu. Tuba et al. (1996) například zavedl měření

parametru vitality RFd (relativního poklesu fluorescence – Haitz a Lichtenthaler 1988) souběžně s měřeními výměny plynu v mechu *Tortula ruralis* ssp. vystaveného cyklům vysychání-rehydratace.

Podrobná analýza parametrů fluorescence chlorofylu během vysychání stélek mechů, zejména vyhodnocení jejich mezidruhových rozdílů, byla provedena u tří druhů (*Rhytidiadelphus loreus*, *Anomodon viticulosus* a *Grimmia pulvinata*) s různou mírou odolnosti vůči vysychání (Csintalan et al. 1999). Obdobně, Bartošková et al. (1999), Nabe et al. (2007) ukázali, že změny spektra a absorpce chlorofylu ve vysychajících stélkách *Rhizomnium punctatum* naznačují agregaci molekul chlorofylu a reabsorpci fluorescence chlorofylu.

Další oblastí výzkumu fotosyntézy mechů ve stavu ke stupni hydratace jejich stélky je studium rychlosti obnovy fotosyntetické aktivity, fotosyntetické fixace CO₂ a obnova fyziologických vlastností po rehydrataci (Proctor 2007; Stark et al. 2013). Byly studovány i změny parametrů fluorescence chlorofylu v závislosti na různém obsahu vody u vybraných mechů (Zhang 2016).

V poslední době jsou odolnost mechů vůči vysychání a základní fyziologické mechanismy studovány pomocí široké škály specializovaných metod a přístupů. Patří mezi ně například i měření (1) iontové vodivosti buněčných membrán (Šinžar-Sekulić et al. 2005), (2) akumulace sloučenin s výraznou osmotickou aktivitou, (3) aktivace ochrany proti působení ROS (Hu et al. 2016), (4) ochrana celistvosti membrány prostřednictvím restrukturalizace buněčné membrány a syntézou osmolitů po zničení membrány (Mahajan a Tuteja 2005) a, nedávno, (5) genetický přístup, orientovaný na transkryptomy během cyklu hydratace-dehydratace-rehydratace (Gao et al. 2017 pro *Bryum argenteum*).

Dehydratace ovlivňuje strukturu mechových buněk charakteristickými způsoby. V dehydratovaném stavu se plazmatická membrána u druhů *P. formosum* a *T. ruralis* silně kroučí a deformuje, ale zůstává nepoškozená (Platt et al. 1993; Pressel et al. 2006). Změny se týkají i dalších organel vysušených buněk (Pressel et al. 2006). Dehydratace vede například ke kondenzaci buněčného obsahu s fragmentací centrálního vakuolárního systému, ke zvýšené viskozitě cytoplazmy, kondenzaci chromatinu a nahloučení ribosomů (Pressel et al. 2006; Proctor et al. 2007). Uplatněním těchto mechanismů mohou buněčné struktury ztratit většinu své vody bez destrukce. Membrány si udržují základní prvky své struktury v suchém stavu a po opětovném ovlhčení se snadno a rychle zotavují a obnovují své funkce.

U mechů, stejně jako u cévnatých rostlin, při vysychání stélek a/nebo v průběhu působení extrémních teplot se makromolekuly cytoplazmy stabilizují pomocí dalších rozpuštěných látek (sacharidy, polyoly, bílkoviny), čímž se vytvoří skelná fáze. Rozpustné sacharidy včetně sacharózy, fruktany a polyoly (Oliver 1996; Marschall et al. 1998; Roser et al. 1992; Chapman et al. 1994; Melick a Seppelt 1994; Popp a Smirnov 1995; Robinson et al. 2000), mají proto velký význam v některých rodech mechů v průběhu vysychání a tvoří jeden ze základních mechanismů odolnosti proti vysychání (Marschall et al. 1998). Obsah rozpustných sacharidů obecně nevykazuje velkou variabilitu v reakci na změny prostředí (viz níže), což naznačuje, že jsou trvalými (konstitučními) látkami dostupnými jako ochranné prostředky proti vysychání. U *T. ruralis* se obsah sacharózy pohybuje kolem 10 % suché hmotnosti mechu (Bewley et al. 1978) a její množství zůstává nezměněno v přímé okamžité reakci buď na vysychání nebo na rehydrataci. Tento fakt byl potvrzen zejména u mechů odolných vůči vysychání (Smirnov 1992). Mechy (např. *T. ruralis*) mají schopnost exprimovat dehydriny, podtřídu skupiny bílkovin pozdní embryogeneze (LEA). Tyto LEA proteiny mají ochrannou funkci při vysychání (Bewley et al. 1993). Oliver et al. (2004) doložili, že bílkoviny hrají důležitou roli při ochraně buněčných složek mechů, a to jak během obnovy vodní bilance, tak během procesu vysychání.

Bylo popsáno, že tolerance k vysychání je zprostředkována kyselinou abscisovou (ABA). ABA reguluje široké spektrum odpovědí, včetně genové aktivace a represe, rovněž také inhibice fotosyntézy. Tyto regulace mohou být vyvolány řadou různých environmentálních stresových faktorů jako je například sucho, chlad, slanost a vysychání prostředí, respektive stélky (Davies 1991; Bray 1997; Leung a Giraudat 1998). Mech má potřebné enzymy pro syntézu, degradaci a modifikaci ABA v průběhu vysychání stélek (Nishiyama et al. 2003). ABA se postupně hromadí ve vysychajícím mechu, a to až v šestinásobném množství oproti základnímu. Množství ABA zůstává zvýšené dlouho po počáteční fázi dehydratace (Werner et al. 1991). Studie ukazují, že přidavek ABA u mechu *Atrichum undulatum* zvyšuje toleranci k vysychání a zvyšuje fotosyntetickou efektivitu a hodnotu základní fluorescence (F_0) a zároveň snižuje hodnotu nefotochemického zhášení (Beckett a Csintalan 2000). Zvýšené množství ABA také indukuje akumulaci rozpustných sacharidů v mechu v *P. patens* (Nagao et al. 2005). Tento typ reakce byl pozorován u *S. uncinata* (Pizzaro et al. 2019). Výsledky této studie ukázaly nejen akumulaci ABA v reakci na ztrátu vody ze stélky *S. uncinata*, ale také aktivaci ochranných reakcí. Mezi ty patří zvýšení množství prolinu a glycin betainu, zvýšení aktivity antioxidantních enzymů, jako je superoxid dismutáza (SOD),

kataláza (CAT), askorbát peroxidáza (APX) a peroxid dismutáza (POD), a akumulace dehydrinových proteinů.

Oxidační metabolismus je důležitý také pro buněčnou ochranu v průběhu vysychání. Přímá tvorba aktivních forem kyslíku (ROS) během vysychání a silná inhibice procesů fotosyntézy jsou hlavními faktory poškození buněk spojované se stresem suchem u poikilohydrických rostlin. Enzymový systém antioxidantů (jako glutathionreduktáza (GR), SOD, POD a neenzymový systém (např. askorbát, glutathion, tokoferoly, karotenoidy) chrání rostliny během vysychání. Foyer (Foyer et al. 1994) a později Smirnoff (Smirnoff 2005) ukázali, že pomalé vysychání mechu *T. ruralis* vede k přechodu glutathionu do oxidovaného stavu, nárůstu procesů disipace tepelné energie. V odpovědi mechu na pomalé vysychání stélky se uplatňuje rovněž soubor antioxidantních enzymů a oxidačních i redukčních molekul, včetně glutathionu a askorbátu, které přeměňují superoxid na vodu.

Zvláště důležitou roli v minimalizaci produkce a negativního působení ROS na chloroplasty a buněčné systémy mechu v průběhu vysychání hraje komplexní fotoprotektivní mechanismus, v němž se obvykle uplatňuje vysokým podílem nefotochemické zhášení (NPQ) fluorescence chlorofylu (Marschall a Proctor 2004). Mezi hlavní komponenty NPQ v tomto případě patří především tepelná disipace přebytečné energie, zprostředkovaná pomocí konverze pigmentů xantofylového cyklu (Deltoro et al. 1998b; Demmig-Adams a Adams 1992; Gilmore 1997; Heber et al. 2001, 2006b; Marschall a Proctor 1999).

U mechu se při ochraně fotosyntetického aparátu během dehydratace aktivuje kromě výše zmíněné tepelné disipace také několik dalších ochranných mechanismů, a to pomocí tří zhášecích "cest" (přehled viz například Yamakawa et al. 2012). Jde o specifické zhášeče absorbované excitační energie (*quenchery*), a to (1) protonace thylakoidového proteinu, (2) tepelná disipace energie vycházející ze světosběrných komplexů (Heber et al. 2006a; Heber et al. 2008; Heber 2012) a (3) třetí mechanismus, který je založený na hromadění chlorofylového radikálu v RC PSII. Aktivace těchto dílčích mechanismů vede ke zvýšení hodnot nefotochemického zhášení (qN, NPQ) ve vysychajících meších.

Disipace energie probíhá obvykle rychleji než zachytávání energie funkčními reakčními centry. Pokud však je tento mechanismus nedostatečný, pak bývá aktivován další ochranný mechanismus, který umožňuje odčerpávání nadbytečné energie z RC. Tento mechanismus je založen na zapojení účinného přenosu energie z PSII do PSI (*spillover*), a to nikoli cestou lineárního

fotosyntetického transportu elektronů (Slavov et al. 2013). Tento jev se nazývá vysycháním indukované zhášení (*desiccation-induced quenching*) a byl popsán jako vlastnost fotosystémových II reakčních center u mechu *Rhytidiadelphus squarrosus* (Heber et al. 2006a). Ve fotosyntetickém (chloroplastovém) aparátu mechů existují další součásti zapojené do ochrany RC PSII a to (1) PsbS protein, a (2) proteinový komplex LHCSR (*Light Harvesting Complex Stress-Related proteins*), které jsou vytvářeny během působení stresu a aktivně se podílejí na nefotochemickém zhášení (Alboresi et al. 2011; Gerotto et al. 2012). PsbS je spojován především s qE komponentou nefotochemického zhášení (Niyogi et al. 2005). Protein LHCSR se podílí zejména na termální disipaci, jak uvádí Stella et al. (2016) pro mech *P. patens*.

U většiny mechů, podobně jako u jiných poikilohydrických autotrofních organismů (lišejníky – Barták et al. 2021) se fluorescence chlorofylu v suchém stavu měřeného druhu výrazně snižuje, a to na hodnotu blízkou nule (Heber et al. 2006a). Několik předchozích studií (např. Heber et al. 2001; Pressel et al. 2006) ukázalo, že fluorescence chlorofylu je během dehydratace v mechorostech výrazně potlačena. V pokročilém stupni vyschnutí stélky mechů se NPQ zvyšuje na relativně vysoké hodnoty, a to jak během vysychání, tak i bezprostředně po rehydrataci (Csintalan et al. 1999; Proctor et al. 2007; Orekhova et al. 2021a). Tento mechanismus zaznamenaný v časných fázích rehydratace posiluje fotoochranu chloroplastu v citlivých obdobích hydratace. Celkově lze konstatovat, že fotosyntetický aparát u mechů je stabilní, při vysychání se nerozpadá a při rehydrataci dochází k obnově rychle a kompletně (Tuba et al. 1998).

1.2.2. Odolnost lišejníků vůči vysychání

Většina lišejníků je odolná vůči vysychání. V přírodních podmínkách se život většiny lišejníků vyznačuje rychle se měnícím obsahem vody a podle toho rychle se měnící fyziologickou aktivitou, zejména základní procesy: dýchání a fotosyntéza. Lišejníky se běžně vyskytují v bezprostřední blízkosti povrchu země (výjimku tvoří epifyzické lišejníky tropických oblastí Země) a usazují se na kamenech, skalách, dřevě, půdě, a dokonce se mohou vyskytovat endoliticky, tedy osídlují prohlubně, trhliny a mikrodutiny ve skalách, zejména na vápencích a pískovcích. Biotické vlastnosti lišejníků jim umožnily přizpůsobit se nejrozmanitějším podmínkám prostředí, včetně extrémně chladných.

Lišejníky nemají vyvinutou anatomickou stavbu pro systém vodního transportu, jako jsou kořeny rostlin, a nemají kutikulu zabraňující přímému výparu vody ze stélek. Proto se při

vysychání obsah vody ve stélce nachází v rozmezí 10-20 % jejich suché hmotnosti (Rundel 1988). Lišejníky mohou dlouhodobě přežít suchá období, a to jak při sporadickém nebo i úplném nedostatku srážek (Kappen 1988; Lange et al. 1990). Za přítomnosti srážek, kondenzace rosy nebo vysoké vlhkosti vzduchu (ale jen při nízkých teplotách, kde převládá nedostatek nízkého tlaku páry) se stávají hydratovanými. Lišejník, obsahující jako fotobiont řasy (fykobiont) může absorbovat až 200 až 300 % své suché hmotnosti při nasycení. Některé lišejníky se sinicovým symbiontem (obsahující jako fotosyntetizujícího partnera sinice) mohou absorbovat vodu až do výše 2000 % své suché hmotnosti.

Vzhledem k tomu, že lišejníky se vyskytují také v Antarktidě, kde se kapalné srážky ve formě deště vyskytují velmi sporadicky, jsou antarktické lišejníky ve velké většině případů odkázány na tavnou vodu ze sněžných polí a ledovců. Tavná voda dostupná zejména v časném letním období, tedy v době rychlého tání jednoletých akumulací sněhu nahromaděných v předchozím zimním období, nebo z povrchu či čelních oblastí pevninských ledovců. Během antarktického léta tedy lišejníky pohlcují vodu z epizodických srážek, mlhy a tání sněhu (Kappen 2000; Pannowitz et al. 2006). V kontinentální Antarktidě, kde je dostupnost kapalné vody velmi silně omezena, může lišejník absorbovat vodu ze sněhové sublimace (Colesie et al. 2016).

Výskyt lišejníků v rámci antarktického kontinentu je omezen do několika menších oblastí bez ledu (Øvstedal a Lewis-Smith 2001; Olech 2004). Důležitým faktorem je nejen dostupnost pevného substrátu, na kterém se lišejníky přichytí a rostou, ale mezi řídící faktory patří také délka aktivního období a dostupnost kapalné vody. Proto je výskyt a přežití lišejníků na určitých stanovištích spjat s teplotou, která ovlivňuje teplotní a vlhkostní charakteristiku stanoviště (Green et al. 2011b).

Různé studie (např. Schroeter a Scheidegger 1995) ukázaly, že lišejníky jsou odolné vůči nízkým teplotám a uskutečňují pozitivní fotosyntézu při teplotách blízkých 0°C. Nicméně bylo také zaznamenáno, že optimální teplota pro čistou fotosyntézu pro několik druhů antarktických lišejníků se pohybuje mezi 5 až 15°C (Green et al. 2007). Kromě toho, se očekává, že s globálním oteplováním budou tyto organismy ovlivněny zvýšením teploty (Sancho et al. 2019), která v Antarktidě citelně vzroste o zhruba +3°C. Na druhou stranu většina antarktických lišejníků žije na skalách, neboť v Antarktidě jsou skály nejvíce dostupným substrátem: proto je kolísání obsahu vody v okolí, tedy v bezprostředním prostoru skalního povrchu, ve kterém lišejníky rostou, mnohem významnějším faktorem než teplota samotná větší, protože skály nezadržují vodu. V tomto kontextu je sice jejich reakce na teplotu dobře známá a experimentálně ověřena, ale

teplotní závislost fotosyntézy byla zjišťována zejména u plně hydratovaných stélek lišejníků. Mnohem méně se ví o fotosyntetické reakci antarktických lišejníků na částečný nedostatek vody v kombinaci s teplotou stélky.

Lišejníky jsou stejně jako mechy tolerantní k vysychání. V přirozeném prostředí procházejí obrovským množstvím cyklů dehydratace / rehydratace během svého života (Green et al. 2011b). Když jsou lišejníky vystaveny cyklu vysychání z plně vlhkého do suchého stavu, ztrácejí v průběhu tohoto cyklu svou fotosyntetickou aktivitu a postupně se stávají fyziologicky i fotosynteticky neaktivními (Wood 2005).

Pro plně vysušené stélky platí, že se výměna CO₂ a fotosyntetická fixace ve fotobiontu lišejníku zastaví, a to dokud nejsou znovu hydratovány (Green et al. 2007). Vysychání lišejníků se projevuje poklesem primární fotosyntetické aktivity, ztrátou variabilní fluorescence chlorofylu a snížením jejich celkového fluorescenčního signálu. Tyto změny jsou na úrovni pigment-proteinových komplexů doprovázeny odpojením fotosystémů LHC od PSI a PSII v řasách / cyanobakteriálních fotobiontech během vysychání stélky (Bilger et al. 1989) s následné rychlou obnovou po hydrataci.

U lišejníků, stejně jako u mechů, na buněčné úrovni vysychání mění vnitrobuněčnou hodnotu pH a iontovou sílu v cytoplazmě a stimuluje tvorbu ROS s potenciálně škodlivými účinky. Vysychání má vliv také na morfologii a ultrastrukturu lišejníků (Honegger et al. 1996; Scheidegger a Axelrod 2000), mění obsah nízkomolekulárních látek, jako jsou cukry a polyoly (Coxson et al. 1992) a poškozují membránové bílkoviny, přičemž lipidy zůstávají stabilní i po delším vysychání (Kotlova a Sinyutina 2007).

Tolerance k vysychání u lišejníku je založena na několika základních mechanismech (Alpert 2005; Heber et al. 2006a), přiřazeným různým genům, i když přesná podstata mechanismu ještě není plně známa (Potts et al. 2005). Na buněčné úrovni byly navrženy různé biochemické mechanismy, které podporují schopnosti organismu přežít vysychání. Podobně jako u mechů, i u lišejníků sacharidy přispívají k "vitrifikaci", tedy vzniku skelného stavu v cytoplazmě. Navíc se zdá, že sacharidy podporují strukturu membrán, kdy voda opouští dehydratační buňku (Crowe et al. 2005). Proteiny pozdní embryogeneze exprimované v průběhu vysychání stélek (LEA), mohou přispět ke schopnosti přežít ve vysušeném stavu (Wise a Tunnacliffe 2004). Jak je popsáno výše, vysychání zvyšuje produkci ROS a je tedy zapotřebí účinných mechanismů ochrany, které zabrání jejich vzniku nebo působí jako "zhášače" (Kranter a Birtic 2005).

Během vysychání lišejníku se aktivuje také několik ochranných mechanismů, které snižují fluorescenci chlorofylu. Hlavní mechanismy byly prozkoumány v posledních několika desetiletích a identifikovány způsoby zhášení v lišejnících (Veerman et al. 2007). Mezi nimi byla popsána disipace energie z vysychajících mechů a lišejníků (Heber et al. 2006a; Heber et al. 2007; Heber 2008; Heber et al. 2018). Mechanismus zahrnuje účinná centra zhášení, která vznikají během vysychání a působí jako jednotky podporující tepelnou disipaci.

1.2.3. Spektrální odrazivost mechů a lišejníků při vysychání stélky

V experimentech zaměřených na fyziologické procesy ve stélkách vysychajících poikilohydrických antarktických autotrofů jsme použili rovněž měření spektrálních charakteristik zkoumaných mechů a lišejníků. V průběhu vysychání stélek často dochází ke změnám hodnot spektrálních reflektančních indexů (detailněji dále v textu), jejichž změna parametrů může indikovat změny ve fyziologickém stavu rostlin. V takto zaměřených experimentech jsem použila souběžné měření fotosyntetických procesů pomocí fluorescence chlorofylu a spektrálních vlastností při dehydrataci zkoumaných druhů.

Spektrální charakteristiky stélky se během vysychání mohou měnit jak u lišejníků (Barták et al. 2018a), tak i mechů (Van Gaalen et al. 2007). U mechů se však dosud jen málo fyziologických studií zabývalo změnou spektrální odrazivosti a charakteristik (indexů) odvozených ze spektrální křivky odrazivosti během vysychání. Lovelock a Robinson (2002) zkoumali u antarktických mechů parametry spektrální odrazivosti v závislosti na obsahu fotosyntetických pigmentů a obsahu vody ve stélce. Ve zmíněné studii byla zjištěna nejsilnější korelace vybraných parametrů spektrálního odrazivosti s obsahem vody ve stélce. Obdobně, Van Gaalen et al. (2007) ukázali, že fotochemický reflektanční index (PRI) koreluje jak s rychlostí čisté fotosyntézy, tak s obsahem pigmentů xanthofylového cyklu a hodnotou nefotochemického zhášení (NPQ). Harris (2008) použil souběžné měření parametrů fluorescence chlorofylu a spektrální odrazivosti při vysychání stélek mechu rodu *Sphagnum*. Vysychání vedlo k výraznému poklesu Φ_{PSII} , který mírně koreloval s PRI. Kromě toho byla zjištěna silná negativní korelace mezi změnami PRI a NPQ. Hodnoty NDVI klesaly v průběhu dehydratace stélky. Tyto údaje svědčí o tom, že NDVI a PRI jsou dobrými parametry pro indikaci krátkodobých změn ve funkčnosti fotosystému II a celkové primární fotosyntetické aktivity mechů způsobené hydratací / dehydratací. K obdobným závěrům dochází studie uskutečněná v podobném uspořádání při měření lišejníků (Barták et al. 2015). Hodnoty NDVI a

PRI se také používají v biologii lišejníků, zejména v dálkovém průzkumu polárních oblastí Země, a to v terestrických ekosystémech s dominancí mechové či lišejníkové flóry ve vegetačním krytu (Marcinkowska-Ochtyra et al. 2018), terénních studiích (například Petzold a Goward 1988; Van der Veen a Csatho 2005; Kleefeld et al. 2018). Rovněž se hodnoty PRI a NDVI využívají v laboratorních experimentech na lišejnících v průběhu dehydratace jejich stélky (např. Bechtel et al. 2002; Neta et al. 2010). V současné době, díky pokročilým technologiím dálkového průzkumu Země, pomocí satelitní či dronové techniky panuje přesvědčení, že hodnocení denní, sezónní a mezisezónní změny NDVI a PRI v lišejníkové vegetaci má velký potenciál pro ekofyziologický výzkum v polárních oblastech. Tento přístup může kombinovat terénní a satelitní data. Laboratorní data PRI a NDVI, měřené v různých fyzikálních podmínkách (zejména teplota a hydratace), mohou být navíc využita k vysvětlení proměnlivosti PRI a NDVI v přirozených ekosystémech a mohou se stát, díky specifickým spektrálním "podpisům" (*spectral signatures*, tedy křivkám spektrální odrazivosti) pomocníkem pro nepřímé stanovení dominance jednotlivých druhů lišejníků na daném stanovišti. NDVI je v současné době rovněž široce používán jako indikátor stresů, které negativně ovlivňují obsah chlorofylu v rostlinných pletivech. Bylo rovněž prokázáno, že v lišejnících se hodnoty NDVI snižují při dehydrataci stélky. Tento pokles je však druhově specifický (Neta et al. 2010). Hodnoty NDVI jsou také indikátorem negativních účinků dalších stresorů, například těžkých kovů ve stélkách lišejníků, jak prokázala např. studie Garty et al. (2000).

Fotochemický reflektanční index (PRI) je považován za indikátor časných fází stresu ve fotosyntetickém aparátu, zejména ve fotochemických procesech (Gamon et al. 1997). Koeficient odrazu ve vlnové délce 531 nm (použitý pro výpočet PRI) totiž odhaduje množství pigmentů xanthofylového cyklu, které úzce souvisí s účinností využití záření v ochranném mechanismu nefotochemického zhášení. Odrazivost ve vlnové délce 531 nm souvisí s deepoxidací violaxanthinu do zeaxanthinu přes antheraxanthin (Gamon et al. 1990). V laboratorních studiích s lišejníky se PRI v posledním desetiletí používal zejména v experimentech, které se zaměřily na numerické změny PRI při postupné dehydrataci stélky z plně ovlhčeného do suchého stavu (např. Singh et al. 2013; Barták et al. 2018a).

1.3. Odolnost poikilohydrických autotrofních organismů na vysokou úroveň ozáření

V Antarktidě jsou v bezoblačných dnech v období antarktického léta mechy vystaveny plnému slunečnímu záření. V přechodových obdobích jsou před účinky přímého záření alespoň částečně chráněny sněhem či ledem a v zimě jim, díky polární noci, záření chybí úplně (Post et al. 1990). Tato výše uvedená vysoká letní expozice fotosynteticky aktivním zářením může způsobit fenomén fotoinhibice (ve vlhkém stavu) a postupné vysušení a fyziologickou inaktivaci při úplném vyschnutí stélky. Proto je nedostatek dostupné vody způsobený vysokou ozářeností a teplotou vzduchu hlavním faktorem omezujícím produktivitu v těchto ekosystémech.

Fotoinhibice fotosyntézy probíhá, když intenzita fotosynteticky aktivního záření způsobí tak velkou absorpci, že kapacita / aktivita fotosyntetického řetězce přenosu elektronů v chloroplastovém aparátu se stává nedostatečnou. Tato situace vede k nejprve k inaktivaci a poté i k poškození fotosyntetického aparátu, zejména fotosystému II. Vysoké hodnoty fotosynteticky aktivního záření způsobují po absorpci tvorbu molekul triplexového chlorofylu ($^3\text{Ch}^*$), které reagují s kyslíkem a produkují singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) a další aktivní formy kyslíku (ROS). ROS interagují se složkami reakčních center fotosystému II (RC PSII). Interakce vede k zejména poškození proteinu D₁ a proteinů anténního systému, což vede k fotooxidační destrukci PSII a výrazné fotoinhibici.

Během evoluce si rostliny vyvinuly několik mechanismů fotoochrany před fotoinhibicí, jako je vyhýbání se negativním účinkům prostřednictvím pohybu listů a chloroplastů. Na úrovni chloroplastového aparátu jde především o cyklický přenos elektronů kolem fotosystému I (PSI) a fotorespiraci (Takahashi a Badger 2011). Další mechanismus souvisí s karotenoidy, které deaktivují ROS a podílejí se na tepelném rozptýlení absorbované radiační energie (součástí nefotochemického zhášení je NPQ). Některé mechy jsou schopny provádět zhášení excitační energie pomocí pomocných pigmentů xanthofylů a konkrétně violaxanthinu s přeměnou na zeaxanthin (Paulsen 1998).

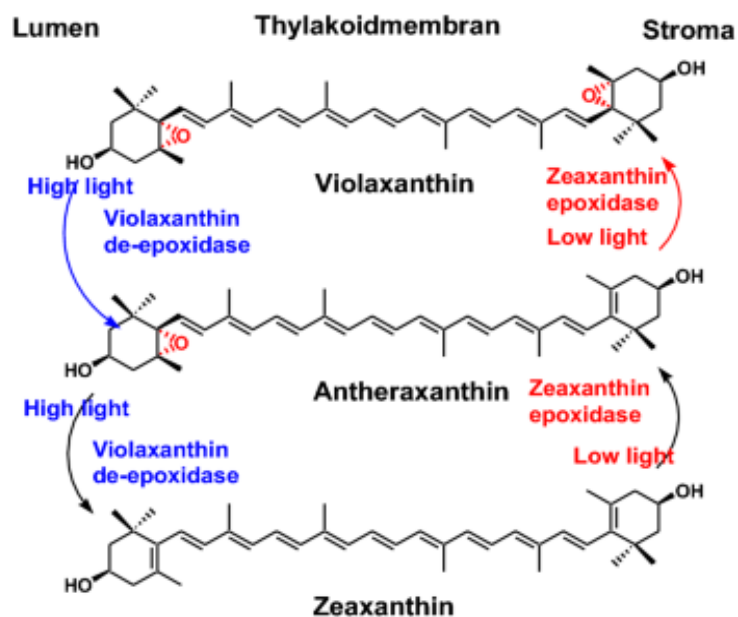
Mechy jsou odolné vůči vysychání způsobenému vysokou teplotou a účinky přímého záření, a to pomocí rozptýlení (disipace) formou tepelné energie. Tato tepelná disipace je složkou nefotochemického zhášení (NPQ). Nefotochemické zhášení je zásadním prvkem ochrany stélek mechů proti působení vodního stresu a rovněž ochranným mechanismem aktivovaným pro ochranu před negativními účinky vysokých dávek záření.

Nejbezpečnějším a nejpružnějším způsobem, jak u mechů rozptýlit nadbytečnou absorbovanou energii, která je pohlcena chlorofyly, je uvolnění tepla z fotosyntetického aparátu. Nefotochemické zhášení (NPQ) se skládá z tepelného výdeje chlorofylu ($^1\text{Ch}^*$) v excitovaných singletových stavech. NPQ představuje složitý proces, jeho biochemická, biofyzikální, fyziologická a ekologická charakteristika jsou v posledních 20 letech intenzivně studovány. Většinou se na aktivaci NPQ podílejí 3 základní složky: (1) protonový gradient (ΔpH), generovaný mezi lumen thylakoidní membrány a stranou stroma, generovaný fotosyntetickou protonovou pumpou; (2) aktivita cyklu violaxanthinu a vznik zeaxanthinu; (3) protein PsbS (García-Plazaola et al. 2012). Bukhov et al. (2001a) zjistili, že zhášení fluorescence chlorofylu (u mechu *Rhytidiadelphus squarrosus*) se zřejmě odehrává v pigmentovém anténovém systému. Přičemž přítomnost zeaxanthinu ve stélkách *R. squarrosus* značně zesílí celkové zhášení (Bukhov et al. 2001b).

U mechů zhášení NPQ bylo zkoumáno v práci Heber et al. (2006a), a to v závislosti na vysychání a fotoinhibici. Tato studie detailně popsala fyziologické mechanismy odolnosti mechu proti vysychání: (1) protonaci thylakoidového proteinu (aktivního v hydratovaných meších), dále (2) migraci excitonů směrem k světosběrným komplexům, kde dochází k rychlé tepelné disipaci, a nakonec, (3) vratné hromadění radikálu, který působí jako zhášeč excitační energie v reakčních centrech fotosystému II. Tyto mechanismy se uplatňují úplně stejným způsobem jak při fotoinhibici, tak i při vysychání (Heber et al. 2006a).

Tvorba zeaxanthinu indukovaná fotoinhibicí a následné zhášení energie prostřednictvím zeaxanthinu je dalším fotochranným mechanismem, který se podílí na NPQ u mechů (Pinnola et al. 2013). Při vysoké intenzitě fotosynteticky aktivního záření se violaxanthin deepoxiduje za vzniku zeaxanthinu (Arnoux et al. 2009), a to postupnou konverzí přes meziprodukt, atheraxanthin (obr. 2).

Vzniklé molekuly zeaxanthinu umožňují zachytit energii z molekuly chlorofylu v prvním excitovaném stavu chlorofylu. Zeaxanthin se spojuje s proteiny LHC (Morosinotto et al. 2002; Jahns et al. 2009; Betterle et al. 2010) a zvyšuje míru zhášení způsobené oxidací lumenu (Ahn et al. 2008; Bonente et al. 2008; Ballottari et al. 2010). Výše uvedené procesy se odehrávají během několika minut a tvoří rychlou vratnou složku NPQ nazývanou qE (energie zhášení). Pomalejší složka zhášení se pak aktivuje spojováním zeaxanthinu s těmi proteiny LHC, které rozvíjejí zhášení (Ma et al. 2003).



Obrázek 2. Violaxanthinový cyklus (modifikováno podle Maoka 2020).

Dalším mechanismem je fotoinhibiční zhášení qI (Horton a Hague 1988), které je někdy také definováno jako qZ, (Dall'Osto et al. 2005; Nilkens et al. 2010). Třetí kinetická složka NPQ, tzv. transitorní zhášení qT, má průběžnou kinetiku relaxace mezi kinetikou qE a qZ a souvisí se stavovými přechody mezi PSII a PSI. Relativní přínos různých komponent při uvolňování tepla závisí na růstových podmínkách (Muller et al. 2001). Společně představují klíčovou součást adaptace rostlin na změny prostředí prostřednictvím ochrany fotosyntetického aparátu.

Mechy ze slunných stanovišť se obvykle vyznačují vysokou odolností vůči fotosynteticky aktivnímu záření (Murray et al. 1993). Je to způsobeno tím, že mají zvláštní strukturu molekulárního fotosyntetického aparátu, který kombinuje vlastnosti cévnatých rostlin a zelených řas. Mechy disponují dvěma bílkovinami podílejícími se na iniciaci NPQ, tj. (1) proteinů světlosběrného komplexu "rostlinného typu" PsbS a (2) proteinů spojených se stresem světlosběrného komplexu "řasového typu" (LHCSR), jak bylo uvedeno výše.

U mechů LHCSR a PsbS mohou migrovat mezi PSII a PSI tak, aby mohly účinně zhášet excitační energii (Furukawa et al. 2019). Nedávný výzkum (například Stella 2016; Dikaios et al. 2019) potvrdil roli proteinů LHCSR v tepelné disipaci u fotoinhibovaných mechů. Další studie ovšem naznačují, že proteiny LHCSR mohou být aktivní také v energetickém zhášení (qE) (Alboresi et al. 2010; Gerotto et al. 2012).

Mechy ze slunných stanovišť jsou považovány za tolerantní nebo odolné vůči fotoinhibici. Nicméně byly identifikovány některé na fotoinhibici citlivé druhy, například, *Pleurozium schreberi* ze stinných stanovišť (Hájek et al. 2009c). Většina výzkumů zaměřených na fotoinhibici mechů se věnuje fotochranným mechanismům aktivovaným ve vysychajících meších (například Csintalan et al. 1999; Nabe et al. 2007), protože nefotochemické mechanismy zhášení se aktivují kromě počáteční fáze fotoinhibice také vysycháním.

Teplota hraje důležitou roli při fotoinhibici a poškození fotosyntetického aparátu mechů fotosynteticky aktivním zářením. Při nízkých antarktických teplotách při vysoké intenzitě záření vykazoval mech *Schistidium antarctici* snížení své fotosyntetické schopnosti a účinnosti fotosyntézy, i při dopadu poměrně malých hodnot fotosynteticky aktivního záření (Adamson et al. 1988). Na druhou stranu, Alpert (1988) ukázal, že *Grimmia lavigata* neprojevuje žádné známky poškození chlorofylu po dobu 20 měsíců ve vyschlém stavu, pokud je chráněna před potenciálním fotopoškozením.

Řada studií se věnovala citlivosti mechů na fotoinhibici v optimálním vlhkém stavu. Jsou však poměrně omezené a fragmentární (např. Giudici 2019). Zaměřili jsme se proto na časové chody parametrů fluorescence chlorofylu (ChlF) (F_V/F_M , Φ_{PSII}) během kontrolované fotoinhibice a následné zotavení vlhkého *Sanionia uncinata*, antarktického mechu rostoucího v otevřených slunných oblastech. Předpokládali jsme, že odolnost druhu vůči fotoinhibici bude vysoká. Proto jsme očekávali aktivaci fotoprotektivního mechanismu při kontrolovaném fotoinhibičním účinku a jejich rychlou relaxaci až k předfotoinhibičním hodnotám v regeneračním období (obvykle během desítek minut). Očekávali jsme také odlišnou míru odolnosti vůči fotoinhibici ve vzorcích mechu shromážděných z různých částí mořské Antarktidy (ostrov krále Jiřího – KGI, ostrov Jamese Rosse – JRI). Schopnosti fotoprotektivních mechanismů a jejich zapojení mohou být různé ve vzorcích ze dvou úseků kvůli rozdílům v sezonním množství radiace dostupné na každém úseku a místní geomorfologii, která může lišejníky chránit před přímým zářením. Ekofyziologické vlastnosti *S. uncinata* byly zkoumány v terénu a laboratorních podmínkách, získané poznatky však stále nejsou uspokojivé. Fotosyntetické procesy druhu byly zkoumány v reakci na světlo (Uchida et al. 2002), UV záření (Lud et al. 2003), vysychání (Pizarro et al. 2019) a zmrazení (Cannon et al. 2017). Pokud je nám známo, naše studie je první, ve které se provádí analýza primárních fotosyntetických procesů druhu při fotoinhibici v hydratovaném stavu.

1.4. Účinky šokového zmrazení na životaschopnost mikrořas

Mikrořasy přežívající v terestrických ekosystémech jsou dobře přizpůsobeny drsným podmínkám polárních oblastí a mohou přežít i při extrémně nízkých minusových teplotách. Tyto mikrořasy vykazují vysokou kryorezistenci (Davey 1991). Proto byly v odledněných oblastech Antarktidy zaznamenány četné jednobuněčné suchozemské řasy (viz např. Broady 2005). Obvykle mají schopnost přežít v teplotách pod bodem mrazu a dobře se vyrovnávají s opakujícími se cykly zmrazení/ rozmrazování. Tato schopnost a její základní mechanismy odpovědné za vysokou míru kryorezistence byly zkoumány u polárních suchozemských řas (například Elster et al. 2008; Orekhova et al. 2018b). Rovněž se touto otázkou zabývaly studie zaměřené na lišejníky, které obsahují jako symbiont řasy (např. Haranczyk et al. 2017). V posledních několika desetiletích bylo zkoumáno několik aspektů kryorezistence řas. Důraz byl kladen na mechanismy jejich přežití v různých mrazových podmínkách (Hájek et al. 2012), včetně situací vznikajících bezprostředně po šokovém zmrazení (Orekhova et al. 2018b; Orekhova et al. 2019).

Kromě své odolnosti vůči mrazu suchozemské mikrořasy jsou velmi důležitými složkami antarktického přírodního prostředí, protože slouží jako dodavatelé živin v rostlinných ekosystémech (Bisson a Kirst 1995; Cardinale et al. 2011). Disponují také řadou adaptačních a aklimatizačních mechanismů, které jim umožňují vyrovnávat se s drsnými podmínkami životního prostředí a hrát důležitou roli v biogeochemickém cyklu suchozemských ekosystémů polárních regionů (Lyon a Mock 2014). Nízkoteplotní změny buněčného metabolismu suchozemských řas z polárních regionů jsou hlavními mechanismy adaptace na nízké teploty a teploty pod bodem mrazu (Feller 2007). Patří k nim například zvýšená syntéza sacharidů a polyolů (Solhaug et al. 2018; Arnold et al. 2003), tvorba *antifreeze* proteinů (Li et al. 2009), proteinů vázajících ledové krystaly (*ice-binding proteins*, Raymond et al. 2009), změna obsahu lipidů (Cid-Aguero et al. 2018) a strategie prevence vnitrobuněčné tvorby ledu (Lyon a Mock 2014). V poslední době je kladen velký důraz na molekulární mechanismy, které umožňují mikrořasám přizpůsobit se nízkým teplotám a teplotám pod bodem mrazu za pomoci osmotického přizpůsobení se (přehled viz Lyon a Mock 2014).

Pro psychrofilu včetně polárních řas je důležitá aktivita chladových enzymů (Siddiqui a Cavicchioli 2006), které umožňují udržet částečnou funkčnost buněčných membrán i při velmi nízkých teplotách pod bodem mrazu (Thomas a Dieckmann 2002). Této schopnosti je dosaženo začleněním nenasycených mastných kyselin (Morgan-Kiss et al. 2006; Lyon a Mock 2014). Tento proces je spojen se změnou složení membránových lipidů a je způsoben aktivací intracelulárních

fosfolipáz (Morris et al. 1981). V reakci na nízké teploty a teploty pod bodem mrazu suchozemské řasy syntetizují různé osmolity (Fuller 2004), jako jsou aminokyseliny (prolin), sacharidy, polyoly a další osmoticky aktivní látky. Role polyolů v kryorezistenci a metabolické odpovědi na různé stresory je prokázána pro mnoho autotrofních organismů, včetně řas (Tonon et al. 2017), cyanobakterií (Reed et al. 1986), lišejníků (Hájek et al. 2009b) a cévnatých rostlin (Stoop et al. 1996). V reakci na nízké teploty a teploty pod bodem mrazu v nich stoupá obsah polyolů (cukernatých alkoholů): mannitu, arabitu a ribitolu. Ribitol je jednou ze základních kryoprotektivních látek vyskytujících se v lišejnících, která je však syntetizována symbiotickými řasami. Přirozený obsah ribitolu v různých typech řas izolovaných z lišejníků byl prozkoumán relativně komplexně (Richardson a Smith 1968; Cooper a Carroll 1978; Solhaug et al. 2018; Armstrong a Smith 1994; Dahlman et al. 2003). Kromě toho byl zkoumán vliv přidání ribitolu na primární fotosyntetické procesy v lišejnících, obsahujících řasy jako fotobiont (Hájek et al. 2009a; Hájek et al. 2009b). Tyto dvě studie uvádějí pozitivní vliv přídavku ribitolu na parametry fluorescence chlorofylu měřené v lišejnících při nízkých teplotách nebo teplotách pod bodem mrazu.

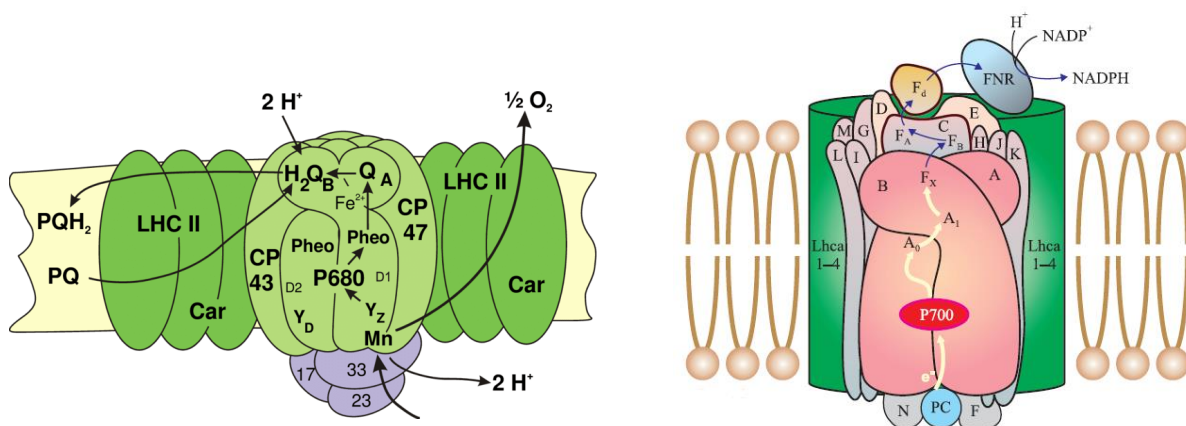
Řasy z polárních oblastí projevují vysokou kryorezistenci, tedy schopnost přežít a dobře se vyrovnávat s opakujícími se cykly zmrazení/rozmrazení. Tato schopnost se zkoumala u polárních suchozemských řas (Elster et al. 2008) a u lišejníků, obsahujících jako fotobiont řasy (Haranczyk et al. 2017) v posledních několika desetiletích, přičemž hlavní pozornost byla věnována jejich přežití v různých podmínkách zmrazení (rychlost ochlazování, opětovné zmrazení – podrobnosti viz níže). V neposlední řadě byly prozkoumány praktické aspekty kryokonzervování polárních řas (přehled v práci Day 2007) s cílem zachovat biodiverzitu mikrořas tím, že je uchováváme ve sbírce kultur (např. UMACC – University of Malaya Algae Culture Collection, CCALA – Třeboň, Česko, SAG – Göttingen, Německo (Friedl a Lorenz 2012)).

Byl studován i vliv supernízké teploty na různé lišejníky, obsahující jako fotobiont řasy (Kappen 1973; Šabacká a Elster 2006). V experimentech byly využity různé přístupy: (1) chlazení vzorků na minusové teploty při nízké (Solhaug et al. 2018), $5\text{ }^{\circ}\text{C h}^{-1}$) a vysoké rychlosti ochlazování (Hájek et al. 2016, $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$), (2) rychlého "šokového" zmrazení na $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ a (3) kombinace těchto dvou přístupů (Stoop et al. 1996). Metoda rychlého zmrazení v kapalném dusíku s následným pěstováním a hodnocením druhové životaschopnosti byla použita v jednobuněčné řase *Trebouxia* sp. (Hájek et al. 2012). V průběhu studie byly zjištěny druhové specifické rozdíly v ukazatelích životaschopnosti buněk a fotosyntézy.

1.5. Moderní biofyzikální metody ve studiu fotosyntézy poikilohydrických organismů

1.5.1. Fluorescence chlorofylu (KK plus QA)

Měření fluorescence chlorofylu se používá k určení účinnosti fotosyntetického aparátu a posouzení fyziologického stavu všech fotosyntetizujících organismů (vyšší rostliny, řasy, lišejníky a fotosyntetizující bakterie) (přehledně viz například Roháček a Barták 1999; Lazár 2003; Strasser et al. 2004; Papageorgiou a Govindjee 2004). Jde o neinvazivní a rychlou metodu (v závislosti na cíli experimentu měření trvá od několika sekund do několika minut). Analýza fluorescenční křivky chlorofylu umožňuje kvantifikovat fotochemické reakce ve světelné fázi fotosyntézy a účinnost biochemických reakcí během temnotní fáze.



Obrázek 3. Struktura PSII.

LHCII – světloběrný komplex, CP43, CP47 chlorofyl-proteinové komplexy, které jsou centrální anténou PS 2; Pheo – feofytin; 17, 23 a 33: polypeptidy kyslíkového komplexu; P₆₈₀ – reakční centrum PS II; D₁ a D₂ jsou polypeptidy spojující chlorofyl P₆₈₀ a feofytin; Q_A – plastocyanin; H₂Q_B – redukovaný plastochinon spojený s Q_B stránkou; Y_D, Y_Z – funkční skupiny tyrosinových zbytků na D₂- a D₁-bílkovinách (modifikováno dle Steffen 2003).

Struktura PSI.

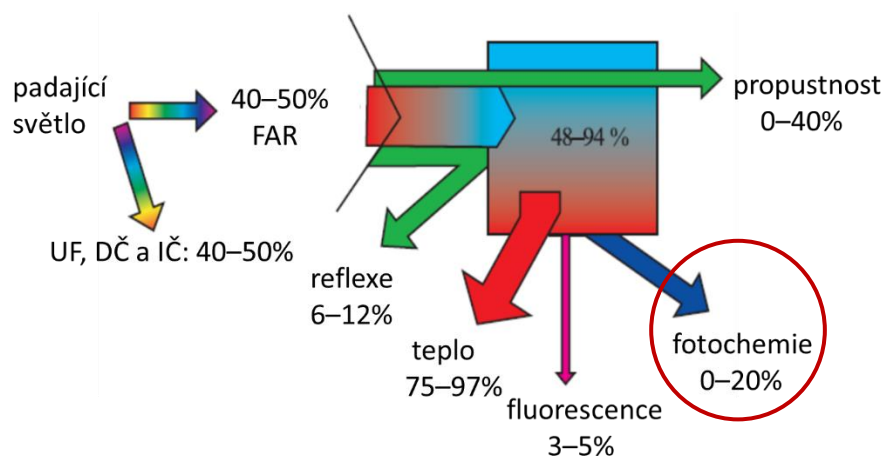
LHCI – světloběrný komplex (zobrazený zeleně) obsahující polypeptidy Lhca 1-4, polypeptidy A, B, ... N; P₇₀₀ – reakční centrum PSII; A₀ je molekula monomerního chlorofylu. A₁ je fylochinon (vitamin K₁); železo-sírová centra F_x, F_a a F_b; PC je plastocyanin. F_d – ferredoxin; FNR – ferredoxin-NADP⁺-oxidoreduktáza (modifikováno dle <http://www.absoluteastronomy.com/topics/Photosystem>).

Metoda fluorescence chlorofylu je velmi citlivou metodou, která umožňuje posoudit změny celkového bioenergetického stavu rostliny (Kalaji et al. 2014). To platí přímo či nepřímo pro všechny světelné fáze procesu fotosyntézy: fotolýzu vody, přenos elektronů, generování gradientu pH na membránách thylakoidů a syntézu ATP.

Primárním procesem transformace energie při fotosyntéze je absorpce kvanta záření molekulami fotosyntetických pigmentů. V absorpci záření se u cévnatých rostlin a řas podílejí tři skupiny pigmentů: karotenoidy, chlorofyl *a* a chlorofyl *b*; všechny jsou spojeny s bílkovinnými komplexy. Po absorpci světla molekulami pigmentů se excitační energie přenáší přes pigmentovou anténu do aktivních reakčních center. Nicméně, ne všechna tato energie se používá v reakcích fotochemické transformace v reakčních centrech PSII a PSI (viz obr. 3), část přenášené energie v anténních systémech nedosahuje reakčního centra, rozptýlí se do tepelné disipace nebo je vyzářena v červené oblasti spektra, tzn. fluoreskuje (Govindjee 1987).

Fluorescence chlorofylu vyšších rostlin a řas je tvořena zejména chlorofylem *a*, který se nachází převážně v anténních systémech PSII (Krause a Weis 1991). Energie excitovaného stavu molekul chlorofylu *b* se s vysokou účinností (100 %) přenáší na molekuly chlorofylu *a*. Další pomocné pigmenty s výjimkou fykobiliproteinů nefluoreskují (Glazer 1984).

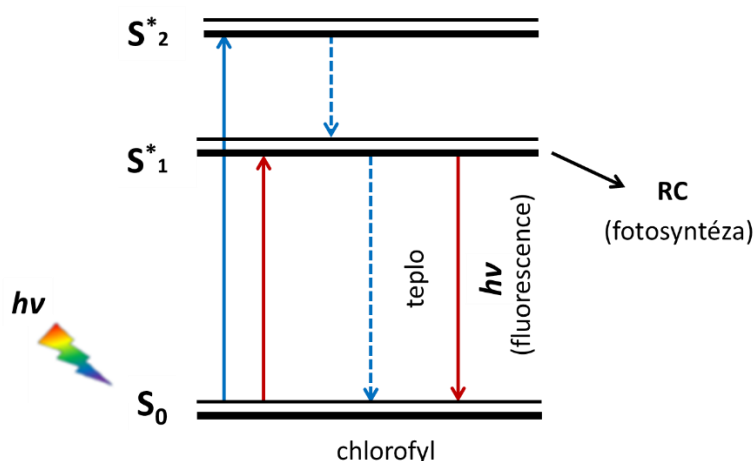
Účinnost a zaměření migrace energie podle fotosyntetických pigmentů do značné míry závisí na lokalizaci molekul pigmentu v rámci pigment-proteinového komplexu (PPK) a na vzájemné poloze různých PPK ve fotosyntetické membráně (Rubin 2013). Tyto podmínky určují přenos energie mezi molekulami pigmentů. Přenos energie mezi molekulami chlorofylu *a* je popsán rezonančním mechanismem, podle něhož je absorbovaná energie předávána uvnitř anténním komplexu a přenáší se k reakčním centrům PSII a PSI (Govindjee 1987). Excitační energie se přenáší na molekuly chlorofylu v reakčních komplexech, kde se využívá v primárních reakcích fotochemické přeměny energie (obr. 4).



Obrázek 4. Cesty spotřeby světelné energie získané listy (modifikováno dle Vidaver et al. 1991). FAR – fotosynteticky aktivní záření, UV – ultrafialové záření, DČ – dálkové červené záření, blízké infračervené oblasti, IČ – infračervené záření.

Absorbováním kvanta způsobí změnu molekuly chlorofylu ze základního energetického (neexcitovaného) stavu do excitovaného, tj. přechází na vyšší energetickou úroveň (obr. 5). Pro molekuly chlorofylu existují dva energetické excitované stavy: vyšší S^*_2 (při pohlcování kvant modrého světla) a nižší S^*_1 (při pohlcování kvant červeného světla) – Matorin a Rubin (2012). Deexcitací a nižší S^*_1 stavu vzniká fluorescence chlorofylu.

Míra fluorescence chlorofylu je do značné míry závislá na oxidačně-redukčním stavu chinonu A (Q_A), přítomnosti či absenci fotopoškození proteinů a míře deepoxidace pigmentů xanthofylového cyklu, které jsou součástí PSII (Korneev 2002). V optimálních podmínkách, při otevřených reakčních centrech PSII, kdy je molekula Q_A oxidována, se energie pohlcených kvant záření používá z velké většiny ve fotosyntéze, přičemž pouze malá část energie excitace ($\sim 0.3\%$) se ztrácí formou fluorescence chlorofylu. Emise fluorescence ze světlosběrných komplexů LHC je při otevřených reakčních centrech minimální (F_0).



Obrázek 5. Jablonského diagram: elektronové přechody molekuly chlorofylu a při absorbování kvanta záření.

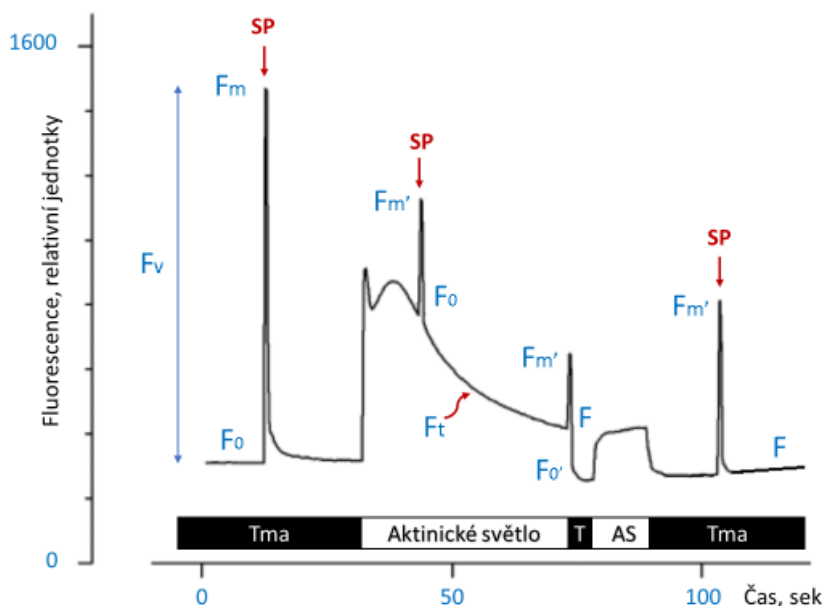
Při uzavřených reakčních centrech PSII se energie nepoužívá ve fotosyntéze a kvantový výtěžek fluorescence je podstatně vyšší (F_M) než u PSII s Q_A v oxidovaném stavu. Při uzavřených reakčních centrech PSII jsou molekuly Q_A v plně redukovaném stavu. Rozdíl mezi intenzitou fluorescence chlorofylu při plně uzavřených (F_M) a otevřených (F_0) reakčních centrech se nazývá variabilní fluorescence chlorofylu (F_V), která odpovídá té části absorbované světelné energie, která se používá otevřenými reakčními centry ve fotochemických reakcích (Krause a Weis 1991). Poměr F_V/F_M , je kvantovým výtěžkem využití energie záření otevřenými reakčními centry a odráží potenciální efektivitu fungování PSII.

1.5.2. Měření pomalé Kautského kinetiky

Registrace fluorescence chlorofylu začíná měřením hladiny fluorescence F_0 , při níž je Q_A v oxidovaném stavu, a to pomocí slabého pulsu modulovaného světla (ML), pak se zapne saturační puls (SP), který obnoví Q_A a převede RC do "uzavřeného" stavu (obr. 6). V tomto okamžiku se měří maximální hodnota F_M nezbytná pro výpočet F_V/F_M (viz výše). Poté fluorescence chlorofylu při vypnutí světla relaxuje na výchozí úroveň. Po snížení hladiny fluorescence na původní temnotní hodnotu F_0 se zapne stálé aktinické světlo (AL), které indukuje nárůst fluorescence chlorofylu F_0 v polyfázickém ději až do konstantní hodnoty F_t (zpravidla 5 minut).

Během tohoto období jsou aplikovány saturační pulsy a fluorescence chlorofylu se zvyšuje na hodnotu F_M' , která je obvykle pod úrovní F_M kvůli vývoji nefotochemického zhášení na stálém světle. Rozdíl mezi ($F_M' - F_M$) a nefotochemickým zhášením ($F_M' - F_t$) je rozdíl mezi hodnotami F_M' a F_t , který je charakteristický fotochemickým zhášením.

Maximální hodnoty měřených úrovní fluorescence chlorofylu po saturačních pulsech se používají ke kvantifikaci fotochemického a nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu.



Obrázek 6. Registrace fluorescence metodou modulací snímacího světla. F_0 – základní fluorescence, F_M – maximální fluorescence, F_V – variabilní fluorescence, F_t – rovnovážná fluorescence, F_M' – maximální fluorescence na světle, SP – saturační puls, AS – aktinické světlo/záření, FR – vzdálené červené záření, T – tma (upraveno dle <http://www.walz.com/>).

Hodnota F_v/F_m je úměrná podílu aktivních RC PSII ve tmě. Maximální kvantový výtěžek primární fotochemické reakce v PSII na světlo (Genty et al. 1989) ukazuje poměr kvant používaných ve fotochemických reakcích k celkovému počtu absorbovaných kvant záření.

Fotochemické zhášení fluorescence chlorofylu na světle reprezentuje tu část energie, která je absorbována otevřenými RC v poměru k celkovému množství absorbované energie PSII (Schreiber et al. 1986; Van Kooten a Snel 1990). Velikost q_P je závislá na míře redukce akceptorů elektronů. Parametr q_P odráží podíl otevřených RC pro přenos na elektronové přenašeče lineárního transportu.

Nefotochemické zhášení na světle q_N (Schreiber et al. 1986; Van Kooten a Snel 1990) může nabývat hodnot v rozmezí 0 až 1. Hodnoty q_N blíží se 1 znamenají, že většina RC PSII je uzavřena a Q_A je v redukovaném stavu, hodnoty q_N výrazně nižší než 1 ukazují, že Q_A je oxidován a RC jsou otevřené. Nefotochemické zhášení NPQ odráží proporcionální poměr mezi nefotochemickým zhášením a koncentrací zhášecích center v anténě (např. přítomnost zeaxanthinu). Oba parametry NPQ a q_N jsou spojovány s nefotochemickým zhášením, které je způsobeno tvorbou ΔpH gradientu mezi vnitřní a vnější stranou thylakoidní membrány chloroplastu. Souvisí též s nárůstem tepelné disipace energie a aktivací konverze violaxanthinu na zeaxanthin.

Dalším významným parametrem fluorescence chlorofylu odvozeným z kinetiky (viz obr. 6) je efektivní kvantový výtěžek primárních procesů v PSII (Φ_{PSII}). Tato charakteristika se pak dále využívá pro výpočet rychlosti lineárního elektrového toku (ETR). Lze ji vypočítat vynásobením počtu fotonů absorbovaných PSII parametrem maximálního kvantového výtěžku Φ_{PSII} :

$$ETR = \Phi_{PSII} \times PAR \times P_{PSII}/P_{PPS} \times ETR_{Factor}$$

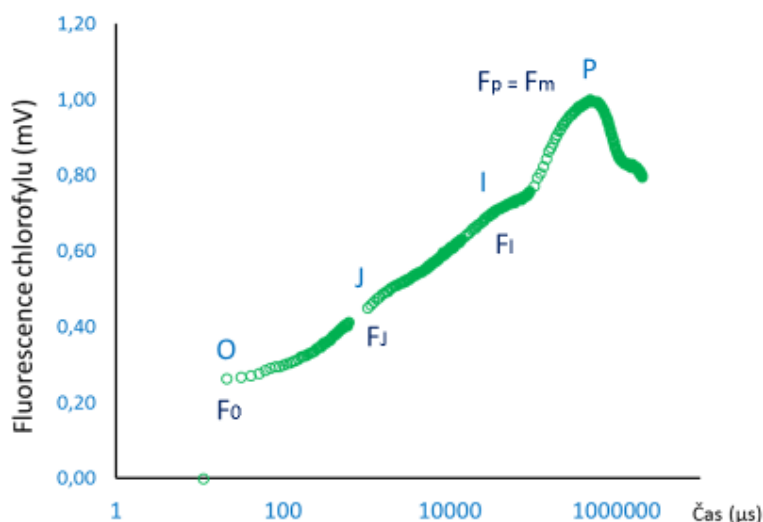
kde PAR – intenzita světla ($\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ETR_{Factor} – poměr fotonů absorbovaných fotosyntetickými pigmenty k dopadajícím fotonům. U zelených rostlin je ETR_{Factor} 0,84 ve viditelném rozsahu (400-700 nm). Pro P_{PS2}/P_{PPS} je zvolena hodnota rovná 0.5, která předpokládá existenci lineárního transportu elektronů a stejné rychlosti přenosu do PSII a PSI.

1.5.3. Metoda OJIP

V poslední době se s rozvojem technické základny a technologie LED objevila možnost registrace rychlých indukčních křivek fluorescence chlorofylu v mikrosekundovém a

milisekundovém časovém rozmezí. Rychlá indukční křivka fluorescence chlorofylu se měří na předzatemněném materiálu po ozáření po dobu stovek milisekund a zahrnuje přechody O-J-I-P spojené se změnami oxidačního stavu elektronových přenašečů (obr. 7).

Při zapnutí světla dochází ke zvýšení fluorescence na počáteční úroveň F_0 , která odpovídá "otevřenému" stavu RC a úrovni O (20 nebo 50 μs) na indukční křivce. V tomto stavu všechny Q_A molekuly mohou přijmout elektron od R_{680} . Při ozáření se molekuly Q_A postupně redukují, což vede ke zvýšení fluorescence na úroveň P, tj. maximální fluorescence F_M , když jsou všechny aktivní RC "uzavřená". Mezi úrovněmi O a P jsou dobře rozlišitelné hladiny (synonyma: úrovně, vlny, kroky), které odrážejí změny v celkové redukcí Q_A molekul, které závisí na kinetice oxidačně-redukčních reakcí mezi různými složkami ETR (Stirbet et al. 2014).



Obrázek 7. Typický vzhled indukční křivky O-J-I-P. F_0 – minimální nebo základní úroveň fluorescence. F_p – maximální úroveň fluorescence. Mech *Bryum pseudotquetrum*, vysychání ve tmě, 100 % RWC (data nepublikovaná).

Během fáze O-J dochází k redukcí akceptorové strany PSII, tzn. dochází k postupné redukcí Q_A . Relativní amplituda a počáteční sklon této fáze závisí na počtu absorbovaných fotonů zkoumaným objektem. Na této úrovni se RC PSII většinou nacházejí ve stavech $Q_A Q_B$, $Q_A^- Q_B$ a $Q_A^- Q_B^-$. Krátkodobé snížení intenzity fluorescence po J odráží reoxidaci Q_A^- a akumulaci P_{680}^+ . Na O-J fázi působí faktor heterogenity PSII spojený se schopností redukovat Q_B a také s umístěním PSII v membráně. PSII obsahuje jak Q_B , tak Q_B neredukující centra.

Další růst fluorescence chlorofylu během fáze J-I-P je spojován s redukcí plastochinonů (6-12 molekul plastochinonu na molekulu PSII) díky přenesení elektronů od PSII (Stirbet et al. 2014). Během této fáze dochází ke hromadění Q_A . Na úrovni I se PSII nachází ve stavech $Q_A^- Q_B$ a $Q_A^- Q_B^{2-}$

a zároveň zůstává malý podíl otevřených RC, které se postupně redukují během fáze I-P. Ve fázi I-P dochází k postupnému úbytku následných akceptorů PSI a úplné redukci plastochinonové zásoby. Předpokládá se, že během fáze J-I dochází k rychlé redukci zásoby chinonů umístěných v granálních thylakoidech a během I-P fáze se pomalu obnoví zásoba chinonů umístěná ve stromatu thylakoidu (Joliot et al. 1992). V bodě P dosahuje fluorescence svého maxima, RC PSII jsou v uzavřeném stavu.

Na indukční křivce se také mohou vyskytovat další vlny mezi body O a J, rozlišitelné až po matematickém zpracování křivek. Děje se tak v oblasti 200 až 300 μs , kde dochází k nárůstu fluorescence chlorofylu známé jako vlna K. Ta je indukována při působení různých stresových podmínek (například vysoká teplota, vysoká intenzita záření, nedostatek dusíku). Za těchto podmínek se inhibuje proces štěpení vody a blokuje se přenos elektronu mezi kyslík-vyvíjejícím komplexem (EOC) a tyrosinem (TyrZ) (Strasser et al. 2004).

Při inaktivaci OEC se fluorescence chlorofylu zvyšuje, podobně jako za normálních podmínek: Q_A získává elektron po separaci náboje mezi P_{680} a Feo a P_{680}^+ se redukuje od TyrZ. Při inaktivování OEC však nemůže být P_{680}^+ redukován pomocí OEC podruhé a $TyrZ^+$ zůstává oxidován. Ke zhášení fluorescence dochází na úkor P_{680}^+ a také v důsledku rychlé rekombinace Q_A^- a P_{680}^+ , která vede ke vzniku vlny K (Stirbet et al. 2014).

Růst fluorescence mezi úrovněmi fluorescence O a K může po matematickém zpracování záznamu fluorescence chlorofylu ukázat i další vlnu (vlna L). Ta odráží míru energetické interakce mezi světlosběrnými komplexy LHC a RC PSII. Za fyziologických podmínek zkoumaný fotosyntetizující objekt představuje téměř vždy směs otevřených a uzavřených RC. Účinnost fotosyntetických reakcí za takových podmínek závisí na možnosti přenosu excitonu od anténních komplexů k otevřeným RC. Proto lze vlnu L interpretovat jako změny v konektivitě mezi LHC a RC. Počet interakcí mezi jednotkami PSII na úrovni anténních komplexů lze vyjádřit také pomocí koeficientu p2G, který je podrobně popsán v pracích (Strasser et al. 2004; Stirbet et al. 2014; Goltsev et al. 2014).

Z křivky OJIP lze vypočítat řadu parametrů fluorescence chlorofylu pomocí, tzv. JIP testu (Strasser et al. 2004). Ten je založený na teorii energetických toků v membránách, která odráží rovnováhu mezi toky energie a poskytuje informace o pravděpodobném osudu absorbované energie (Strasser 1981).

Popis biofyzikálních parametrů pro analýzu OJIP křivek a podrobný výpočet všech použitých parametrů fluorescence je v práci prezentován v Tabulce 3 (příloha 1).

Pro interpretaci parametrů odvozených z OJIP křivky je však třeba poznamenat, že procesy, na nichž kinetika závisí, se týkají pouze světelné fáze fotosyntézy, tedy primárních fotochemických procesů v PSII. Získané hodnoty parametrů tedy neodrážejí efektivitu procesu fotosyntézy jako celku (neberou v úvahu sekundární, biochemické procesy fotosyntézy). Výsledky získané pomocí OJIP křivky by proto měly být analyzovány společně s dalšími údaji o sekundárních procesech fotosyntézy, jako jsou např. měření rychlosti uvolňování kyslíku nebo rychlosti asimilace oxidu uhličitého (Krause a Weis 1991; Reigosa 1997).

Různé fyziologické procesy v rostlinách a anatomické struktury, na kterých tyto procesy probíhají, mají odlišnou míru citlivosti na stres. Fotosyntetický aparát, zejména struktura PSII, je považován za mimořádně citlivý na různé stresové faktory. Pomocí metod měření fluorescence chlorofylu *a* je možné registrovat časné změny v reakcích vznikajících ve fotosyntetickém aparátu pod vlivem stresu, a to dříve, než začnou být zřejmé jiné příznaky. Změny fluorescence chlorofylu (absolutního signálu) však ne vždy dokonale odrážejí změny ve vnějším prostředí. Například v případě zvýšené excitace PSII se mohou světlosběrné komplexy fosforylovat a odpojit od PSII a přesunout k PSI (tzv. stavové přechody, angl. *transition change* (Allen a Forsberg 2001). Takový přechod vede ke snížení intenzity fluorescence chlorofylu, ale nesnižuje kvantový výtěžek (Govindjee 2002). V opačném případě, kdy jsou rostliny vystaveny působení světla pohlceného hlavně PSI, je přechod uskutečněn ze stavu II do stavu I a zvyšuje intenzitu fluorescence, nikoliv její kvantový výtěžek (Govindjee 2002).

V posledních desetiletích se metody fluorescence chlorofylu využívají při studiu fotosyntézy mechů a lišejníků velmi často, a to v několika aspektech fyziologie těchto organismů: (1) aktivace fotosyntetické aktivity u mechů a lišejníků po opakovanému zvlhčení (Schlensog a Schroeter 2001; Lange et al. 2001; Zhang et al. 2011; Coste et al. 2016; Wu et al. 2017), (2) aktivace fotoochranných mechanismů při rehydrataci (Beckett et al. 2005; Heber et al. 2007), (3) účinky různých chemických stresorů, jako jsou různé koncentrace bisulfidu iontového (Baxter et al. 1991; Chen et al. 2019), (4) dopad zmrazení (Rütten a Santarius 1992; Deltoro et al. 1999; Hájek et al. 2021), (5) vliv fotoinhibice (Murray et al. 1993; Balarinová et al. 2014).

Od devadesátých let se fluorescence chlorofylu hojně používá při studiu poikilohydrických autotrofních organismů, především pro analýzu jejich tolerance k vysychání (Seel et al. 1992a; Deltoro et al. 1998a,b; Proctor a Smirnoff 2000; Robinson et al. 2000; Proctor et al. 2007; Hájek a Beckett 2008; Lüttge et al. 2008; Cruz de Carvalho et al. 2011; Stark et al. 2013; Greenwood et al. 2019; Huwe et al. 2019; Pizarro et al. 2019). Nedávno byla fluorescenční analýza chlorofylu použita ke zkoumání reakcí fotosyntézy na proměnlivost záření v interakci s vlhkostí (Cui et al. 2009; Hájek et al. 2009c), dále ke studiu účinnosti fotosyntetických světelných reakcí a k získání informací o fyziologickém stavu rostliny a rychlosti růstu (Laine et al. 2011), studiu tolerance vůči stresu zasolením (Garbary et al. 2008; Bates et al. 2009) a vůči vlivu těžkých kovů (Tuba et al. 2010; Chen et al. 2019; Bellini et al. 2020). V neposlední řadě byla analýza parametrů fluorescence chlorofylu využita při detekci stresu nízkou teplotou (např. Campbell a Rydin 2019) a zjištění termotolerance (např. Carrell et al. 2020).

2. MATERIÁL A METODY

V této části textu doktorské disertační práce uvádím stručný přehled metod, které jsem použila ve své experimentální práci se vztahem k tématu doktorské disertační práce.

2.1. Popis místa sběru vzorků

Vzorky mechů, lišejníků a řas/sinic byly sebrány kolegy z laboratoře fotosyntézy (PřF Masarykové univerzity) na ostrově Jamese Rosse a ostrově krále Jiřího (Antarktida). Jednalo se o mechy *Brahythecium austro-glareosum*, *Bryum pseudotriquetrum* a *Sanionia uncinata*; lišejníky *Xanthoria elegans*, *Leptogium puberulum*, *Physconia muscigena*, *Rhizoplaca melanophthalma*, *Parmelia saxatilis*, *Placopsis antarctica*, *Himantormia lugubris*, *Ramalina terebrata*, *Lecania brimonti*, kolonie sinic (*Nostoc commune*), řasy *Heterococcus* sp. (kmen 820, sbírka CCALA), *Stigeoclonium* sp. (sbírka EEL, ostrov Jamese Rosse) a *Diplosphaera chodatii*, sbírka CCALA, Třeboň, Česká republika).

Ostrov Jamese Rosse je součástí přechodné oblasti mezi mořským a kontinentálním regionem Antarktidy. Klima na ostrově Jamese Rosse, stejně jako na celém kontinentu, je drsné, s velkými změnami teplot vzduchu a sezónními výkyvy v dostupnosti vody a slunečního záření. Tyto faktory činí život polárních autotrofů v této oblasti obtížným (Robinson et al. 2003). V letním období (prosinec až únor) je průměrná teplota vzduchu kolem 0 °C a obvykle se pohybuje od -10 °C do +10 °C. Rostliny rostoucí v odledněných oblastech se snaží vypořádat s působením mrazových teplot, ztrátou vlhkosti kvůli silným větrům a malému množství nebo úplnému nedostatku dostupné vody v zimních měsících (Kappen 1993; Kennedy 1993). Zima na ostrovech v okolí Antarktického poloostrova trvá sedm měsíců, v tomto období se průměrné teplotní hodnoty pohybují kolem -22 až -25 °C. Silný a prudký vítr v zimě způsobuje pokles teploty až na hodnoty -55° – -60 °C. Průměrná roční teplota vzduchu je -7.0 °C (Ambrožová a Laska 2016). Množství srážek, které na Jamese Rosse spadnou ve formě sněhu, nepřesahuje 300-500 milimetrů ročně (van Lipzig et al. 2004). V létě mají přitom rostliny nepřetržité sluneční záření a v zimě 24 hodin tmu. V posledních desetiletích navíc antropogenní vyčerpání ozonové vrstvy vedlo k významnému nárůstu UV záření. Na ostrově Jamese Rosse převažují mechy a lišejníky (Bohuslavová et al. 2018), v oblastech, kde je dlouhodobě dostupná voda – sinice (Komárek et al. 2008; Elster et al. 2016) a řasy (Nedbalová et al. 2017).

Ostrov krále Jiřího (KGI), který se nachází na severním Antarktickém poloostrově, se vyznačuje větší rozmanitostí podmínek než ostrov Jamese Rosse. Řídícím faktorem, který ovlivňuje biodiverzitu druhů tvořících vegetaci polární tundry, je roční teplota (Green et al. 2011a). Vegetace tundry je tvořena rozsáhlými, dobře vyvinutými lišejníkovými a mechovými společenstvy. Celkem je na ostrově krále Jiřího zaznamenáno 61 druhů mechů (Ochyra et al. 2008) a asi 109 druhů lišejníků (Andreyev 1989), které jsou rozšířeny na volných leduprostých částech terénu. Je to jedno z míst v Antarktidě klasifikované z hlediska klimatických podmínek jako tundra (Peel et al. 2007). Výkyvy teplot jsou zde relativně malé: v nejchladnějším měsíci červenci činí průměrně $-6.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a v nejteplejším $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (údaje *Arctic and Antarctic Research Institute*, Rusko). Počasí bývá často oblačné během celého roku s hojnými srážkami v podobě sněhu, deště a mrazu. Průměrně spadne 729 mm srážek ročně podle zdrojů *Arctic and Antarctic Research Institute*, stanice Bellingshausen (2016). Kolísání teplot je malé: v nejchladnějším měsíci červenci je v průměrná teplota $-6.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a v nejteplejším měsíci $-1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (údaje *Arctic and Antarctic Research Institute*). Počasí je v průběhu roku často nestabilní s výskyty extrémních epizod. Často bývá obloha zatažena nízkou oblačností se srážkami ve formě sněhu, deště. Rovněž můžeme počítat působení mrazu, které se často vyskytuje i v letním období. V průměru zde spadne 729 mm srážek ročně podle údajů *Arctic and Antarctic Research Institute*, stanice Bellingshausen (2016).

2.2. Experimentální druhy, charakteristika použitých metod

Zde uvádím stručné charakteristiky experimentálních druhů a metod, které jsem využila v experimentální části práce, dělené podle charakteru jednotlivých skupin experimentů, tedy například experimenty zaměřené na odolnost vůči vysychání, řízenou fotoinhibici apod.

2.2.1. Experiment 1. VYSYCHÁNÍ

Brachythecium austro-glareosum (C. Muellová) Kindb. (obr. 8). Druh tvoří poměrně tenké koberce, které pokrývají vlhké biotopy. V Antarktidě se tento druh vyskytuje na několika místech na Shetlandských ostrovech, Argentinských ostrovech a pobřeží Danko (západní pobřeží Antarktického poloostrova) – Putzke a Pereira (2001). Preferuje vlhká místa, zpravidla tam, kde dochází k odtoku tavných vod z ledovců a sněžných polí. Stélky jsou výrazné, hnědé nebo žlutozelené a jsou obvykle poněkud hnědé zespodu.



Bryum pseudotriquetrum



Brachythecium austroglareosum

Obrázek 8. Vzorok mechů z ostrova Jamese Rosse, Antarktida.

Bryum pseudotriquetrum (Hedw.) Gaertn., Meyer a Scherb. Rostliny tvoří husté trsy tmavě zelené až načervenalé barvy. Stélky jsou jednodušší, obvykle červené a poněkud zesponu plstnaté. Nahoře jsou listy hustší než ve spodní části stélky. *B. pseudotriquetrum* je poměrně rozšířené v Antarktidě.

Různé druhy níže uvedených lišejníků byly sezbírány na poloostrově Fildes, ostrov krále Jiřího (KGI) nacházející se v souostroví jižních Shetlandských ostrovů na severu Antarktického poloostrova. Pro výzkum bylo vybráno následujících pět antarktických lišejníků, které se lišily morfologií stélky, typem fotobionta a barvou stélky. Obrázky lišejníků – viz Barták et al. (2021).

Parmelia saxatilis je foliózní lišejník, jehož stélka je volně připojená k substrátu. Tento druh se hojně vyskytuje na skálách v Antarktidě. *Placopsis antarctica* je korovitý lišejník s výraznými laloky, které tvoří charakteristický radiální vzor postupující od centrálního cefalodia až po okraj stélky. Cefalodium obsahuje kolonie sinic jako sekundární fotobionty, zatímco okrajové části tvořící bílé laloky mají jako primárního fotobionta řasy. *Himantormia lugubris* je antarktický endemit a je důležitou součástí epilitických společenstev lišejníků. Tento druh má keříčkovitou stélku s obvykle jednoduchými a šedými až černými zploštělými útvary podobnými větvím. *Ramalina terebrata* je keříčkovitý lišejník se zploštělými větvenými stélkami. Roste zejména na pobřežních skalách v přímořské oblasti Antarktidy. Často se vyskytuje v dusíkem bohatém okolí hnízdišť ptáků. Korovitý lišejník *Lecania brialmontii* osidluje skály. Jeho stélka obsahuje zelenou kokální řasu jako fotobiont. Druh má dichotomické hyfy a nerovnoměrné rozložení pigmentů v epihymeniu.

Lišejníky *Xanthoria elegans*, *Leptogium puberulum*, *Physconia muscigena*, *Rhizoplaca melanophthalma* byly sebrány v severní části ostrova James Ross (Ulu peninsula), Antarktida, na dlouhodobé výzkumné ploše (*long-term research plot*, LTRP, 63°48' 03" S, 57°52' 50" W) nedaleko antarktické stanice J.G. Mendel. Plocha se nachází v blízkosti pobřeží, a to mezi soutokem dvou potoků: *Bohemian stream* a *Algal stream*. Obrazky lišejníků – viz Orekhova et al. (2018a).

Xanthoria elegans je epilitický foliózní lišejník, tvořící žlutooranžové až červenooranžové ploché útvary podobné růžicím. Druh je rozšířen v horských a arktických oblastech. *Rhizoplaca melanophthalma* má laločnatou stélku, tvořící růžicovité shluky o průměru 1-3 cm. K substrátu je připevněna pouze střední částí takového shluku. Je to kosmopolitní druh, vyskytuje se v horských a arktických oblastech. *Leptogium puberulum* je lišejník, který je typický nepravidelně uspořádanou foliózní stélkou. Ta je obvykle olovově šedá, tmavě olivová, hnědavá až téměř černá. *L. puberulum* má široký výskyt, a to z tropů až do polárních oblastí. *Physconia muscigena* je lišejník s foliózním typem stélky, která je obvykle nepravidelného tvaru, jen volně připevněná k substrátu. Vyskytuje se na obou polokoulích od Arktidy po mírné oblasti v horách. *Nostoc commune* je zástupcem nerozvětvené vláknité cyanobakterie s heterocystou a tvoří makroskopické kolonie. Často se vyskytuje v Antarktidě na suchozemských, často však velmi zvodnělých antarktických stanovištích. Roste na různých substrátech, zejména v podmínkách nadměrné vlhkosti.

Rehydratace a aktivace fotosyntetických procesů u mechů

Fotosyntéza při rehydrataci stélek mechů byla zkoumána metodou fluorescence chlorofylu (ChlF). Suché vzorky *B. austro-glareosum* a *B. pseudotriquetrum* rehydratovali v Petriho miskách s pravidelným opakovaným ovlhčením po dobu 48 hod. Aktivaci primárních fotosyntetických procesů jsem hodnotila metodou měření Kautského kinetiky s analýzou mechanismů zhášení (obvykle s intervalem měření 1 h). Kinetika byla měřena fluorometrem FluorCam HFC-010 (Photon Systems Instruments, Drasov, Česko) metodou popsanou v dřívějších pracích experimentální skupiny (např. Trnková a Barták 2017). Byly vypočteny a vyjádřeny v závislosti na čase rehydratace tyto parametry: F_v/F_m (potenciální kvantový výtěžek fotosyntetických procesů v PSII), Φ_{PSII} (efektivní kvantový výtěžek fotosyntetických procesů PSII), F_s (rovnovážná fluorescence) a RfD (relativní koeficient poklesu fluorescence, vitalitní index) (definice a rovnice viz v Tabulce 1-příloha 1).

Dehydratační experiment: Stanovení rychlosti vysychání a relativního obsahu vody

Před experimenty byly stélky mechu o průměru asi 1 cm rehydratovány v laboratoři po dobu 24 hodin při teplotě 10 °C. Nadbytek povrchové vody byl odstraněn filtračním papírem. Vzorky byly umístěny do plastové trubice stejného průměru s četnými perforacemi na jejím povrchu, umožňujícími vysušení stélky mechu. Vzorky byly vystavovány přirozenému vysychání při pokojové teplotě a tlumeném osvětlení (20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR). Při vysychání byly změny obsahu vody určovány gravimetricky na vahách Mettler AE 100 (Německo). Relativní obsah vody (RWC) byl vypočten podle vzorce:

$$\text{RWC} = [(\text{čerstvá hmotnost} - \text{hmotnost sušiny}) / (\text{hmotnost po nasycení vodou} - \text{hmotnost sušiny})] * 100$$

Při dehydrataci z plně vlhkého stavu do suchého se také měřily změny vodního potenciálu (WP) v stélkách mechu pomocí WP4T (Decagon Devices, Pullman, USA), a to v 10-20 min intervalech podle rutinní metody (Jupa et al. 2012). Nakonec byla stanovena závislost mezi WP a RWC pro jednotlivé druhy mechů.

Stélky experimentálních lišejníků byly plně hydratovány při 15 °C během 24 hodin v uzavřených Petriho miskách, dokud nebylo dosaženo maximální hmotnosti vzorku (to bylo ověřeno vážením lišejníku na laboratorních vahách (Brand, Adam Equipment, Oxford, MS, USA). Plně hydratované stélky pak byly postupně vysušeny při pokojové teplotě (18 °C, 40 % RH). V průběhu vysychání se stélky pravidelně (zpravidla v intervalu deseti minut) vážily pro pozdější stanovení RWC. Vážení stélek a výpočet RWC pokračovaly, dokud nebyla dosažena konstantní váha suchého vzorku.

Parametry fluorescence chlorofylu při vysychání

Vzorky lišejníků byly před experimentem hydratovány po dobu 24 hodin v přirozené pokojové teplotě. Před měřením dehydratace byly vzorky testovány na F_V/F_M po 24, 25 a 26 hodinách rehydratace. Když F_V/F_M dosáhl maxima a hodnoty konstanty, byl vzorek považován za plně hydratovaný a primární fotosyntetické procesy za plně aktivní. Během vysychání od zcela vlhkého (RWC = 100 %, WP = 0) až do suchého (RWC = 0 %) stavu, ChlF parametry byly měřeny několikrát (v 10 min. intervalu): (1) efektivní kvantový výtěžek (Φ_{PSII}) fotosystému II, (2) rovnovážná fluorescence chlorofylu F_S (např. Roháček a Barták 1999; Roháček 2010). K tomuto účelu byl použit fluorometr PAM-2000 (Walz, Německo) se speciálně naprogramovaným postupem měření a Fluorcam HFC-10 (Photon Systems Instruments, Česko). Saturační pulzy byly

aplikovány na vzorky aklimované na světlo (vystaveny působení $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR), a to v intervalu 10 min. Byly vytvořeny dehydratační křivky – reakce Φ_{PSII} a F_s .

Rychlé světelné křivky ETR

Světelné křivky rychlosti přenosu elektronů (ETR) jsme měřili na vzorcích mechů, které byly před experimentem hydratovány nejméně 24 hodin. Křivky byly měřeny v průběhu vysychání modulovaným fluorometrem PAM 2500 (Walz, Německo) podle standardního protokolu, předběžně naprogramovaného v přístroji při progresivním vysychání při pokojové teplotě. Během vysychání bylo RWC stanovováno gravimetricky – viz výše. ETR bylo měřeno v intervalu 30 min. Metoda spočívá v měření rychlých světelných křivek (RLC – White a Critchley 1999), tedy měření Φ_{PSII} ve vzorcích vystavených zvyšující se intenzitě záření (0 až $1050 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR).

Měření spektrální odrazivosti

Spektra odrazivosti mechů byla měřena v rozmezí vlnových délek 380-800 nm pomocí spektroreflektometru PolyPen RP 400 UV VIS (Photon Systems Instruments, Brno, Česko). Vzorky mechů a lišejníků byly často měřeny během postupné dehydratace od zcela vlhkého až po suchý stav. Na základě údajů spektrální odrazivosti byl vypočítán fotochemický reflektanční index (PRI) a normalizovaný růstový vegetační index (NDVI), jakož i řada dalších indexů (CARI, MCARI, GI, CI, CCRI, Pq – definice a rovnice viz v Tabulce 2-příloha 1).

Jako doplňková studie bylo měření spektrálních charakteristik stélek lišejníků (*Xanthoria elegans*, *Leptogium puberulum*, *Physconia muscigena*, *Rhizoplaca melanophthalm*), při vysychání bez přítomnosti horního kortexu. Optické vlastnosti horního kortexu se mění při vysychání lišejníku, mohou ovlivňovat množství fotosynteticky aktivního záření dosahující vrstvy fotobionta a také odrazový signál připisovaný fotosyntetickým pigmentům. Hlavním cílem studie proto bylo posoudit vliv přítomnosti / absence horní vrstvy kortexu na hodnoty PRI a NDVI v reakci na postupnou dehydrataci.

Statistická analýza

Druhově specifické rozdíly pro signály ChlF (F_s), a parametry fluorescence chlorofylu ChlF (Φ_{PSII} , NPQ, ETR) byly statisticky hodnoceny v závislosti na RWC (nezávislá proměnná) a to jak pro rehydratační, tak pro dehydratační experimenty. Druhově specifické rozdíly ve spektrální

reflektanci odrazu (vlnová délka jako nezávislá hodnota) byly také vyhodnoceny pouze pro vlhký a suchý stav stélek, pomocí párového Studentova t-testu na hladině významnosti $P = 0.005$.

2.2.2. Experiment 2. FOTOINHIBICE

Pro fotoinhibiční experiment byly použity vzorky mechu *Sanionia uncinata*, které byly sezsbírány na ostrovech Jamese Rosse (Solorina Valley – $63^{\circ}53'01''S$, $57^{\circ}46'48''W$) a krále Jiřího (Collins-Bay, $62^{\circ}10'10.4''S$ a $58^{\circ}51'13.4''W$) (obr. 9).



Obrázek 9. Vzorky mechu *Sanionia uncinata* z ostrovů Jamese Rosse (KGI) a krále Jiřího (JRI), včetně detailu (poslední obrázek).

Mech *S. uncinata* je rozšířen v arktických polárních šířkách a je jedním z dominantních druhů Antarktidy (Smith 1996; Virtanen et al. 1997; Hedenäs 1989, 2003). Mech vytváří velké koberce v nezamrzlých zónách a roste často v kombinaci s jinými mechy a lišejníky (Torres-Mellado et al. 2011). *S. uncinata* snáší silnou dehydrataci (Pizarro et al. 2019) a díky obsahu UV absorbujících sloučenin a specifických sekundárních metabolitů (Newsham et al. 2002; Fernandes et al. 2015, 2017) se dobře přizpůsobuje vysokému UV záření (Lud et al. 2002).

Metody použité v experimentu *Fotoinhibice*

Zdrojem záření pro fotoinhibiční experiment byl světelný LED panel (SL 3500.cz, Photon Systems Instruments, Česko), tvořený vysoce účinnými bílými LED diodami. Při fotoinhibičním ovlivnění byly vzorky mechu umístěny na Petriho misky a ozařovány se shora, tedy v přirozeném

umístění známém z terénu. Krátkodobé ovlivnění vysokými hodnotami fotosynteticky aktivního záření dosahovalo hodnot $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ po dobu 60 min. Během expozice byly Petriho misky s mechy umístěny na drceném ledu pro dosažení stálé nízké teploty stélky ($5 \text{ }^\circ\text{C}$, teplota zaznamenávána termočlánkem a dataloggerem).

Časná fáze fotoinhibice

Na začátku fotoinhibice ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se fluorescenční parametry, hodnotící rannou fázi fotoinhibice, měřily pomocí fluorometru PAM 2000 (Walz, Effeltrich, Německo) po dobu prvních desítek minut expozice. Při zpracování výsledků jsem se zaměřila na kvantifikaci efektivního kvantového výtěžku (Φ_{PSII}), fluorescenci chlorofylu v rovnovážném stavu (F_s) a nefotochemické zhášení (q_N). První měření Φ_{PSII} , F_s a q_N bylo provedeno po 10 s od zahájení expozice, každé další měření s intervalem 30 s během celého fotoinhibičního ovlivnění.

Rychlá indukční kinetika fluorescence chlorofylu (OJIP) při fotoinhibici

Křivky rychlé indukční kinetiky fluorescence chlorofylu (křivky OJIP) jsem měřila pomocí fluorometru FluorPen FL-100 (Photon Systems Instruments, Drásov, Česko). Před měřením byly suché vzorky nejprve rehydratovány po dobu 48 h. Po rehydrataci byly vzorky předzatemněny po dobu 5 min. před každým měřením. Pro hodnocení účinků fotoinhibice na PSII z dat OJIP byly získány následující parametry ChlF (Strasser et al. 2004): (1) F_M/F_0 , (2) Φ_{i-P_0} , (3) ABS/RC , (4) Φ_{i-D_0} , (5) Pi_{Abs} , (6) TR_0/RC , (7) ET_0/RC и (8) DI_0/RC – definice a vysvětlení viz v Tabulce 3- příloha 1. Signály fluorescence byly registrovány v intervalu 10 ms až 1 s a promítly se na logaritmickou časovou škálu charakteristickou křivkou OJIP.

Statistická analýza

Rozdíly pro jednotlivé parametry mezi vzorky z obou sledovaných ostrovů (KGI, JRI), a rozdíly mezi suchým a vlhkým stavem (WET, DRY), byly hodnoceny pomocí párového Studentova t-testu na hladině významnosti $P = 0.005$.

2.2.3. Experiment 3. ŠOKOVÉ ZMRAZENÍ

V experimentu jsem se zaměřila na několik vybraných druhů řas a sledovala jsem jejich odolnost vůči rychlému zmrazení. V následujícím oddílu textu jsou popsány experimentální druhy.

Řasy rodu *Heterococcus* jsou žlutozelené řasy, které dobře prosperují v polárních regionech (Rybalka et al. 2009). Jsou to psychrofilové a nacházejí se v různých polárních prostředích (Darling et al. 1987). V terénu je však *Heterococcus* relativně vzácný druh. Kromě toho, *Heterococcus* sp. je symbiotická řasa čeledi lišejníkovitých Verrucariaceae (Tschermak 1941; Parra a Redon 1977; Tschermak-Woess 1988; Thüs a Schultz 2008).

Mikrořasy rodu *Heterococcus* se vyskytují jak v polárních mořích (Andreoli et al. 2000), tak v suchozemských polárních ekosystémech (Elster 2002; Raymond et al. 2009), například na Svalbardu (Pitschmann 1963; Darling et al. 1987; Lokhorst 1992; Starmach 1995; Gonzalez Garraza et al. 2011; Raabova a Kovačik 2013; Borchhardt et al. 2017; Rippin et al. 2018).

Diplosphaera chodatii je jednobuněčná řasa z čeledi Trebouxiophyceae. *D. chodatii* se ve své studii detailně zabýval např. Doering (2017). Druh roste na skalách na pomezí tekoucí či stagnantní vody a břehu, je tedy častý v okolí řek a jezer. Je považován za suchozemský druh žijící v půdě (Flechtner et al. 1998; Lukešová a Hoffmann 1996). Osidluje také například dřevěné konstrukce (Handa et al. 2001) a vyskytuje se i v pouštích (Flechtner et al. 2008). *D. chodatii* se nachází volně žijící (Flechtner et al. 1998; Lukešová a Hoffmann 1996). Stejně tak tvoří symbiózu s lišejníkovou houbou *Dermatocarpon luridum* (S.) Laundonová (Fontaine et al. 2013) a Verrucariaceae (Thüs et al. 2011).

Stigeoclonium sp. je vláknitá větvená řasa vyskytující se v dobře hydratovaných suchozemských ekosystémech na subantarktických ostrovech v maritimní Antarktidě (např. Pushparaj et al. 2004), konkrétně na ostrově krále Jiřího (Mrozinska et al. 1998; Komárek a Komárek 1999) a ostrově Jamese Rosse (Caisová et al. 2009). Roste zejména na velmi vlhkých místech, jako jsou menší sladkovodní jezera, potoky a vodou prosáklé substráty. Rod *Stigeoclonium* byl hojně zkoumán zejména pro jeho morfologii, rozmnožování a cytologii (např. Skinner a Entwisle 2004; Michetti et al. 2010) a také fotosyntetické procesy (Váczí 2018).

V našich studiích (Orekhova et al. 2018b, Orekhova et al. 2019) jsme se zaměřili na dva aspekty fyziologie výše uvedených řas. Za prvé to byla odolnost řas vůči teplotě pod bodem mrazu, zejména vůči šokovému zmrazení, a za druhé použitelnost metody fluorescence chlorofylu pro monitorování růstu a fyziologického stavu kultury řas při kultivaci na agarových mediích. Předpokládali jsme, že budou existovat mezidruhové rozdíly v jejich odolnosti vůči šokovému zmrazení a také v jejich následné rychlosti růstu na agarech.

Metody použité v experimentu 3. Šokové zmrazení

Heterococcus sp. (CCALA, kmen 820) byl izolován pracovníky Botanického ústavu AV ČR v Třeboni ze vzorků půdy přivezených z ostrova Jamese Rosse, Antarktida. Tento kmen jsem ve své experimentální práci použila pro studii odolnosti druhů vůči rychlému zmrznutí. *Heterococcus* sp. jsme kultivovali ve 3 N anorganickém Boldově bazálním mediu (BBM) ve skleněných kultivačních nádobách o objemu 100 ml při $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR. Kultivace byla statická, baňky byly umístěny na pultech v kultivační místnosti (Liebherr FKS 5002, Německo). Teplota kultivace byla 10 °C.

Diplosphaera chodatii (kmen CCALA č. 336) a *Stigeoclonium* sp. (EEL kmen č. 004) byly izolovány ze vzorků sbírky CCALA (Třeboň, Česká republika) a vzorků z ostrova Jamese Rosse, Antarktida. *D. chodatii* byla izolována Dr. Lukešovou v roce 1988 a poté kultivována jako kultura v BBM. *Stigeoclonium* sp. byl izolován ze vzorků vody odebrané z jezera Big Lachman (na ostrově Jamese Rosse, Antarktida). Zásobní kultury řas *D. chodatii* a *Stigeoclonium* sp. byly použity pro experimenty zabývající se odolností druhů vůči šokovému zmrazení. Tyto řasy byly kultivovány stejným způsobem jako je popsáno výše u *Heterococcus* sp.

Šokové zmrazení - *Heterococcus* sp.

Zkoumali jsme, zda a do jaké míry, má jednobuněčná řasa *Heterococcus* sp. z ostrova Jamese Rosse (Antarktida) kryorezistentní vlastnosti. Nedávná studie (Kviderová et al. 2013) odhaluje vitalitu a růst *Heterococcus* sp. po rychlém zmrazení vzorků s přídavkem ribitolu i bez něj. Předpokládali jsme, že přidání ribitolu zvýší životaschopnost a rychlost obnovení primárních fotosyntetických procesů, hodnocených podle potenciálního (F_v/F_m) a efektivního kvantového výtěžku (Φ_{PSII}) fotosyntetických procesů ve fotosystému II řasy *Heterococcus* sp. I pro další parametry fluorescence chlorofylu byly vyhodnoceny časové průběhy po rychlému zmrazení a následné kultivaci na agaru. Ve studii byl také vyhodnocován kryoprotektivní účinek ribitolu.

V naší další studii jsme se zaměřili na fotosyntetické parametry dvou dalších řas *Diplosphaera chodatii* a *Stigeoclonium* sp., kde jsme pomocí stejné metody šokového zmrazení prokázali kryorezistenci těchto dvou druhů.

Suspense řasových kultur se pipetovaly do mikrozkušavek (kryovialky, Brand, Německo) a to 1 ml suspence řas bez přidání kryoprotektivních sloučenin (5 opakování). Do části

mikrozkumavek se vzorkem byl přidán ribitol (Merck, Německo), a to 0.5 ml suspenze a 0.5 ml ribitolu. Byly použity dvě koncentrace ribitolu: (1) 32 mM (5 g dm^{-3}) a (2) 50 mM (7.6 g dm^{-3}) ribitolu. Po 5 h expozici ribitolem, byly všechny vzorky včetně kontroly zmrazeny ponořením do tekutého dusíku ($-196 \text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 10 minut. Kryovialky s mraženými řasami byly vyjmuty z kapalného dusíku a ponechány v pokojové teplotě ($23.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$) pro přirozené rozmrznutí. Poté byl tekutý inokulát (0.5 ml) rovnoměrně rozložen (rozlit) na agarové medium do Petriho misek (anorganické prostředí 3 N BBM s 1.5 % agarem, Duchefa, Nizozemsko, Prod. 1001.000) (den 0). Vzorky (kontrola a ribitolem ovlivněné) byly na agarových deskách kultivovány po dobu následujících 30 dnů. Kultivace probíhala v teplotě $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a záření $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ PAR. Během kultivace byla nastavena fotoperioda 16 / 8 h světlo / tma. Růst kultury jsme pravidelně ověřovali každé 3 dny pomocí optické mikroskopie (Olympus BX 41, Japonsko). První živé buňky byly na agarech nalezeny 9. den po inokulaci kultury.

Hodnocení životaschopnosti buněk *Heterococcus* sp.

Ke stanovení počtu živých / mrtvých buněk kmene *Heterococcus* sp. rostoucích na agarech byla použita optická mikroskopie. Počty buněk byly určeny alespoň na 15 místech (o ploše 0.01 mm^2), které se nacházejí náhodně na kultuře řas kultivované na jedné Petriho misce. Obvykle bylo testováno 100 buněk (respektive jejich stav: živá/mrtvá buňka). Zelené buňky s dobře rozeznatelným chloroplastem a bez jakýchkoliv známek poškození se označovaly jako živé. Roztržené a / nebo bezbarvé buňky byly označeny jako mrtvé. Hodnotily se pouze plně viditelné buňky. Mikroskopická studie byla opakována i v následujících dnech kultivace (den 9. 12. 14. 16. 19, a 22). Životaschopnost (P_v) kultury byla vypočtena podle vzorce:

$$P_v = (\text{počet živých buněk} \times 100) / (\text{počet živých buněk} + \text{počet mrtvých buněk})$$

Měření fluorescence chlorofylu u *Heterococcus* sp.

Parametry fluorescence chlorofylu byly měřeny v následujícím časovém sledu: (1) před experimentem (kontrola, *Heterococcus* sp. v tekuté kultuře), (2) bezprostředně po rychlém zmrazení a následném rozmrazení při pokojové teplotě (*Heterococcus* sp. v kapalně kultuře) a (3) opakovaně po inokulaci mražené kultury na agaru a následném růstu, zpravidla ve 3-denním intervalu. Změny fyziologického stavu buněk řas během kultivace po rychlém zmrazení jsme hodnotili pomocí několika vybraných parametrů fluorescence chlorofylu (měřeny pomocí fluorokamery HFC-010, Photon Systems Instruments, Česko). Petriho misky s kulturami řas byly

nejprve zatemněny po dobu 5 minut a poté byla měřena Kautského pomalá kinetika fluorescence chlorofylu doplněná o analýzu zhášení. Byla použita metoda měření optimalizovaná pro lišejníky a popsána v dřívějších publikacích pracovní skupiny (např. Trnková a Barták 2017). Z křivek byly softwarem přístroje vyhodnoceny následující parametry ChlF: potenciální kvantový výtěžek fotosyntézy procesů v PSII (F_V/F_M), efektivní výtěžek fotochemických procesů fotosyntézy v PSII (Φ_{PSII}), nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu (NPQ) a rovnovážná fluorescence (F_S). Parametry ChlF byly použity k hodnocení: (1) přímého účinku šokového zmrazení a (2) růstu buněk řas po šokovému zmrazení.

Statistická analýza

Statistická analýza byla prováděna pro datové soubory parametru P_v , parametrů ChlF (F_V/F_M , Φ_{PSII} , NPQ, RfD, qF_0) a signálu ChlF (F_S) pomocí analýzy variance ANOVA (Fisher LSD test) – Statistica ver. 13. Statisticky významné rozdíly byly sledovány na hladině významnosti $r < 0.05$. Testovanými faktory bylo ovlivnění ribitolem (kontrola, R32 a R50) a doba kultivace *Heterococcus* sp. na agaru.

Šokové zmrazení - *D. chodatii* a *Stigeoclonium* sp., měření fluorescence chlorofylu

Podobný experimentální design jako u výše popsané studie s řasou *Heterococcus* sp. (Orekhova et al. 2018b), byl použit také v experimentech se zelenými řasami *D. chodatii* a *Stigeoclonium* sp. (Orekhova et al. 2019), ve studii nebyl použit externí přídavek ribitolu a nebyla hodnocena životaschopnost buněk. Po šokovém zmrazení a následném rozmrazení se vzorky řas *D. chodatii* a *Stigeoclonium* sp kultivovaly v Petriho miskách na agaru po dobu následujících 28 dnů. Po týdnu kultivace na agaru se počet živých buněk zvýšil natolik, že bylo možno provést měření chlorofylové fluorescence (tj. signál chlorofylové fluorescence byl nad detekčním limitem přístroje – viz níže). Proto bylo možno provést první měření pomalé Kautského kinetiky a analýzu zhášení ChlF 7. den kultivace.

3. VÝSLEDKY

3.1. Experiment 1 – Druhově specifické reakce fotosyntetických charakteristik u dvou vybraných antarktických mechů a lišejníků na vysychání stélek

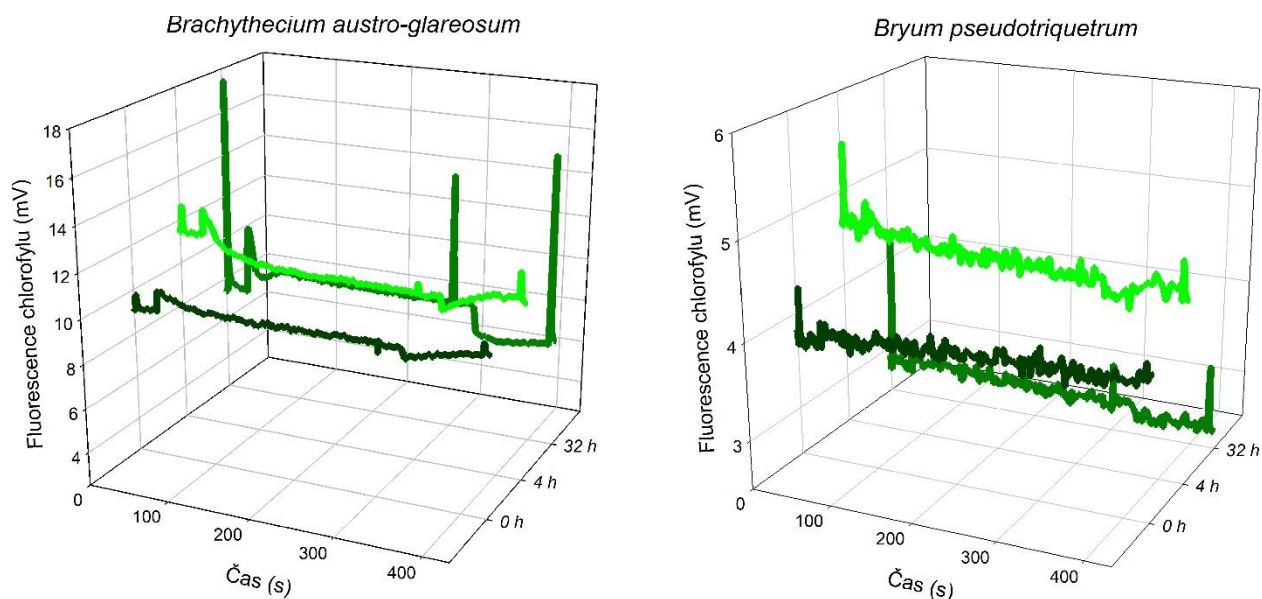
V naší studii jsme se zaměřili na vliv dehydratace stélky na primární fotosyntetické procesy a spektrální odrazivost u dvou druhů mechů z ostrova Jamese Rosse a několika druhů lišejníků z ostrova krále Jiřího. I když se oba druhy mechu vyskytují v podobném prostředí, předpokládali jsme, že jejich odolnost vůči vysychání bude vysoká, přesto však že bude vykazovat druhovou specifičnost. Předpokládali jsme, že *Brahythecium austro-glareosum* bude projevovat menší odolnost fotosyntetických procesů vůči silnému stupni vysychání než *Bryum pseudotriquetrum*. V neposlední řadě jsme analyzovali úroveň ochranného mechanismu zhášení aktivovaného u těchto dvou druhů mechů při dehydrataci.

Také jsme vyhodnocovali druhově specifickou citlivost primárních fotosyntetických procesů u několika lišejníků při vysychání. Tato studie navazovala na dřívější práci (Barták et al. 2018b), která se zaměřila na základní fyziologické reakce primárních fotosyntetických procesů a spektrální odrazivost při vysychání lišejníků. Tento přístup jsme doplnili analýzou tvaru pomalé Kautského kinetiky během vysychání. Předpokládali jsme, že antarktické lišejníky z ostrova krále Jiřího, konkrétně jejich primární procesy fotosyntézy, budou vysoce odolné vůči vysychání.

Rehydratace mechů

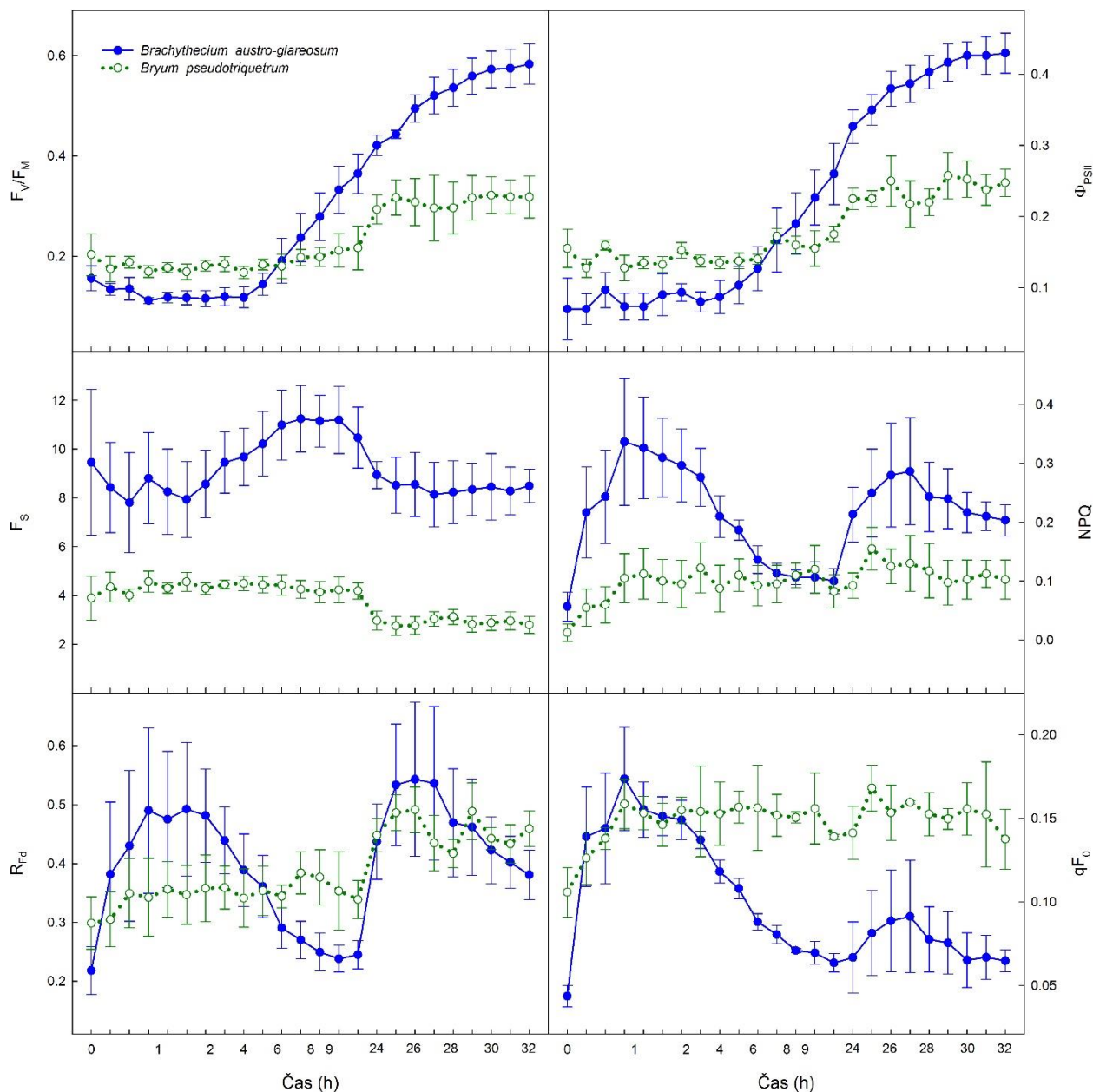
Křivky pomalé Kautského kinetiky fluorescence chlorofylu se měnily v závislosti na rehydrataci. Změny tvaru křivky a čas nezbytný k obnovení "typického tvaru" ukázaly čas potřebný k úplné obnově primárních fotosyntetických procesů v Φ_{PSII} (obr. 10, 11).

Oba druhy za 32 h rehydratace obnovily maximální hodnoty F_V/F_M a Φ_{PSII} . Narůst obou parametrů však byl polyfázický, vykazující fázi prodlevy (0-3 h pro *B. austro-glareosum*, 0-5 h pro *B. pseudotriquetrum*), ve které nedocházelo k nárůstu hodnot. Poté (2/5 – 30 h), se hodnoty F_V/F_M a Φ_{PSII} u obou druhů zvýšily podle charakteristické S-křivky. U *B. pseudotriquetrum* byly zjištěny maximální hodnoty F_V/F_M a Φ_{PSII} poněkud nižší než u *B. austro-glareosum*. Rehydratační cykly NPQ byly druhově specifické. Pro *B. austro-glareosum*, NPQ vykazovalo polyfázickou a komplexní křivku s lokálním minimem nalezeným v čase v 5-9 h rehydratace a dvěma maximy (45 min. a 27 h).



Obrázek 10. Pomalá Kautského kinetika u *Brachythecium austro-glareosum* (vlevo) a *Bryum pseudotriquetrum* (vpravo) v závislosti na čase rehydratace (upraveno dle Orekhova et al. 2021a).

Minimálních hodnot NPQ bylo dosaženo v okamžiku, kdy F_v/F_m a Φ_{PSII} vykazovaly nejrychlejší nárůst, a dosažení lokálního maxima rovnovážné ChlF (F_s). *B. pseudotriquetrum* vykazoval víceméně konstantní, ale pomalou rychlost nárůstu hodnot NPQ po celou dobu rehydratace. Hodnoty F_s byly konstantní na samém počátku (0-9 h), ale po 24 h rehydratace mírně poklesly.



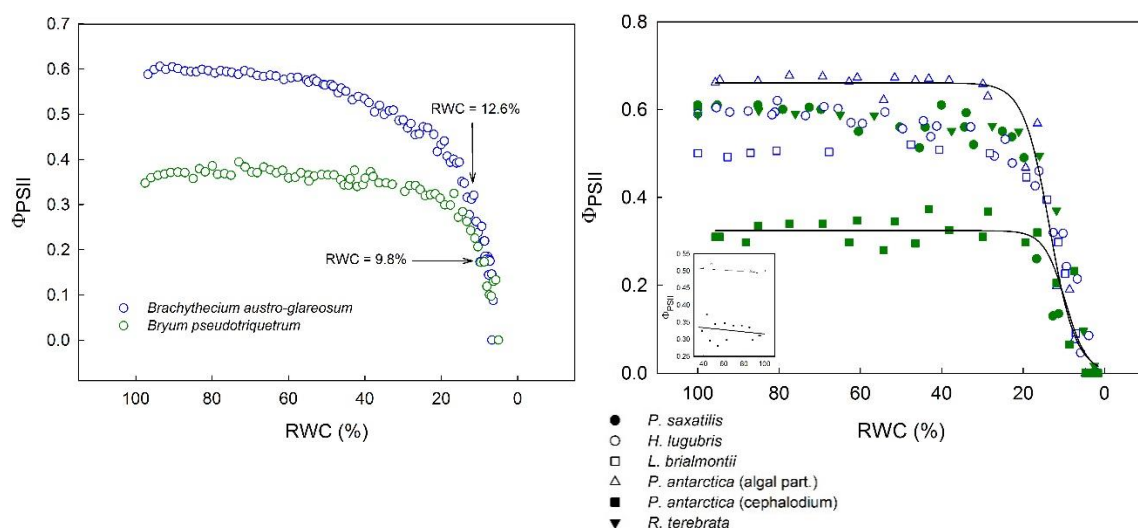
Obrázek 11. Průběh fluorescence chlorofylu, parametry zaznamenané během 32 h rehydratačního období u *B. austro-glareosum* (modré symboly) a *B. pseudotriquetrum* (zelené symboly). Datové body představují průměry z 5 opakování \pm standardní chyby. F_v/F_m – potenciální výtěžek fotochemických fotosyntetických procesů v PSII, Φ_{PSII} – efektivní výtěžek fotochemických fotosyntetických procesů v PSII, NPQ – nefotochemické zhášení, F_S – rovnovážná ChlF, Rfd – relativní pokles fluorescence chlorofylu (index vitality), qF_0 – zhášení základní ChlF. Druhově specifické časové průběhy parametrů jsou statisticky významně odlišné ($P = 0.005$), s výjimkou Rfd a qF_0 (upraveno dle Orekhova et al. 2021a).

Dehydratace mechů a lišejníků

V průběhu dehydratace se hodnoty Φ_{PSII} u obou druhů mechu neměly v rozmezí RWC 40-100 %. Při výrazném stupni vysychání (interval poklesu hodnot RWC ze 40 na 0 %), byl zřejmý rychlý pokles Φ_{PSII} , a to až do dosažení plné inhibice primárních fotochemických procesů fotosyntézy ($\Phi_{PSII} = 0$). Tento pokles byl srovnatelný u obou druhů, avšak v případě

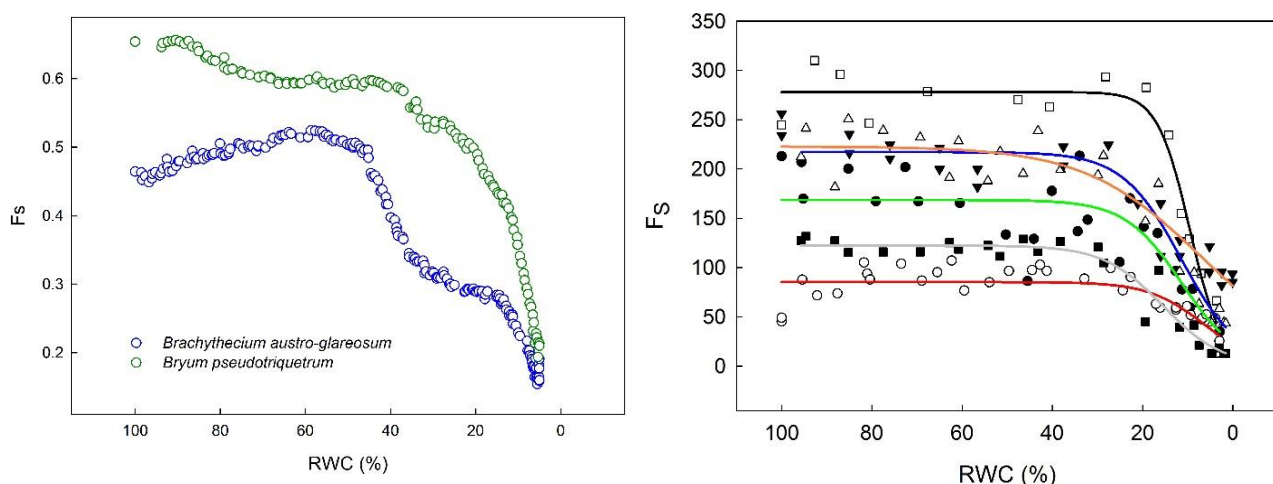
B. pseudotriquetrum byla patrná vyšší odolnost k dehydrataci, protože polovina maximální hodnoty byla zjištěna v nižší hodnotě RWC než v *B. austro-glareosum* (viz obr. 12).

Pokud jde o dehydrataci experimentálních druhů lišejníků, většina druhů nevykazovala žádnou změnu Φ_{PSII} (obr. 12) a F_v/F_m (viz. Barták et al. 2021) ve stélce v průběhu vysychání z vlhkého stavu (RWC = 100 %) do polosuchého stavu (RWC: cca. 35 %). Střední část (cephalodium) lišejníku *P. antarctica* mělo odlišnou křivku reakce Φ_{PSII} a F_v/F_m na dehydrataci s mírným, ale konstantním zvýšením Φ_{PSII} , když hodnoty RWC klesaly ze 100 % na 20 % RWC (viz vložený obrázek na obr. 12). Poté, s dalším vysycháním pod RWC 30 %, byl pak zjištěn významný pokles Φ_{PSII} s dalším vysycháním stélky v RWC pod 25 %. V tomto stavu byly velmi dobře patrné druhově specifické rozdíly v hodnotách $RWC_{0.5}$, tedy hodnot relativního obsahu vody ve stélce, ve kterých Φ_{PSII} dosáhl svých polovičních maximálních hodnot. Pro Φ_{PSII} , i když $RWC_{0.5}$, aby se lišily, obecně měly vyšší hodnoty RWC než F_v/F_m (Barták et al. 2021). Výrazně nízké hodnoty byly zjištěny u kritického RWC (RWC_{krit}), při kterém F_v/F_m a Φ_{PSII} dosáhly hodnoty 0. U všech druhů byl RWC_{krit} nižší než 5 %. Pro křivku dehydratační odpovědi v *P. antarctica* tento parametr (RWC_{krit}) byl pro řasovou část stélky nalezen výrazně vyšší než pro cephalodium, ve kterém je symbiontem cyanobakterie. Nicméně, pokles Φ_{PSII} byl podobný u řasových a cyanobakteriálních částí stélky, jako významné body byly nalezeny u podobných hodnot RWC.



Obrázek 12. Odezva efektivního kvantového výtěžku (Φ_{PSII}) na vysychání stélek mečů (vlevo) a lišejníků (vpravo) z plně vlhkého/hydratovaného (RWC = 100 %) až do suchého/dehydratovaného (RWC = 0 %) stavu. Křivky byly zjištěny statisticky odlišně ($P = 0.005$). RWC, ve kterých je dosaženo poloviny maximální hodnoty Φ_{PSII} , je označena šipkou. Matematické proložení funkcí s rozlišitelnými *S-křivkami* při RWC pod 20 % je uvedeno pro části řas a cyanobakterií (cephalodium) v *Placopsis antarctica* na obrázku vpravo (upraveno dle Orekhova et al. 2021a (levý panel), Barták et al. 2021 (pravý panel)).

Během postupné dehydratace u mechu klesala rovnovážná fluorescence chlorofylu F_S polyfázickým způsobem a vykazovala druhově specifické rozdíly. Rychlý pokles F_S vyvolaný dehydratací začal v různých hodnotách RWC: *B. austro-glareosum* (40 %) a *B. pseudotriquetrum* (30 % RWC). Pokles F_S v nízkém až středně silném stupni dehydratace stélky (od RWC 100 do 40 %) se mezi dvěma experimentálními druhy také lišil. Zatímco *B. pseudotriquetrum* vykazoval S-křivku s hodnotami F_S klesajícími při dehydrataci (obr. 13), mírný nárůst F_S o přibližně 14 % byl zjištěn během poklesu RWC ze 100 na 40 % u *B. austro-glareosum*.



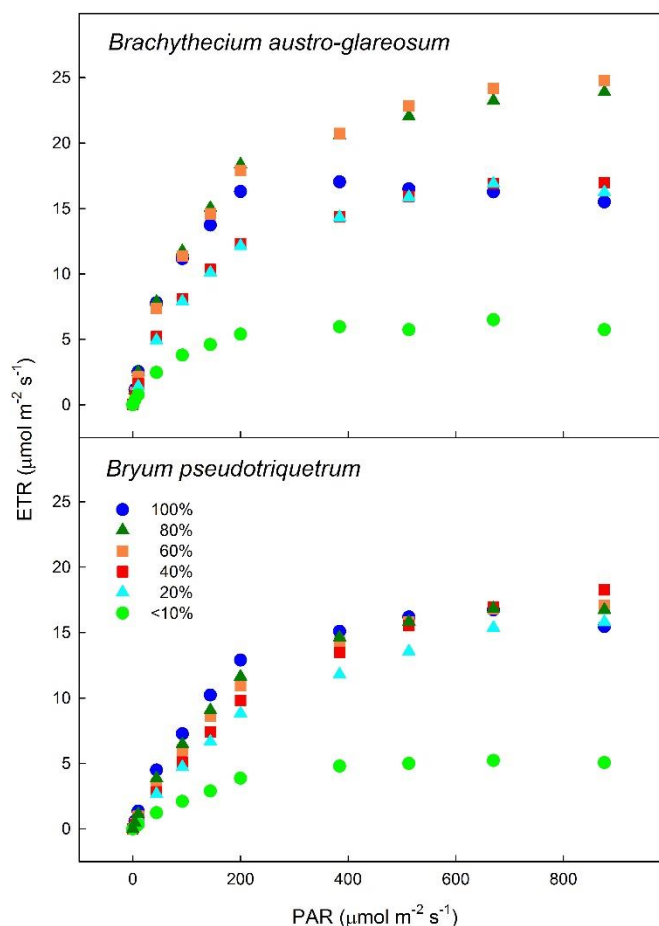
Obrázek 13. Souvislost rovnovážné ChlF (F_S) a relativního obsahu vody (RWC) ve vysychajících mechových stélkách (vlevo, relativní hodnoty) a lišejníků (vpravo, absolutní hodnoty) z plně vlhkého (RWC = 100 %) až do suchého stavu (RWC = 0 %). Průběhy F_S byly zjištěny statisticky významně odlišné ($P = 0.005$) (upraveno dle Orekhova et al. 2021a - levý panel, Barták et al. 2021 - pravý panel).

- *P. saxatilis*
- *H. lugubris*
- *L. brialmontii*
- △ *P. antarctica* (algal part.)
- *P. antarctica* (cephalodium)
- ▼ *R. terebrata*
- *P. saxatilis*
- *H. lugubris*
- *L. brialmontii*
- *P. antarctica* (algal part.)
- *P. antarctica* (cephalodium)
- *R. terebrata*

F_S u lišejníků klesala také polyfázickým způsobem s pokračující dehydratací stélky u všech druhů a vykazovala mírný pokles v rozsahu RWC ze 100 % na 30 %. Pak, podobně jako F_V/F_M a Φ_{PSII} , F_S začala výrazněji klesat při RWC asi 30 %. S výjimkou *H. lugubris* a v cephalodia *P. antarctica*, Φ_{PSII} souvisí s F_S (R^2 nad 0.97), což naznačuje vysoký potenciál F_S signálu pro monitorování funkčnosti fotosyntetického aparátu v průběhu vysychání a limitace fotosyntetické činnosti u *P. saxatilis*, *L. brialmontii*, *R. terebrata*, a *P. antarctica* (řasová část).

Rychlé světelné křivky během dehydratace mechů

Rychlé světelné křivky (ETR) reagovaly na postupné vysychání odlišně u obou druhů mechu. Zvýšení ETR bylo zjištěno v počáteční fázi dehydratace (RWC snížilo ze 100 na 60 %) u *B. austro-glareosum*, zatímco žádné takové reakce nebyly patrné u *B. pseudotriquetrum* ve stejném intervalu RWC (obr. 14). U *B. pseudotriquetrum* se ETR v reakci na PAR nezměnila v rozmezí RWC klesající ze 100 na 40 %, následné snížení ETR bylo pak patrné v hodnotách RWC 20 % a nižších.



Obrázek 14. Rychlé světelné křivky rychlosti elektronového transportu (ETR) pro stélky *Brachythecium austro-glareosum* (horní panel) a *Bryum pseudotriquetrum* (dolní panel) ukazují silné vysychání vyvolané omezením ETR na relativní obsah vody (RWC) o 20 % (upraveno dle Orekhova et al. 2021a).

Výrazný pokles ETR křivek byl zjištěn u obou druhů u RWC pod 10 % RWC. Při tak nízké hydrataci stélky však ETR_{max} u *B. austro-glareosum* stále dosahoval 35.2 % kontroly (ve 100 % RWC) a 23.0 % z maximální hodnoty ETR_{max} pro *B. pseudotriquetrum*.

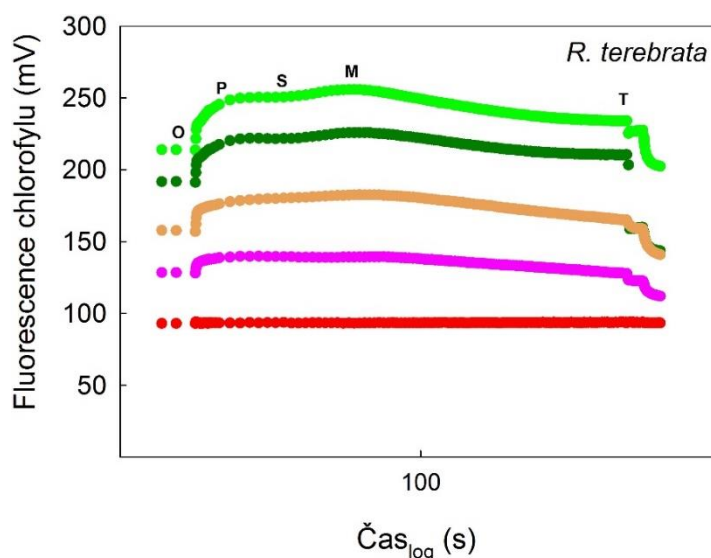
Experimentální druhy se lišily parametrem α (účinnost fotosyntetického transportu elektronů na jednotku PAR), který představuje počáteční sklon křivky při slabém ozáření.

Parametr α dosáhl 0.25 a 0.14 elektronů kvantum⁻¹ v plně hydratovaném stavu (RWC = 100 %) u *B. austro-glareosum* a *B. pseudotriquetrum*. U obou druhů se α snižovalo v průběhu vysychání stélky a dosáhlo minima 0.08 a 0.04 při RWC asi 10 %.

Kautského kinetika v průběhu vysychání lišejníků

Jako příklad působení vysychání na změny Kautského křivky jsme zvolili *R. terebrata*, protože právě u tohoto lišejníku křivka při vysychání vykazuje klasickou postupnou změnu.

Signál ChlF se snižoval ve stélkách lišejníků v průběhu vysychání u všech experimentálních druhů s výjimkou *H. lugubris* (viz Barták et al. 2021). U všech druhů byl však patrný výrazný pokles hodnot ChlF tvořících KK v hodnotách RWC pod 20 %. Pokles vyvolaný vysycháním byl charakteristický "zploštěním" KK a poklesem hodnot P, S, M, T ChlF (obr. 15). Podobně bylo zjištěno snížení hodnot ChlF, které byly dosaženy po aplikaci saturačních pulzů (data F_M nejsou znázorněna na obr. 15).

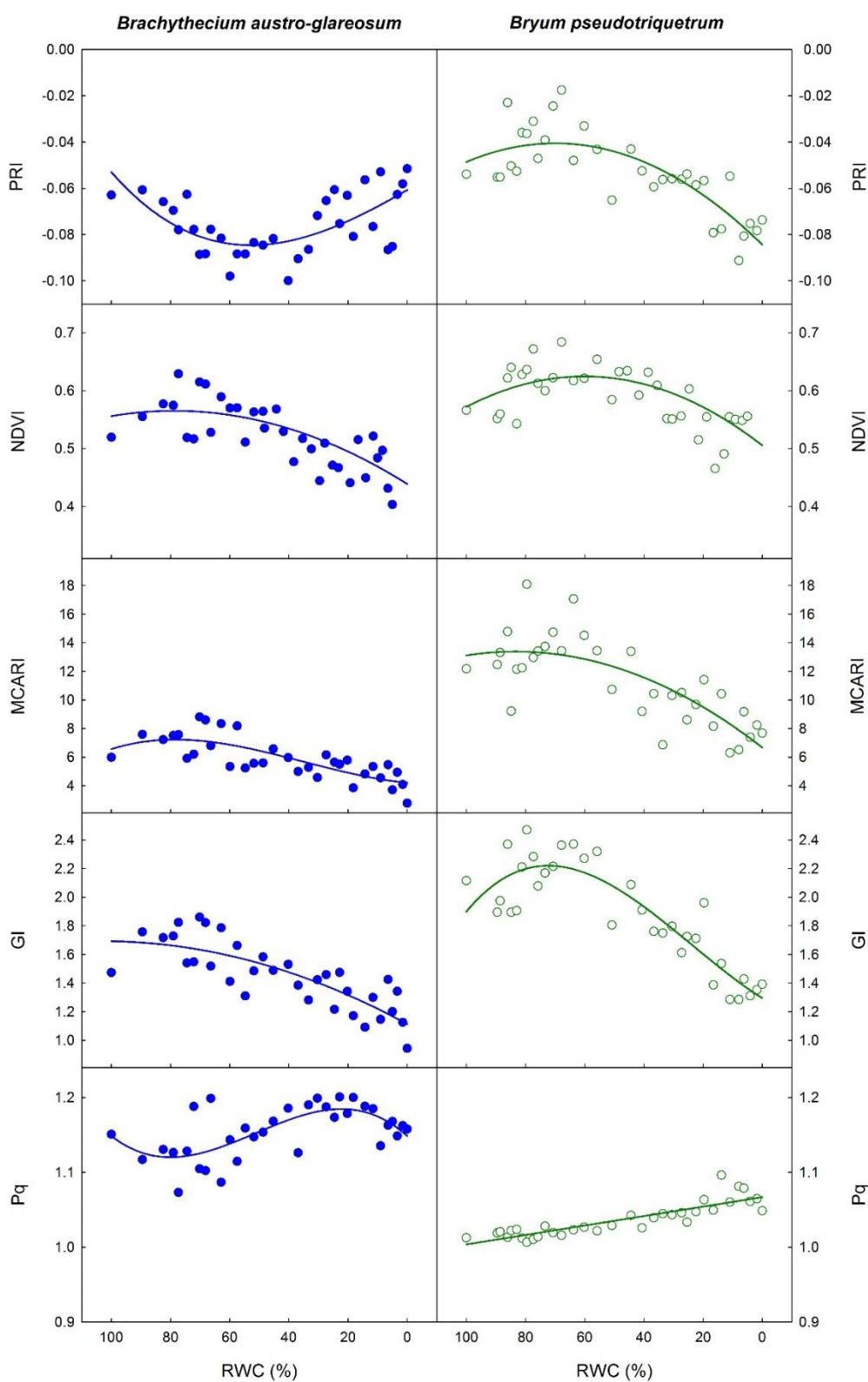


Obrázek 15. Pomalá Kautského kinetika zaznamenaná pro vysychání lišejníků u pěti různých RWC, které se lišily podle druhů lišejníků. *Ramalina terebrata* (RWC 100 %, 65 %, 16 %, 5 %, 0.1 %), RWC hodnoty jsou uvedeny následujícími různými barvami: 100 % - světlě zelená; 62 %-72 % - tmavě zelená; 16 %-22 % - oranžová; 5 % - 9 % - fialová; 0.1 %-4 % - červená. Časová osa (x) je uvedena v měřítku protokolu (upraveno dle Barták et al. 2021).

Tyto změny byly přičítány obecně zvýšenému nefotochemickému zhášení a změnám optických vlastností stélek lišejníku během vysychání (více viz Diskuse). Kromě toho byly zjištěny některé druhově specifické změny ve tvaru KK, například ve fázi OPSMT. Kautského kinetiky obvykle vykazovaly $F_p < F_M$ a bod S se stával méně rozlišitelným s postupujícím vysycháním stélky.

Analýza spektra odrazivosti v průběhu vysychání u mechů

Spektrální indexy vykazovaly odlišnou citlivost na dehydrataci (viz obr. 16). Hodnoty spektrálních indexů NDVI, GI a MCARI poklesly s poklesem RWC.



Obrázek 16. Spektrální indexy odrazivosti ve vysychajících stélkách *Brachythecium austro-glareosum* (plné symboly) a *Bryum pseudotriquetrum* (otevřené symboly) z plně vlhkého (RWC=100 %) až do suchého (RWC= 0 %) stavu (upraveno dle Orekhova et al. 2021a).

Vztah mezi NDVI a RWC byl během dehydratace bifazický. U *B. pseudotriquetrum* se hodnoty NDVI mírně zvyšovaly během iniciální fáze dehydratace (s vrcholem patrným v oblasti 70-80 % RWC), poté s dalším vysycháním NDVI klesal. Obecně platí, že křivka odpovědi na dehydrataci NDVI vykazuje křivkový vztah s výrazným poklesem hodnoty NDVI při hodnotách RWC pod 40 %. *B. austro-glareosum* vykazoval podobnou křivku dehydratace a odpovědi NDVI, nicméně hodnoty NDVI byly menší než u *B. pseudotriquetrum*.

PRI křivka dehydratační závislosti vykazovala rozdílný tvar pro *B. austro-glareosum* a *B. pseudotriquetrum*. V silně dehydratovaných stélkách (RWC pod 30 %), byl patrný nárůst PRI u *B. austro-glareosum*, zatímco opačný trend byl nalezen u *B. pseudotriquetrum*. PRI a NDVI byly korelovány s nefotochemickým zhášením (obr. 16), tyto závislosti však byly druhově specifické. Pro PRI byly u každého druhu nalezeny opačné v závislosti na qN.

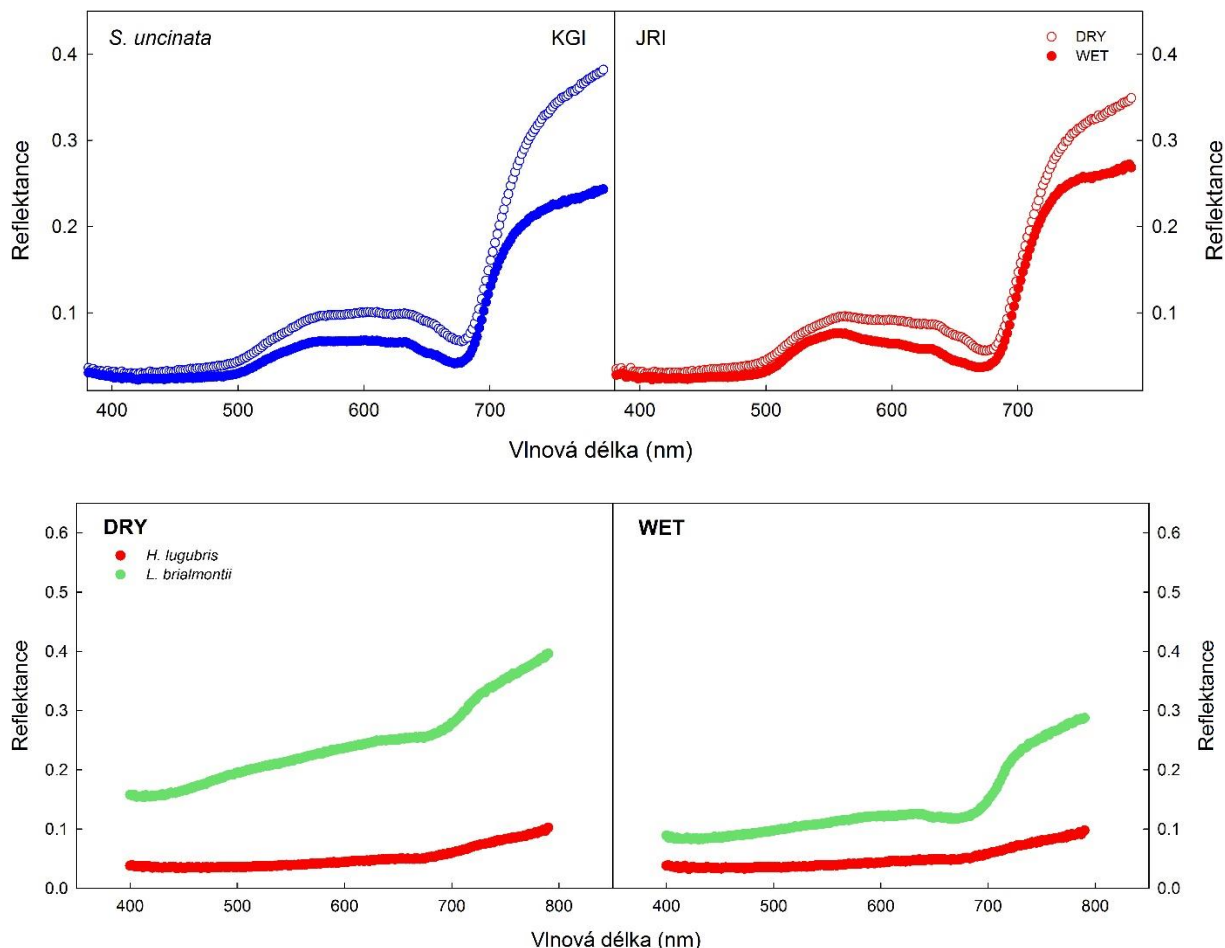
Hodnoty MCARI klesaly s vysycháním u obou druhů. Absolutní hodnoty MCARI byly, nicméně, obecně nižší pro *B. austro-glareosum* než *B. pseudotriquetrum*. Hodnoty indexu GI se snižovaly s poklesem RWC s výjimkou plné hydratace *B. pseudotriquetrum*. V rozmezí 80-100 % RWC se index GI zvýšil s vysycháním, pak, ve RWC (0-80 %), GI klesal. Index feofitinizace (Pq) se zvýšil s poklesem RWC. Vztah mezi Pq a RWC byl polyfázický u *B. austro-glareosum*, ale měl lineární charakter *B. pseudotriquetrum*.

Analýza spektra odrazivosti v suchém a vlhkém stavu u mechů a lišejníků

Spektrální křivky odrazivosti u mechu *S. uncinata* (obr. 17) měly více či méně lineární průběh v rozmezí vlnových délek 370 až 500 nm. Poté následovalo mírné zvýšení, které bylo patrné jak ve vlhkých, tak i v suchých stélkách. Lokální maxima byly patrné v 550 a 640-650 nm. Charakteristický nárůst hodnot odrazivosti (*red edge*) byl nalezen při vlnových délkách nad 680 nm. Ve vzorcích KGI i JRI vykazovaly hydratované vzorky mechu nižší hodnoty odrazivosti než v suchém stavu.

Hodnoty PRI a NDVI u lišejníků vykazovaly druhově specifickou citlivost na dehydrataci (viz Tabulka 2, obr. 17). *Himantormia lugubris* nevykazovala žádné změny mezi spektry zaznamenané v suchém a vlhkém stavu. Spektra *Lecania brialmontii* ukázala naopak výrazné snížení odrazivosti stélky při přechodu ze suchého do vlhkého stavu, a to pro všechny vlnové délky intervalu měření. Spektrum odrazivosti suchého *L. brialmontii* se téměř lineárně zvyšovalo mezi 300 nm a 680 nm. Nicméně, byl patrný místní vrchol ve vlnové délce 640 nm, následovaný

odrazivostí v hodnotách vlnové délky okolo 680 nm. Ve vlhkém i suchém stavu bylo toto zvýšení v oblasti červeného okraje (angl. *Red edge*) bifazické s rychlejším zvýšením odrazivosti v intervalu vlnových délek 680-720 nm, než v následujícím intervalu (720 nm-780 nm).



Obrázek 17. Spektrální křivky odrazivosti zaznamenané pro experimentální druhy lišejníků a mech *Sanionia uncinata* v suchých (RWC = 0 %) a vlhkých (RWC = 100 %) stavech stélky (upraveno dle Orekhova et al. 2021b (horní panel) a Barták et al. 2021 (dolní panel)).

Spektrální indexy v suchém a vlhkém stavu u mechů a lišejníků

Mezi vyhodnocenými spektrálními indexy odrazivosti (viz Tabulka 1) se MCARI1, MCARI ukázaly jako nejcitlivěji reagující na vyschnutí stélky, protože vykazovaly nejvyšší rozdíl mezi suchým a vlhkým stavem. Pozorovali jsme také změny fotochemického indexu odrazivosti vyvolané dehydratací (PRI, pokles suchého stavu) a normalizovaný index chlorofylového pigmentu (NPCI, zvýšení suchého stavu). Normalizovaný diferenční vegetační index (NDVI) vykazoval pouze nevýznamné rozdíly mezi suchým a vlhkým stavem u mechu *S. uncinata*.

Tabulka 1. Spektrální indexy odrazivosti v suchém a vlhkém stavu u mechu *Sanionia uncinata*. Různá písmena v horním indexu označují statisticky významné rozdíly při $p \leq 0.05$.

SPEKTRÁLNÍ INDEXY	KGI		JRI	
	suchý	vlhký	suchý	vlhký
NDVI	0.58 ^a	0.57 ^a	0.59 ^a	0.64 ^b
MCARI1	0.46 ^a	0.31 ^b	0.46 ^a	0.39 ^c
GI	1.37 ^a	1.52 ^b	1.68 ^c	1.98 ^d
MCARI	0.17 ^a	0.23 ^b	0.20 ^a	0.27 ^c
SPRI	0.47 ^a	0.53 ^b	0.54 ^b	0.58 ^c
PRI	-0.15 ^a	-0.13 ^a	-0.10 ^b	-0.06 ^c
NPCI	0.37 ^a	0.31 ^b	0.30 ^b	0.27 ^c

Hodnoty NDVI a PRI se lišily pro suché a plně hydratované stélky experimentálních lišejníkových druhů. Reakce však byla druhově specifická. Hodnoty NDVI se snížily v hydratovaném stavu pro lišejníky *H. lugubris* a *P. saxatilis*, ale zvýšily se u *L. brialmontii*, *R. terebrata* a *P. antarctica*. Nicméně, ve vlhkém stavu byly (oproti suchému stavu) hodnoty PRI buď vyšší (*H. lugubris*), nižší (*P. saxatilis*, *P. antarctica*), nebo neukázovali žádnou změnu (*L. brialmontii*, *R. terebrata*).

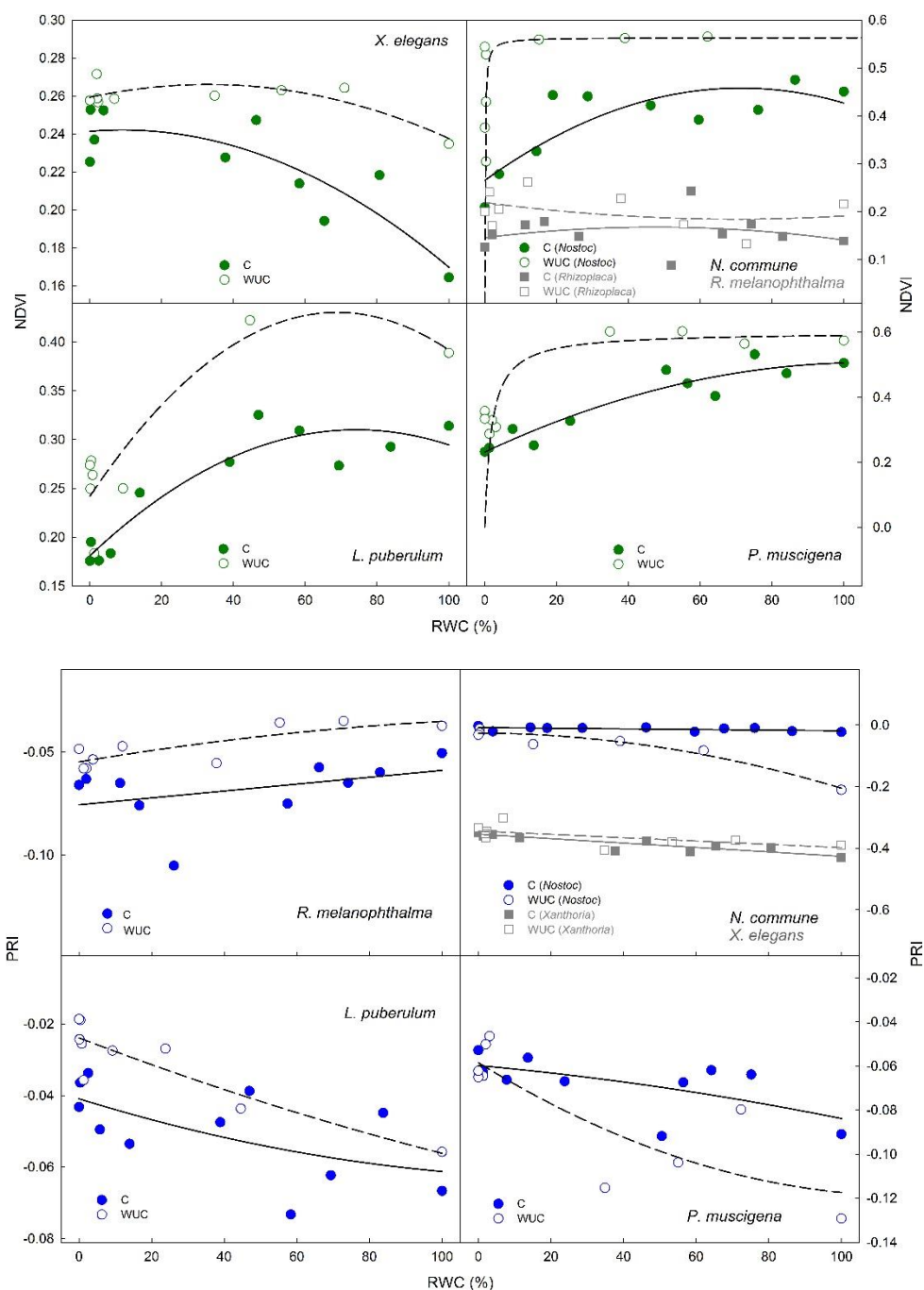
Tabulka 2. Spektrální indexy (NDVI, PRI) zaznamenané pro suché a vlhké stélky lišejníků. Různá písmena v horním indexu označují statisticky významné rozdíly při $p \leq 0.05$.

Spektrální indexy	Stav stélky	Druh lišejníku					
		<i>Himantormia lugubris</i>	<i>Lecania brialmontii</i>	<i>Ramalina terebrata</i>	<i>Parmelia saxatilis</i>	<i>Placopsis antarctica</i> (řasa)	<i>Placopsis antarctica cephalodium</i>
NDVI	Suchý	0.329 ^a	0.213 ^a	0.212	0.152 ^a	0.033 ^a	0.190 ^a
	Vlhký	0.230 ^b	0.390 ^b	0.300 ^b	0.060 ^b	0.143 ^b	0.211 ^a
PRI	Suchý	-0.059 ^a	-0.038 ^a	-0.058 ^a	-0.061 ^a	0.003 ^a	-0.056 ^a
	Vlhký	-0.029 ^b	-0.039 ^a	-0.054 ^a	-0.075 ^a	-0.082 ^b	-0.077 ^b

Vliv nepřítomnosti horního kortexu na spektrální indexy odrazivosti

V textu disertační práce uvádím změny v NDVI, PRI související s přítomností / nepřítomností horního kortexu u lišejníků *Xanthoria elegans*, *Rhizoplaca melanophthalma*, *Leptogium puberulum*, *Physconia muscigena* a sinice *N. commune*. Experimentální odstranění

horního kortexu vedlo ke zvýšení hodnoty NDVI v celém rozsahu RWC ve vysychajících stélkách (RWC od 100 do 0 %) výše uvedených lišejníků. Tvary závislostí NDVI na RWC pro konkrétní druhy byly srovnatelné s výsledky předchozí studie (Barták et al. 2018b). Totéž platilo pro průběhy PRI. Pro *X. elegans*, nicméně, mírně vyšší hodnoty (o 0.40) byly nalezeny než v předchozí studii (asi 0.36). U lišejníku *L. puberulum* byl zaznamenán rychlý pokles PRI (Barták et al. 2018b) ve vysychajících stélkách, a to v rozsahu RWC od 10 do 0 % (viz obr. 18).

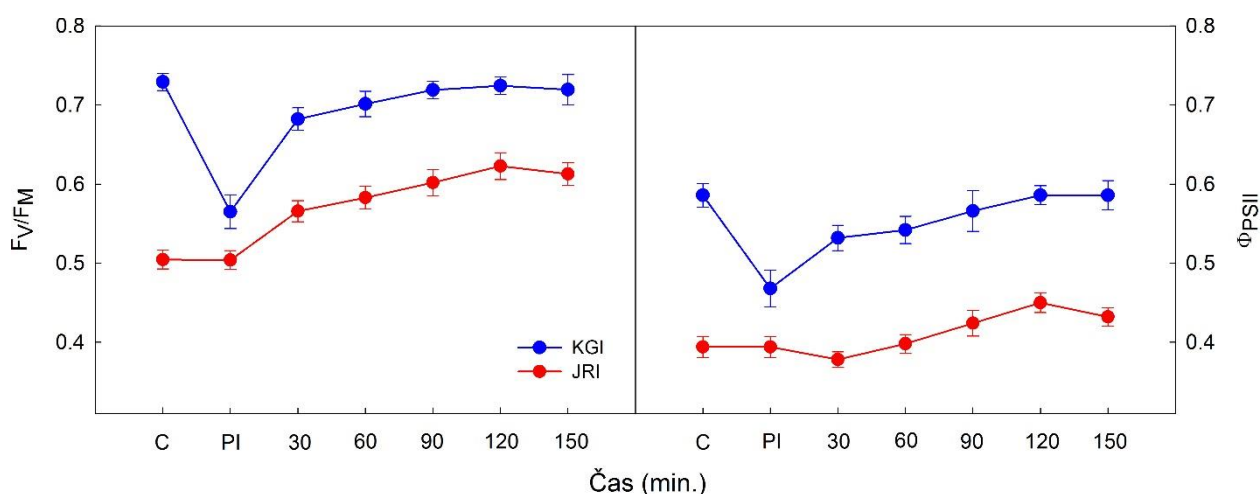


Obrázek 18. Normalizovaný Diferenční Vegetační Index (NDVI) (horní panel) a Fotochemický index odrazivosti (PRI) (dolní panel) v závislosti na relativním obsahu vody (RWC) u 5 experimentálních druhů lišejníků (upraveno dle Orekhova et al. 2018a).

3.2. Experiment 2 – Odolnost *Sanionia uncinata* vůči fotoinhibici: Analýza parametrů fluorescence chlorofylu

Kautského kinetika a související parametry po fotoinhibici

ChlF parametry citlivě reagovaly na experimentálně navozenou fotoinhibici, a to změnami ve funkci PSII (obr. 19). Rovněž v průběhu zotavení se z fotoinhibice reagovaly velmi citlivě. U *S. uncinata* z ostrova krále Jiřího (KGI) vykazovaly hodnoty F_V/F_M a Φ_{PSII} pokles vyvolaný fotoinhibicí a poté rychlé zotavení (obr. 19). Plná obnova (angl. *Recovery*) primárních fotochemických procesů byla dokončena za 90 min. po ukončení fotoinhibičního ovlivnění. Hodnoty F_V/F_M a Φ_{PSII} před fotoinhibicí byly vyšší u *S. uncinata* z KGI než u *S. uncinata* z JRI. Lze tedy dospět k závěru, že *S. uncinata* je vysoce odolná vůči fotoinhibici v plně hydratovaném stavu (více viz Diskuse).

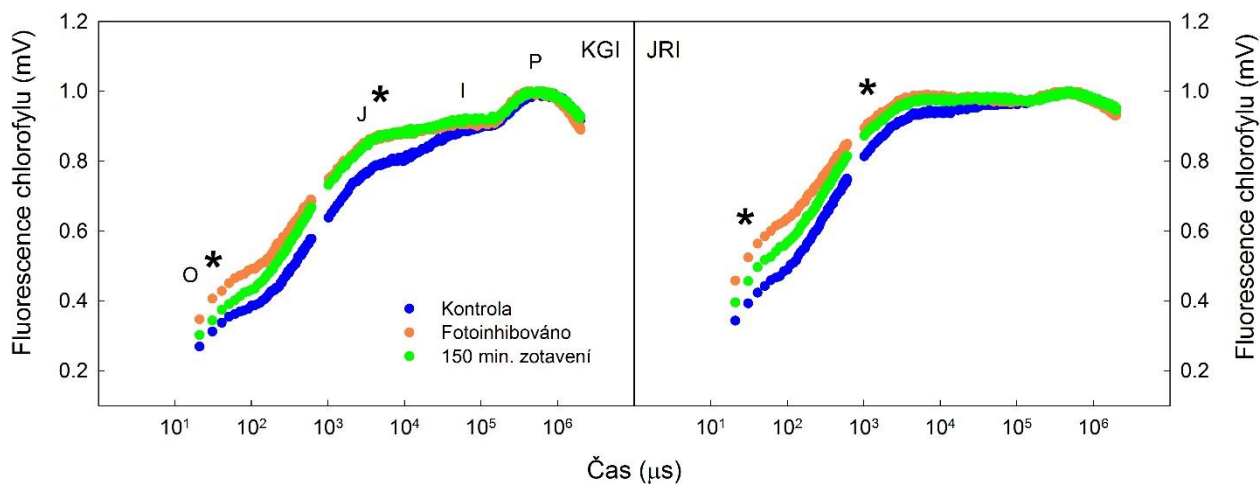


Obrázek 19. Časové průběhy parametrů ChlF zaznamenané během 150 min. zotavení po fotoinhibici ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR po dobu 1 h) u *Sanionia uncinata*. Klíč k symbolům: F_V/F_M – potenciální výtěžek fotochemických fotosyntetických procesů v PS II, Φ_{PSII} – efektivní výtěžek fotochemických fotosyntetických procesů v PS II. Zkratky: KGI – ostrov krále Jiřího, JRI – ostrov Jamese Rossa (upraveno dle Orekhova et al. 2021b).

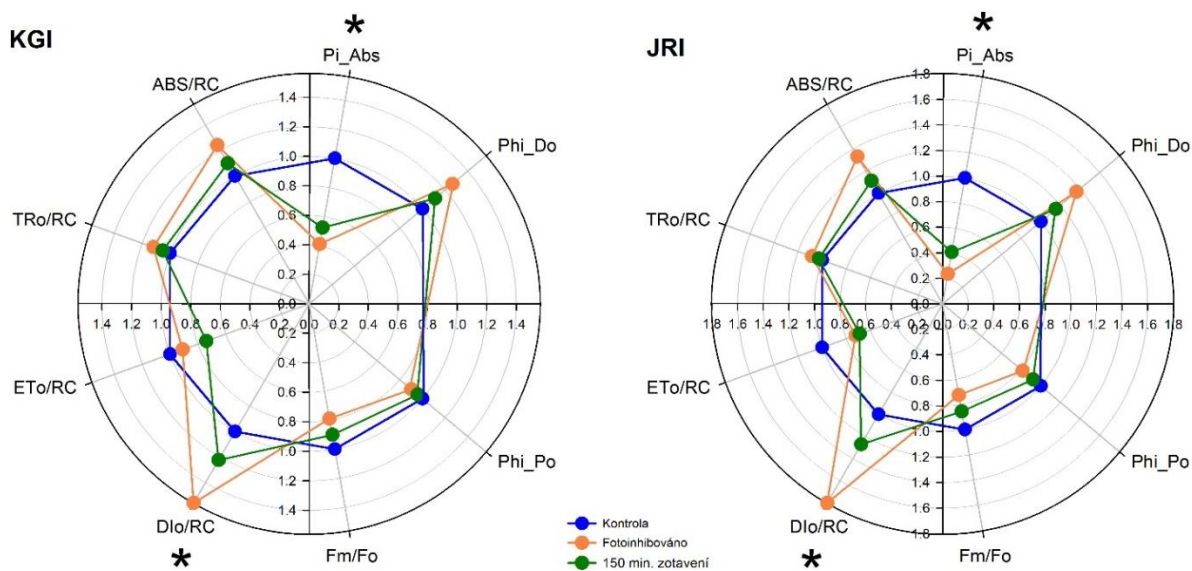
Parametry odvozené z křivky OJIP

Fotoinhibiční ovlivnění vedlo ke změnám tvaru OJIP křivky, zejména k relativnímu zvýšení bodů J a I na OJIPových křivkách (obr. 20). V následných 150 min po fotoinhibičním ovlivnění ChlF v bodě J a I však vykazovaly pouze částečné zotavení na úroveň před začátkem fotoinhibičního ovlivnění. Fotoinhibice vedla ke snížení hodnot mnoha parametrů ChlF odvozených z OJIP křivky (viz obr. 21). Jednalo se o parametry jako např. index vitality (angl. *performance index* – Pi_{Abs}), ET_0/RC – fotosyntetický transport elektronů na reakční centrum (RC). Fotoinhibicí indukované negativní změny v PSII vedly ke zvýšení hodnot Di_0/RC – tepelné disipace na RC, Φ_{D_0} účinnosti

tepelného rozptylu, ABS/RC – absorpce na reakčních centru (RC) a TR0/RC – rychlost zachycení na RC. Všechny parametry vykazovaly částečné zotavení, nicméně Pi_Abs a ET₀/RC zůstaly inhibovány i po 150 min. zotavení.



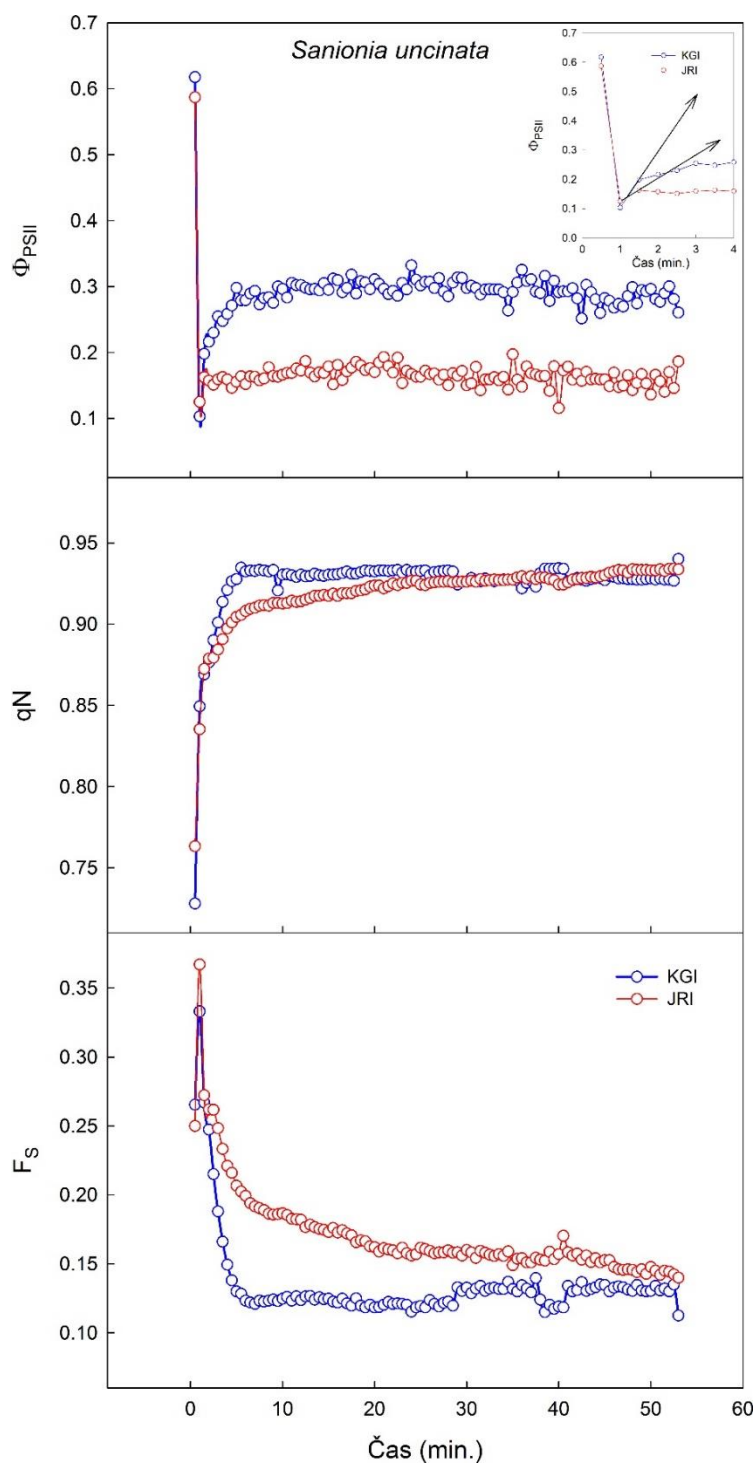
Obrázek 20. Rychlé indukční kinetiky ChlF (OJIP) měřené před, bezprostředně po, a během zotavení po fotoinhibici (normalizované údaje na maximální fluorescence dosaženou v bodě F_P). Nejcitlivější parametry k fotoinhibici jsou označeny * (upraveno podle Orekhova et al. 2021b).



Obrázek 21. Radar Plot rychlých parametrů ChlF měřených před, bezprostředně po fotoinhibici a po 150 min. zotavení. Parametry jsou (1) Pi_Abs, index vitality, (2) Phi_D₀, kvantový výtěžek disipace energie, (3) Phi_P₀, pravděpodobnost, že se excitační energie používá pro elektronový transport za Q_A, (4) F_M/F₀, poměr maximální a minimální fluorescence chlorofylu po adaptaci ve tmě, (5) D_{l0}/RC, tepelná disipace excitační energie, (6) ET₀/RC, rychlost elektronového přenosu na RC, (7) TR₀/RC, zachycený energetický tok na RC a ABS / RC, počet aktivních PSII na reakční centra (upraveno dle Orekhova et al. 2021b).

Časná fáze fotoinhibice

Během prvních 10 s po zahájení fotoinhibičního ovlivnění, klesly hodnoty Φ_{PSII} z počáteční hodnoty (KGI: 0.62, JRI: 0.58) na minimum v hodnotě 0.1 (obr. 22).



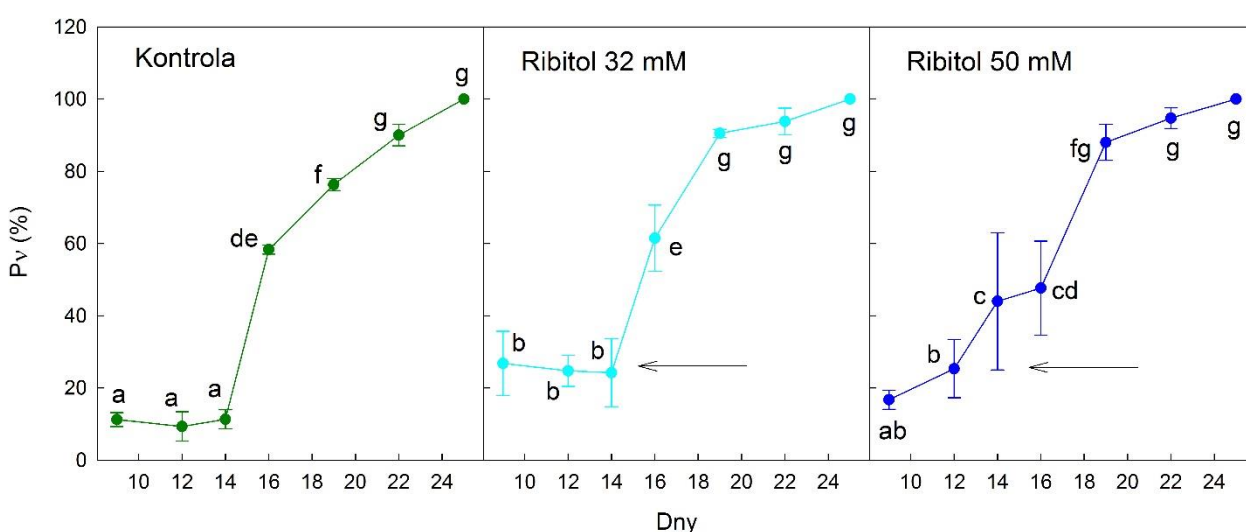
Obrázek 22. Odezva parametrů ChF (Φ_{PSII} – efektivní výtěžek fotochemických fotosyntetických procesů v PSII, F_s – rovnovážná fluorescence chlorofylu, q_N – nefotochemické zhášení) na fotoinhibici ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR 1 h). Čas v logaritmickém vyjádření (upraveno dle Orekhova et al. 2021b).

V průběhu pokračujícího fotoinhibičního ovlivnění se hodnoty Φ_{PSII} zvyšovaly první 4 min. křivkovým způsobem a pak dosáhly více či méně konstantní hodnoty pouze s mírným poklesem zaznamenaným ke konci fotoinhibičního ovlivnění (vzorky z KGI).

Oproti tomu, vzorky z JRI vykazovaly pouze omezený nárůst na přibližně 0.16, který zůstal nezměněn během celé doby fotoinhibice. Rychlost zvýšení Φ_{PSII} od časného minima zaznamenaného během prvních 5 min. fotoinhibice, se lišily mezi vzorky KGI a JRI (viz směrnice na vloženém obrázku na obr. 22). Vzorky z KGI měly vyšší rychlost zvýšení Φ_{PSII} (0.190) než vzorky z JRI (0.075). Tyto dynamické změny Φ_{PSII} , které byly zaznamenány během prvních 5 min fotoinhibičního ovlivnění byly doprovázeny nárůstem qN , který byl aktivován rychleji a ve větší míře u mechu z KGI než z JRI. Podobně se F_S snížila v průběhu fotoinhibičního ovlivnění ve vzorcích KGI rychleji než ve vzorcích JRI.

3.3. Experiment 3 – Šokové zmrazení a životaschopnost buněk sledovaná pomocí fluorescence chlorofylu

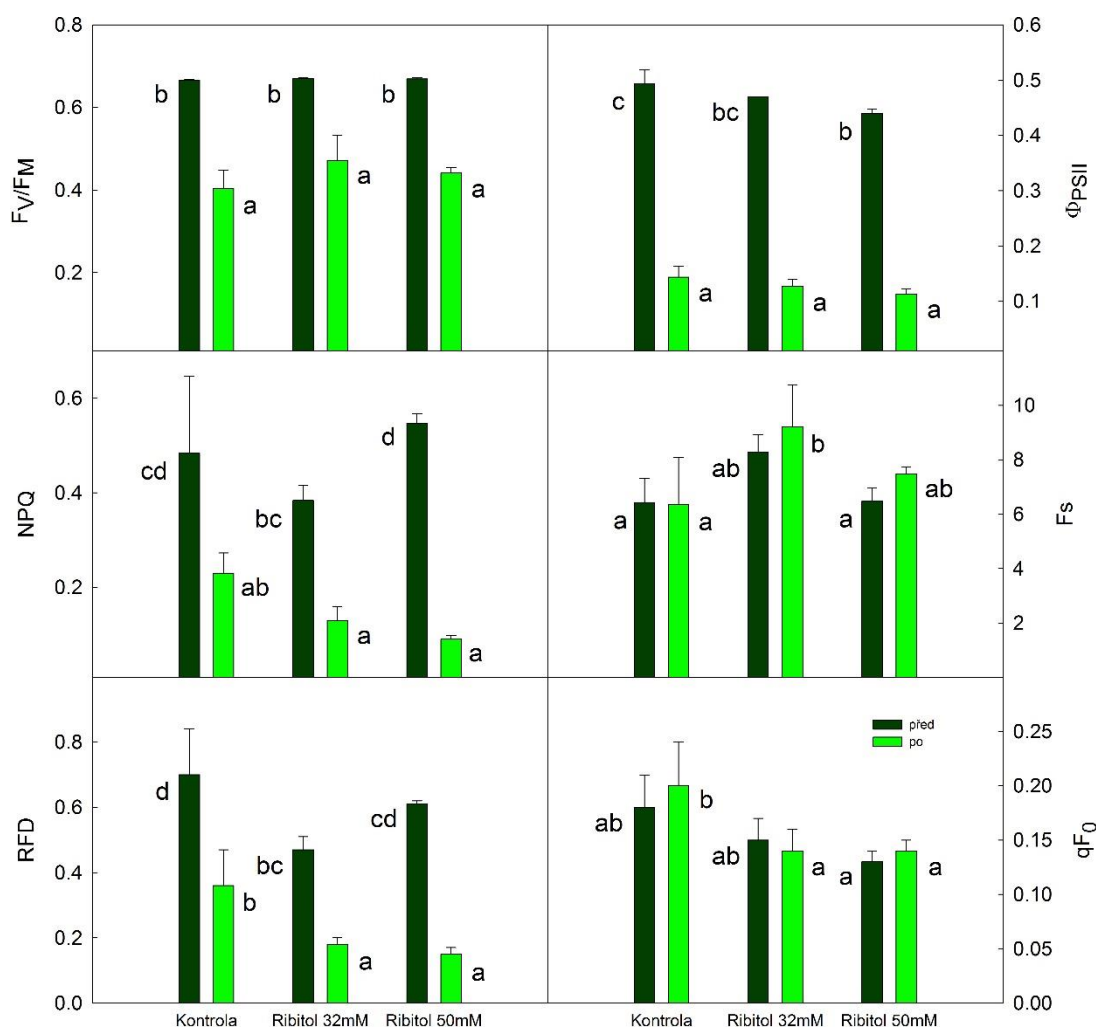
Změny v životaschopnosti *Heterococcus* sp. P_v (definována jako podíl živých k odumřelým buňkám) měly výraznou časovou dynamiku (obr. 23). Hodnoty P_v se zvyšovaly s dobou kultivace po šokovém zmrazení, následném rozmrazení kultur a růstu na agaru. Růst hodnot P_v byl zaznamenán po 14 dnech kultivace a vykazoval charakter *S-křivky*. Během prvních dvou týdnů kultivace vyvolal externě přidaný ribitol statisticky významné zvýšení hodnot P_v , zatímco po 19. dnu nebyly pozorovány žádné rozdíly mezi kontrolou a kulturou s přídavkem ribitolu.



Obrázek 23. Životaschopnost P_v *Heterococcus* sp. v reakci na dobu kultivace na BBM agaru. Den 0 představuje okamžik inokulace *Heterococcus* sp. na agar po předchozím rychlém zmrazení. Pozitivní účinek přidání ribitolu na hodnoty P_v je indikován šipkami pro 14. den (upraveno dle Orekhova et al. 2018b).

Přímý účinek rychlého zmrazení na primární procesy fotosyntézy byl zkoumán v kultuře *Heterococcus* sp. pomocí fluorescence chlorofylu měřené před a bezprostředně po zavedení do tekutého dusíku.

Potenciální (F_V/F_M) a efektivní kvantový výtěžek (Φ_{PSII}) fotosyntetických procesů v PSII se dramaticky snížily ve zmrazené kultuře, avšak zachovaly si nadnulovou hodnotu. Byl zaznamenán výraznější pokles hodnot Φ_{PSII} než F_V/F_M (obr. 24).



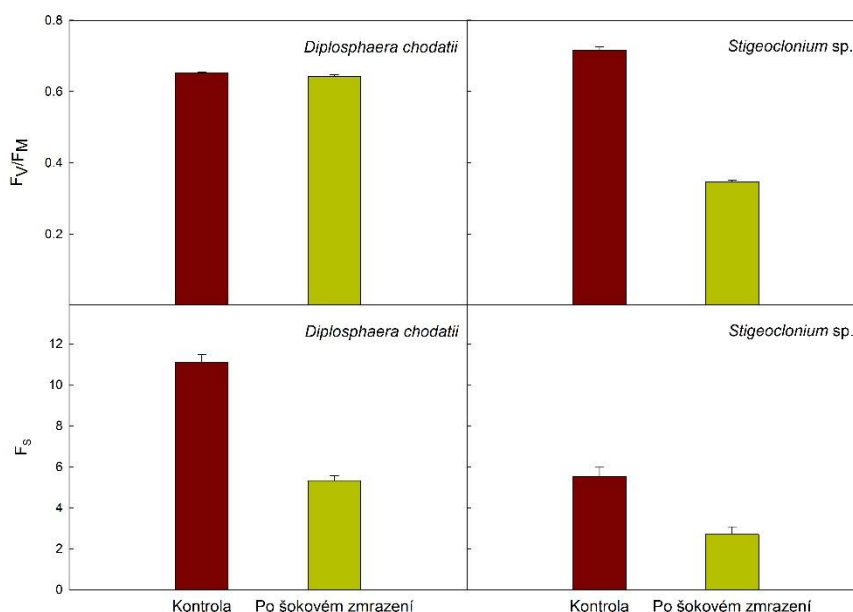
Obrázek 24. Fluorescenční parametry měřené v kultuře *Heterococcus* sp. před a po šokovému zmrazení v kapalném dusíku. Údaje jsou uvedeny pro kontrolu (bez přidání ribitolu) a vzorky s přidáním ribitolu (v koncentraci 32 mM a 50 mM ribitolu) (upraveno dle Orekhova et al. 2018b).

Nebyl pozorován žádný přímý účinek přidavku ribitolu, protože F_V/F_M a Φ_{PSII} klesly v podobné míře jako u neovlivněné kontroly. Rychlé zmrazení rovněž vyvolalo negativní změnu Rfd. Snížil se na 51.5 % počáteční hodnoty v kontrolní skupině (bez přidavku ribitolu), dále pak

o 38.3 % a 24.6 % v kulturách s 32 mM- a 50 mM- přidavkem ribitolu. Nefotochemické zhášení (NPQ) se ve zmrazené kultuře do značné míry snížilo, výrazněji v kultuře ovlivněné 50mM ribitolem, a to na 16.5 % původní hodnoty. F_S v rovnovážném stavu ve zmrazené kultuře nevykazovala žádnou změnu (kontrola) nebo mírný nárůst (kultura ovlivněná ribitolem). Hodnoty zhášení základní fluorescence chlorofylu (qF_0) zůstaly šokovým zmrazením nedotčeny. Hodnoty qF_0 však byly v kultuře s přidáním ribitolu mnohem nižší než u kontroly.

Účinek šokového zmrazení na následný růst antarktické vláknité (*Stigeoclonium sp.*) a kokální řasy (*Diplosphaera chodatii*) na agarových deskách

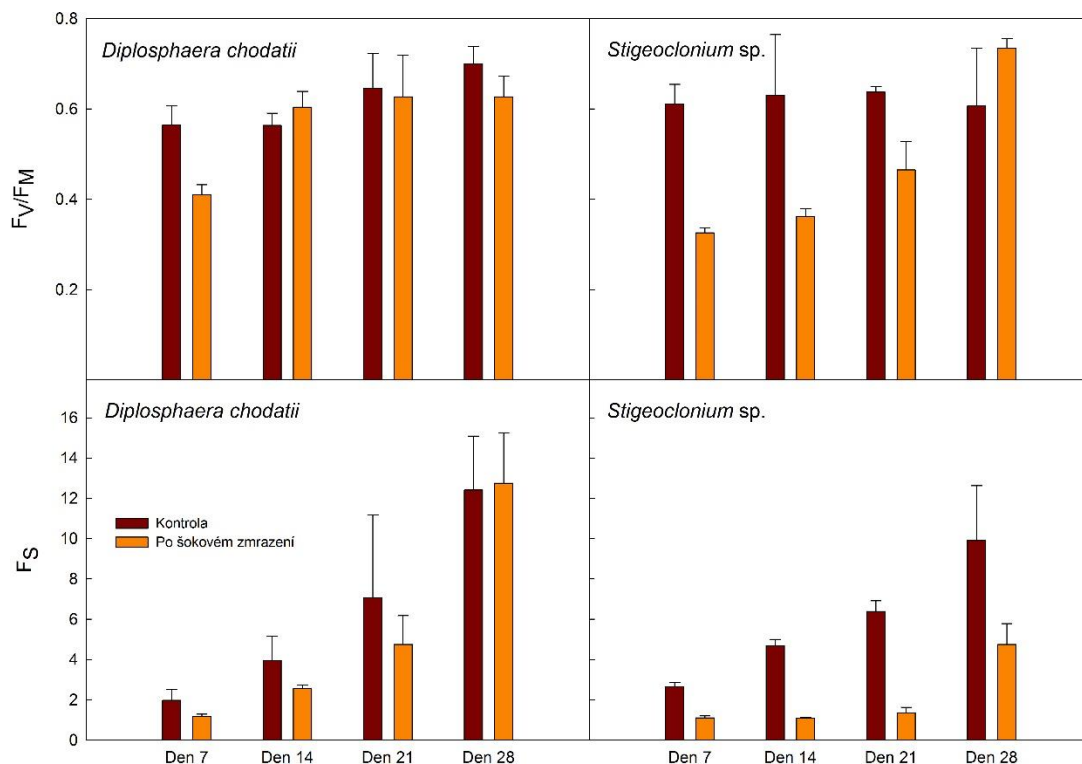
Přímé účinky zmrazení v kapalném dusíku se projeví ve změně hodnot ChlF parametrů zaznamenaných bezprostředně po rozmrazení vzorků (v kapalném médiu). Navzdory skutečnosti, že většina buněk byla zničena šokovým zmrazením, zůstal potenciál fotochemických procesů v PSII (F_V/F_M) konstantním u řasy *D. chodatii* (obr. 25). Tento fakt podporuje hypotézu o vysoké odolnosti tohoto druhu vůči mrazícím/rozmrazovacím cyklům a schopnosti přežít buněk, za částečného zachování schopnosti uskutečňovat fotosyntetické procesy související s PSII. Řasa *Stigeoclonium sp.* vykazovala oproti *D. chodatii* šokově podmíněný pokles hodnot F_V/F_M . Šokové zmrazení mělo důsledek zničení většiny buněk řas. Přeživší buňky však byly schopny obnovovat své metabolické procesy, a byly schopny obnovit plnou fotosyntetickou kapacitu fotochemických procesů v řádu týdnů po šokovém zmrazení (Orekhova et al. 2018b).



Obrázek 25. Účinky šokového zmrazení na hodnoty F_V/F_M (potenciální výtěžek fotochemických procesů v PSII) a F_S (rovnovážná fluorescence) (upraveno dle Orekhova et al. 2019).

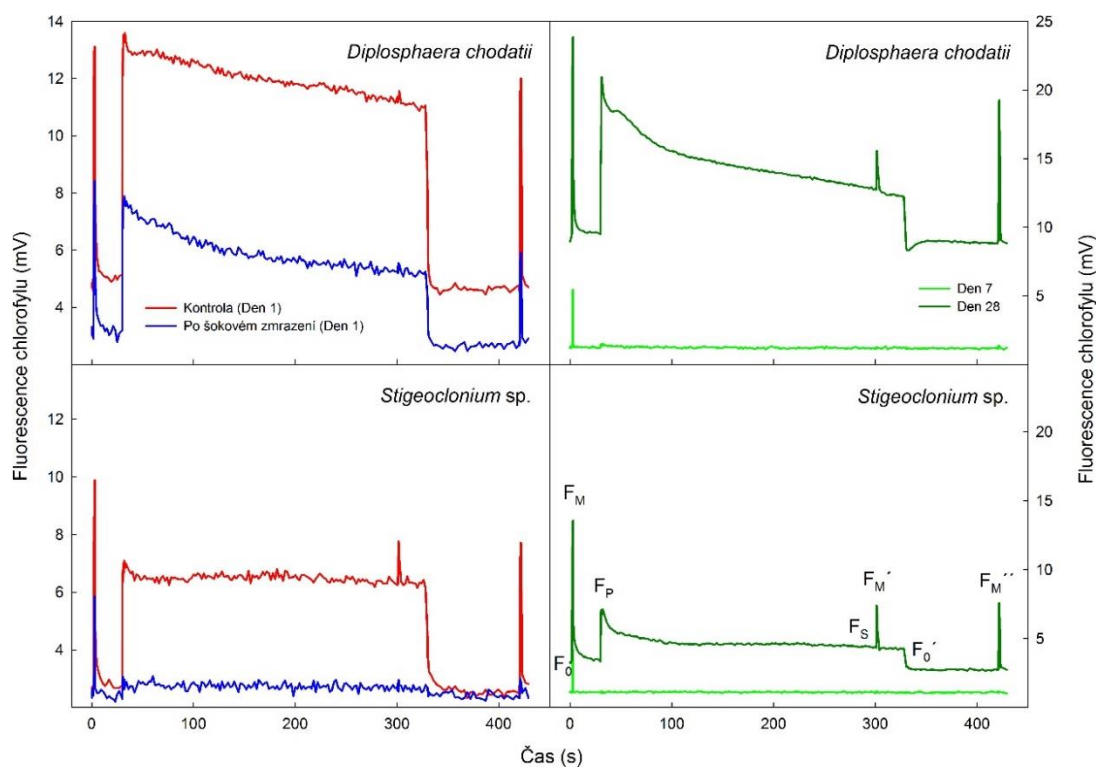
Destrukce buněk šokovým zmrazením byla dobře zdokumentována poklesem hodnot rovnovážné fluorescence chlorofylu (F_S), které jsou považovány za ekvivalent množství funkčních molekul chlorofylu v kultuře. Snížení F_S v důsledku šokového zmrazení dosáhlo 52 % (kontroly, tj. stavu před šokovým zmrazením) u *D. chodatii* a 51 % *Stigeoclonium sp.*

Během další kultivace na agaru bylo pozorováno zvyšování hodnot F_S (obr. 26).



Obrázek 26. Parametry F_v/F_m a F_S zaznamenané během růstu kultury po šokovém zmrazení *Diplosphaera chodatii* a *Stigeoclonium sp.* na agaru po dobu 28 dnů (upraveno dle Orekhova et al. 2019).

D. chodatii a *Stigeoclonium sp.* reagovali na šokové zmrazení také změnami ve tvaru Kautského kinetiky a hodnotami konkrétních ChlF signálů F_M , F_P , F_S , F_M' a F_M'' (viz obr. 27). Šokové zmrazení ničí většinu molekul chlorofylu, což má za následek celkový pokles signálu ChlF a změnu tvaru pomalé Kautského kinetiky.



Obrázek 27. Změny tvaru pomalé Kautského kinetiky ChlF zaznamenané v kulturách řas *Diplosphaera chodatii* a *Stigeoclonium sp.* kultivované v kapalném mediu BBM (levé panely, účinek šokového zmrazení). Kautského kinetiky zaznamenaný na začátku (7. Den) a na konci (28. Den) kultivace řas na agarových deskách (inokulovány šokově zmrazené vzorky) (upraveno dle Orekhova et al. 2019).

4. DISKUSE

Rehydratace u mechů a obnova fotosyntetických procesů

Většina mechorostů nemá morfologické nebo fyziologické mechanismy pro zadržování nebo řízení obsahu vody ve stélce. Jejich hydratační stav se tedy velmi rychle vyrovnává s vodním potenciálem prostředí. Rehydratace stélky může nastávat během několika minut, celkové obnovení buněčných funkcí je však delší proces, obvykle nastává během několika hodin (Csintalan et al. 1999). U studovaných druhů mechů je doba rehydratace (30 h pro maximální F_V/F_M) srovnatelná s jinými druhy mechů. Různí autoři ekofyziologických studií uvádějí druhově specifické doby rehydratace, a to: 1 h (Proctor et al. 2007), 16 h (Csintalan et al. 1999), 20 h (Nabe et al. 2007), 25 h (Nakaya a Saxena 2014). Tyto druhově specifické rozdíly lze přičíst zejména délce předchozího období fyziologické aktivity v hydratovaném stavu. Například Green et al. (2011b) informoval o rychlé obnově fotosyntetických procesů v mechu z kamenných povrchů (rychlá a opakující se hydratace/dehydratace). Oproti tomu mechy, které byly před vysušením dlouhou dobu vlhké, potřebovaly delší dobu k obnově svých fotosyntetických procesů. Tento závěr lze podpořit výsledky, které získali Stark et al. (2013) v experimentu uskutečněném na pouštním mechu. Tito autoři uvádějí, že rychlost předchozího vysychání může ovlivnit následnou rehydrataci stélky: u rychle vyschlých stélek trvala následná rehydratace a obnovení hodnot F_V/F_M 72 h, zatímco u pomalu vyschlých stélek byla následující rehydratace velmi rychlá (8 h). Vzhledem k tomu, že dva antarktické mechy používané v naší studii procházejí poměrně rychlým vysušením v terénu (díky společnému působení rychlosti větru a teploty), můžeme dobu rehydratace zjištěnou v naší studii (32 h) připsat jejich ekofyziologické strategii související s lokalitou. V tomto pojetí je tolerance obou druhů mechů vůči vysychání závislá na rychlosti dehydratace. Nedávná studie Pizzaro et al. (2019) přinesla poznatek, že asi 40 h bylo dostatečně dlouhou dobou nezbytnou pro obnovení účinnosti PSII u rehydratovaného mechu *Sanionia uncinata* z ostrova krále Jiřího, Antarktida.

Svou roli mohou hrát také faktory prostředí, jako je množství světla a teplota během rehydratace. Tyto faktory působí současně navíc jak fotosyntéza, tak dýchání obnovované během období rehydratace jsou závislé na světle a teplotě. Li et al. (2014) dokumentoval obrovský rozdíl v době rehydratace v *Bryum argenteum* na světle (3 h) a ve tmě (24 h). V našich experimentech, se primární fotosyntetické procesy (F_V/F_M a Φ_{PSII}) poměrně rychle obnovily v plném rozsahu (32 h). Navíc hodnoty F_V/F_M a Φ_{PSII} získané v průběhu rehydratace byly spolu velmi dobře

korelovány, což znamená, že při hydrataci stélky a ve stadiu obnovy buněčných funkcí byly dobře propojeny potenciální i skutečné primární fotosyntetické procesy v PSII.

Průběh NPQ během rehydratace *B. austro-glareosum* vykázal dvě srovnatelně vysoká maxima následovaná poklesem (obr. 11). Tento jev je srovnatelný s údaji uvedenými ve studii Csintalan et al. (1999). Tito autoři zjistili nárůst následovaný poklesem během první hodiny. Naše údaje ukazují, že tento pokles trvá nejméně 9 hodin. Následující zvýšení NPQ zjištěné v období rehydratace (24-27 h) lze přičíst ochraně PSII během konečného obnovení plné funkčnosti (viz F_V/F_M a Φ_{PSII} chody mezi 24 a 27 h). Průběh NPQ během rehydratace je však ovlivněn komplexem faktorů, které se mohou vzájemně ovlivňovat a způsobovat dynamicky se měnící tvar křivky závislosti NPQ na době rehydratace. Například doba rehydratace potřebná pro konečné ustálení NPQ se liší podle druhu a odráží zvláštnosti experimentálního uspořádání. Může to být jak velmi krátký čas, např. 1 h (Csintalan et al. 1999 pro *Rhytidiadelphus loreus*) nebo může být tato fáze dokončena až po 8 h (Mayaba et al. 2002 pro *Atrichum androgynum*).

Parametry fluorescence chlorofylu během vysychání mechů

Dehydratace buněk stélky mechů vede k poklesu všech fyziologických procesů včetně fotosyntézy. U mechů je fotosyntéza negativně ovlivněna rychlým poklesem obsahu vody ve stélce (Cui et al. 2009). Bylo prokázáno, že fluorescenční měření (jak parametry indukované fluorescence chlorofylu *in vivo*, tak hodnoty emitované fluorescence chlorofylu) korelují s celkovým stavem fotosyntetického aparátu rostliny (Maxwell a Johnson 2000; Lamberts et al. 2008). Pro mechy bylo prokázáno, že maximální kvantový výtěžek PSII (F_V/F_M) i rychlost transportu elektronů (ETR) klesá s poklesem obsahu vody ve stélce (Proctor 2010). Naše experimenty tyto skutečnosti plně potvrzují (viz obr. 14).

Změna rychlosti poklesu F_S zjištěná během vysychání v relativním obsahu vody RWC ve výši 45 % (*B. austro-glareosum*) a 18 % (*B. pseudotriquetrum*) (obr. 13), by mohla být přičítána časnému stadiu dehydratace a jejím negativním účinkům na primární fotosyntetické procesy. U obou druhů lze pokles F_S v hodnotách RWC pod 40 % přičíst postupnému transportu vody z buněk, dehydratací-indukované změně funkčnosti chlorofylů a následnému poklesu signálu ChlF. Pokles F_S zjištěný u experimentálních druhů je srovnatelný s údaji zjištěnými pro *Rhizomnium punctatum*, *Pellia endiviifolia* (Giudici et al. 2018, 20 % RWC). Podobně Yamakawa et al. (2012) uvádí pokles hodnot F_S s postupnou dehydratací u druhu *Rhytidium rugosum*. Některé druhy mechů však nevykazují pokles F_S během vysychání (RWC klesá ze 100 na 0 %) –

Palustriella commutata, *Rhytidiadelphus squarrosus* (Giudici et al. 2018). Přesný důvod konstantních hodnot F_S během vysychání mechu zůstává dosud nejasný. Typickým projevem emitované fluorescence chlorofylu z vysychající stélky mechu je, že zejména ve vyšším stupni vyschnutí se ztrátou vody ze stélky, hodnota F_S klesá. Je to způsobeno tím, že nefotochemické zhášení se zvyšuje s vysycháním (Barták et al. 2021), celkový ChlF signál klesá. To bylo prokázáno také u našich experimentálních druhů mechů (*B. austro-glareosum* a *B. pseudotriquetrum*), a to rozborem rychlostí poklesu F_S během vysychání při RWC v rozmezí 30-40 % (viz obr. 13). Kromě F_S se u vysychajících stélek mechů snižuje i hodnota bazální fluorescence chlorofylu (F_0). Například pokles hodnot F_0 v lišejníku vyvolaný dehydratací je připisován změnám optických vlastností horního kortexu (Gauslaa a Solhaug 2001) a zvýšené disipaci absorbované excitační energie ze světlosběrných komplexů (Komura et al. 2010; Wieners et al. 2012).

Křivka závislosti Φ_{PSII} na stupni dehydratace stélky ukázala, že došlo k podstatnému poklesu hodnot Φ_{PSII} u *B. austro-glareosum* (viz šipka na obr. 12) za vyšších RWC (23 %) než *B. pseudotriquetrum* (14 %). Mezidruhové rozdíly v poklesu Φ_{PSII} jsou zcela zřejmé. Již dříve různí autoři zjistili druhová specifika tohoto poklesu (např. Deltoro et al. (1998a), a to zejména pro mechy ze suchého prostředí. Autoři vzhledem k vysychání stélky rozdělili mechy na druhy citlivé (*Leucodon sciuroides*, RWC 30 %) a rezistentní (*Orthotrichum cupulatum*, 5 % RWC). Titíž autoři uvádějí mnohem vyšší hodnoty RWC (10-40 % RWC), ve kterých dochází k poklesu hodnot Φ_{PSII} pro mechy z vlhkého a středně vlhkého prostředí. Proctor et al. (2007) například uvádí tuto hodnotu RWC až 75 % pro *Polytrichum formosum* z vlhkého místa (Exeter, Spojené království). Z našich údajů o Φ_{PSII} tedy vyplývá, že *B. austro-glareosum* a *B. pseudotriquetrum* lze považovat za odolné vůči suchu (z antarktických polopoušťových podmínek), neboť oba druhy vykazovaly mnohem nižší hodnotu RWC, ve které byly zaznamenány první projevy poklesu hodnot Φ_{PSII} .

Dehydratační křivky Φ_{PSII} tedy umožnily klasifikovat oba experimentální druhy z hlediska tolerance k vysychání. Většina mechů je, podobně jako *B. austro-glareosum* a *B. pseudotriquetrum*, považována za odolné vůči vysychání, nicméně existují druhy citlivé na dehydrataci. Marschall et al. (2018) na základě své studie rozdělují mechy na druhy snášející vysychání (*Porella platyphylla*) a druhy citlivé na vysychání (*Sphagnum angustifolium*). V našem experimentu podporuje zařazení druhů *B. austro-glareosum* a *B. pseudotriquetrum* mezi rezistentní analýza hodnot $RWC_{0.5}$, tj. RWC, při kterém vzorek vykazoval polovinu maximálního Φ_{PSII} . Hodnota $RWC_{0.5}$ u druhu *B. austro-glareosum* dosáhla 12.6 % a u vysoce snášenlivého druhu *B. pseudotriquetrum* 9.8 % RWC. Pojem druhově specifické tolerance u jednotlivých druhů mechů

k vysychání však není obecně platný, protože existuje mnoho vzájemně se ovlivňujících faktorů. Patří mezi ně jak fenotypová (Proctor et al. 2007), tak ekotypová plasticita druhu, fyziologická "historie" vzorku, variabilita vlivu mikroklimatických faktorů (teplota, světlo), rychlost vysychání/rehydratace, četnost vysychacích/rehydratačních cyklů, které mohou spolupůsobit a měnit toleranci/citlivost jednotlivých druhů mechů k vysychání. Přestože mnoho ochranných mechanismů mechorostů je společných s vyššími rostlinami, existují zásadní rozdíly v jejich aktivaci a působení v průběhu vysychání stélky. Mechanismy mohou být rozděleny do dvou skupin, první se týká chloroplastového aparátu a účinného zhášení absorbované zářivé energie, druhá se týká komplexní buněčné reakce na dehydrataci. Posledně jmenovaná v sobě zahrnuje celou řadu biochemických reakcí, jako je například akumulace sacharózy, syntéza antioxidantů (např. glutathion), tak i reakcí na proteinové úrovni, například syntéza stresových proteinů a dehydrinů (pro mechy zkoumané v práci Proctor et al. 2007).

Během dehydratace se v mechu aktivuje několik ochranných mechanismů, které byly podrobně popsány v Úvodu. Uvedené mechanismy se podílejí na ochraně PSII a projevují se jako zvýšení hodnot nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu qN (NPQ) během vysychání. Naše údaje zjištěné pro experimentální druhy mechů takovou interpretaci podporují, protože qN mělo tendenci se zvyšovat (exponenciálně nebo podle *S-křivky*), a to u hodnot RWC pod 50 % (*B. austro-glareosum*) a 15-30 % (*B. pseudotriquetrum*).

Kromě tří základních mechanismů tvořících součásti nefotochemického zhášení (qE, qT, qI) se na ochraně fotosyntetického aparátu mechů během vysychání podílí několik antioxidantních substrátů a enzymů (askorbát (ASC) – Paciolla a Tommasi (2003), askorbát peroxidasa a POD – Seel et al. (1992b), Pizarro et al. (2019)). Obecně platí, že mechy mají dva typy antioxidantních ochranných mechanismů (Chobot et al. 2008). První typ odstraňuje nebo redukuje volné radikály, včetně enzymů a antioxidantů – SOD, POD, vitamín C, glutathion (GSH) (Zhang et al. 2017) a zeaxanthin (Deltoro et al. 1998b, Nabe et al. 2007). Druhý typ produkuje antioxidanty, jako jsou GR a APX (Oliver et al. 2005).

Parametry fluorescence chlorofylu během vysychání lišejníků

Výsledky ukazují, že antarktické lišejníky mají velkou toleranci primárních fotosyntetických procesů k vysychání, protože všechny druhy vykazovaly pokles F_v/F_m (Barták et al. 2021) a Φ_{PSII} při nízkých hodnotách RWC, a to pod 20 až 30 %. To je podobné jako u tolerantních lišejníků, například u *Cladonia borealis* (Cho et al. 2020). Nedávné studie podporují teorii, že

dostupnost kapaln vody je hlavním faktorem omezujícím fotosyntézu lišejníků (viz Uchida et al. 2006). U vch experimentálních druh byly hodnoty Φ_{PSII} poměrně konstantní při mrnm a stedn silnm vysychání stélky, tedy v rozmezí od 100 % do 30 % RWC (obr. 12). Kromě *L. brialmontii* a cefalodia *P. antarctica* obsahujícího *Nostoc* sp. (viz vloen obrázky v obr. 12), hodnoty Φ_{PSII} nevykazovaly žádnou změnu nebo pokles, když RWC poklesla ze 100 % na 30 %. Mrn zvyen Φ_{PSII} u *L. brialmontii* a cefalodia *P. antarctica*, kter bylo zjieno s vysycháním od 100 % do 30 % RWC, lze pcst omezen difuzi CO₂ do stélky ve vlhkm stavu. Tento jev je způsoben exopolysacharidovmi obálkami buněk sinic, kter ve vlhkm stavu představují fyzickou bariéru pro přenos molekul CO₂ z vnějšího postedi dovntr stélky. Proto jsou fotosyntetick procesy v pln hydratovaných stélkách lišejníků s cyanobakterilnm partnerem omezeny a zvyšují se s částečnou dehydrataci, jak ukazují například kolonie *Nostoc commune* (Trnková a Barták 2017). Avšak pod 30 % RWC lze u dvou druhů (*P. antarctica* a *L. brialmontii*) pozorovat rozdíly v poklesu hodnot Φ_{PSII} , kter souvisejí se stanovitm jednotlivých druhů. Vzhledem k místním podmínkám a morfologii stélky je nejcitlivější na vysychání druh *Placopsis antarctica*, kter roste na kamenech ve vlhkm postedi, jak ukazuje Casanova-Katny et al. (2019), následuje *Lecania brialmontii*, kter roste ve shlukovitch útvarech na pobřežních skalách s odtokem vody a vysokou vlhkosti. Proto u *L. brialmontii* dochzi k pomalemu poklesu Φ_{PSII} . To bylo zjieno v podobných morfologických uspoadnch, například v antarktckch poltrovch mech (Zniga-González et al. 2016), kde jednotliv exemplre ztrácejí vodu rychleji než poltrov forma. Menší pokles Φ_{PSII} byl zjien u *R. terebrata*, kter roste na vch skalách, kter jsou vystaveny větru. Na druh straně, dva druhy, které vykazovaly nejv toleranci věci suchu, mreny fluorescennmi parametry, jsou *Parmelia saxatilis*, kter roste na skalách vystavených slunci a na suchých mstech, a druh *H. lugubris*, kter roste na kamenech v such oblastech, avšak tvor rozshl společenstva s jinými lišejníky s keříčkovitou morfologií stélky (Sancho et al. 2020). Chování *H. lugubris* je zajimav, protože analýza KK ukázala, že ChlF signál je nejinnj při nim RWC než 100 % (viz nie). Tento fakt bude předmětem dalšího zkoumni. Maximální hodnota Φ_{PSII} zjien pro *H. lugubris* byla srovnateln s hodnotou udanou Sancho et al. (2020) pro větve ed stélky téhož druhu. Opět jde o zajimav zjien, neboť lišejník *H. lugubris* vyniká velkou morfologickou variabilitou stélky a výzkum fyziologick (fotosyntetick) aktivity v různých formách/částech stélky bude předmětem dalšího výzkumu.

V cefalodiu *P. antarctica*, se hodnoty Φ_{PSII} zvýšily, když RWC poklesla z plné hydratace na 30 %. To bylo srovnatelné s křivkami odezvy téhož druhu na vysychání uváděné v dřívější studii (Barták et al. 2018b). Nárůst lze přičíst skutečnosti, že v koloniích vnitrostélkových cyanobakterií v lišejníku a specificky v koloniích *N. commune* je výměna plynu při vysokých hodnotách RWC omezena z důvodu vysoké resistance exopolysacharidových obalů buněk vůči transferu molekul CO_2 do buněk. S dalším vysycháním (RWC pod 30 %) resistance těchto obalů klesá a dochází k dehydratací indukovanému zvýšení výměny CO_2 . Zároveň s tím dojde ke zvýšení hodnot ChlF parametrů souvisejících s fungováním PSII (Barták et al. 2018b; Trnková a Barták 2017).

Významný pokles F_V/F_M (Barták et al. 2021) a Φ_{PSII} (obr. 12) v hodnotách RWC pod 20-30 % byl zjištěn u pěti experimentálních druhů lišejníků a byl dobře zdokumentován (Barták 2014; Barták et al. 2015). Podobně, dřívější studie (Nayaka a Saxena 2014) uváděla rychlý pokles F_V/F_M u lišejníku, když se RWC snížila pod 20 %. Tyto změny naznačují závažné omezení funkce PSII u stélky lišejníku v konečné fázi vysychání. F_V/F_M dosáhl 10 % své maximální hodnoty při hodnotách RWC nižších než 10 %. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s údaji uvedenými pro tři druhy lišejníků z Norska (Hovind et al. 2020). To naznačuje, že lišejníky jsou schopny uskutečňovat primární fotochemické procesy fotosyntézy při velmi nízké hydrataci stélek.

Při dehydrataci stélek lišejníku dochází k nadměrné tvorbě ROS v PSII, což má za následek silný stres v PSII a snížení fotosyntetické účinnosti (pokles F_V/F_M a Φ_{PSII}). Vysoké hladiny ROS mohou být škodlivé nejen pro PSII, ale také pro základní biomolekuly, včetně nukleových kyselin, proteinů a lipidů (Kranner et al. 2008). Nedostatek molekul vody ve vysychajících lišejnících v kombinaci se slunečním zářením může navíc nadměrně excitovat RC PSII bez ohledu na nízké hodnoty aktuálního ozáření stélek (Heber et al. 2006b).

ETR křivky během dehydratace mechů

V našich experimentech, ETR v reakci na světlo klesá u silně vysušených mechů (viz obr. 14, RWC nižší než 20 %). To nasvědčovalo dehydratací indukovanému poklesu Φ_{PSII} , který byl zdokumentován u mechů (např. Proctor et al. 2007). Na ETR a tvar křivek v mechu však může působit a ovlivňovat několik dalších faktorů. Mezi nimi hraje důležitou roli záření a teplota, kterým byly vzorky před experimentem vystaveny a/nebo aklimatizovány. Griffin-Nolan et al. (2018) ukázali, že aklimatizace na nízké/vysoké světlo způsobuje rozdíly v ETR křivkách odezvy na záření. Podobně Schroeter et al. (2012) ukázal podstatný rozdíl mezi ETR křivkami zaznamenanými pro "slunečné" a "stínné" ekotypy *B. argenteum*. Peng et al. (2019) uvedl, že krátkodobý

účiněk vysokých hodnot záření vedl k celkovému zploštění ETR křivek (nižší ETR_{max}) u mechu *P. patens* v důsledku fotoinhibice. To zjištění bylo podpořeno i údaji Schroeter et al. (2012), kteří zdokumentovali 50 % snížení ETR_{max} ve stinném ekotypu *B. argenteum* ovlivněného vysokým světlem po dobu 6 h. Mezidruhové rozdíly zjištěné u α (počátečního stoupání ETR křivky) lze interpretovat jako vyšší využití absorbované světelné energie v primárních fotosyntetických procesech u *B. austro-glareosum* než u *B. pseudotriquetrum* v průběhu dehydratace. *B. austro-glareosum* však vykazoval rychlejší pokles ETR během vysychání (viz RLC křivky při 40 % RWC na obr. 14). Pro *B. pseudotriquetrum*, Kudoh et al. (2003) uvádí ETR_{max} 25, což je srovnatelné s našimi údaji.

Kautského křivka během vysycháním lišejníků

Naše údaje zjištěné o OPSMT tvaru KK jsou ve shodě s dřívější prací (Papageorgiu a Govindjee 2011), který přezkoumal hlavní rozdíly mezi "řasovou" a "cyanobakteriální" křivkou. Kromě *L. brialmontii* (plochá KK) vykazovaly plně ovlhčené lišejníky (RWC = 100 %) význačné body O, P, S, M a T (viz Barták et al. 2021), přičemž hodnota ChlF je v bodě P nižší než v bodě M. Pro vyšší rostliny a zelené řasy jsou však uváděny vyšší hodnoty P-S než hladiny M-T ChlF (Papageorgiou et al. 2007; Papageorgiu a Govindjee 2011) podobně jako u *P. antarctica* – řasová část (Barták et al. 2021). U KK zjištěných na stélkách lišejníků je však hodnota fluorescence v bodě P nižší než v bodě M poměrně častým jevem.

V *R. terebrata* (obr. 15), *H. lugubris*, *P. saxatilis* a *P. antarctica* (řasová část) vrchol M (viz Barták et al. 2021) měl tendenci klesat s klesajícími hodnotami RWC, což lze přičíst zapojení stavových přechodů (Papageorgiou et al. 2007). Jak bylo prokázáno v předchozí studii (Mishra et al. 2020), maximální hodnota M klesala s vyšší intenzitou záření. Studie uváděla pokles odpovídající nárůstu světelného záření ze 40 na 160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ u *Umbilicaria antarctica*. Stejná studie uváděla vyšší ChlF v bodě P než M pro *Dermatocarpon polyphyllizum* (c.f. *P. antarctica*, Barták et al. 2021). Navíc je poměr hodnot fluorescence chlorofylu P/M závislý na teplotě, protože tvar KK se liší při měření při různých teplotách v optimálně hydratovaném stavu stélky.

Změny v signálu ChlF v části PSMT jsou výsledkem kombinovaného účinku spolupůsobících fotochemických a nefotochemických procesů, které probíhají ve fotosyntetických membránách současně. Fotochemické zhášení způsobuje pokles ChlF v důsledku reoxidace Q_A fotosyntetickým elektronovým transportem. Zvýšením hodnot ChlF v SMT části KK vznikají

dalších maxima, což je způsobeno zejména stimulací temnotních reakcí Calvin-Bensonova cyklu fixace CO₂ v chloroplastech (viz Seaton a Walker 1990).

Nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu, které je aktivováno v průběhu ozáření vzorku, tedy v SMT části KK, je doprovázeno tvorbou transthylakoidního gradientu protonů, který je doprovázen poklesem pH v lumenu thylakoidu a aktivací tvorby zeaxanthinu (Noctor a Horton 1990) tvořících složku qE. Jde o takzvané energetické zhášení (qE). Dalšími složkami nefotochemického zhášení je zhášení související s přechodovými stavy (qT) a fotoinhibiční zhášení (qI). Ty přispívají k poklesu ChlF ve fázi SMT (Kodru et al. 2015).

Indexy spektrální odrazivosti u mechů a lišejníků

Hydratací indukované změny odrazivosti ve viditelné oblasti jsou způsobeny především vysokou absorpcí fotosyntetickými pigmenty. Studie Malenovský et al. (2015) uvádí, že odrazivost mechu v zelené a červené části spektra (tj. vlnové délky 530-600 nm) může být použita k odhadu obsahu pigmentů xanthofylového cyklu, které se mění během vysychání mechové stélky, jak uvádí Calatayud et al. (1997), Deltoro et al. (1999). Tato konverze violaxanthinu na zeaxanthin slouží jako část ochranných mechanismů aktivovaných mechem v reakci na dehydratací způsobený oxidační stres chloroplastů. Zvýšení poměru zeaxanthinu k celkovému množství pigmentů xanthofylového cyklu je typicky uváděno zejména u mechů exponovaných vysokému světelnému záření (fotoprotektivní mechanismus), ale bylo také zjištěno u mechů vystavených pomalému vysychání (Fernández-Marín et al. 2013). Srovnání křivek spektrální odrazivosti v rozmezí vlnových délek 650-680 nm odhalilo, že jak *B. pseudotriquetrum*, tak *B. austro-glareosum* měly vyšší odrazivost v suchém stavu, což je v souladu s údaji udávanými pro mechy Malenovským et al. (2015). Konkrétně u *B. pseudotriquetrum* byly nižší hodnoty odrazivosti pro suchý a vlhký stav zjištěny v 520 nm, podobně jako u Malenovského et al. (2015).

Je dobře prokázáno, že u poikilohydrických autotrofů vede dehydratace k významným změnám spektrální odrazivosti, zejména ve viditelné části spektra (380-720 nm) (Guyot 1990). Tyto změny přinášejí rovněž rozdíly v numerických hodnotách PRI a NDVI, které jsou druhově specifické a závislé na charakteru změn struktury a pigmentace mechu během vysychání. Naše údaje jsou dobře srovnatelné s NDVI (0.835) a PRI (-0.160) udávanými pro hydratovaný antarktický mech *B. pseudotriquetrum* (Lovelock a Robinson 2002). U částečně dehydratovaného mechu však může hrát roli několik vzájemně se ovlivňujících faktorů, včetně například pohybů fyloidů v průběhu dehydratace. Fyloidy mechu během vysychání nejen snižují fotosyntetickou

aktivitu, ale také procházejí změnami tvaru a geometrického uspořádání, tj. "zmenšování" a "stáčení", viz Zotz a Kahler (2007). Typicky dochází v průběhu vysychání stélek mechů k přimknutí jednotlivých fyloidů k podélné ose stélky. Tyto změny mají vliv také na spektrální křivky odrazivosti a hodnoty spektrálních indexů. Obecně platí, že vrchní část vlhkého mechového koberce s fyloidy odstávajícími od podélné osy stélky odráží výrazně více v blízké infračervené oblasti než suchý koberec (Malenovský et al. 2015). Zkroucené, objemově zmenšené stélky s přimknutými fyloidy v suchém mechu umožňují dopadajícím fotonům proniknout hlouběji do nitra mechového polštáře, kde jsou absorbovány níže položenými fyloidy.

Pokles hodnot NDVI a PRI vyvolaný dehydratací stélek mechů je uváděn u několika druhů rodu *Sphagnum*. Existují však podstatné rozdíly mezi jednotlivými druhy (Harris 2008). Podobně May et al. (2018) uvádějí pokles NDVI způsobený vysycháním u několika druhů mechů. Výsledky, získané v této oblasti přímými měřeními v terénu (Valøen 2019, Špicberky) potvrzují pokles hodnot NDVI ve stélkách arktických mechů vyvolaný dehydratací. Naše data podporují pokles NDVI při vysychání *B. pseudotriquetrum* a *B. austro-glareosum* (viz. obr. 16). Fyziologické důsledky poklesu NDVI způsobené dehydratací u mechů nejsou však dosud dostatečně známy. Nižší hodnoty NDVI a vyšší úrovně odrazivosti v červené části spektra při nízkém RWC mohou působit jako mechanismus minimalizující absorpci dopadajícího záření tak, aby se zabránilo další ztrátě vody vypařováním nebo buněčnému poškození (Charron a Quatrano 2009, Cruz de Carvalho et al. 2012). Souvislost hodnot NDVI a aktivace ochranných mechanismů se rovněž nabízí jako jedna z možností, protože u obou druhů studovaných mechů se nefotochemické zhášení (qN) zvýšilo při hodnotách NDVI pod 0.54, což ukazuje na zapojení tohoto ochranného mechanismu ve finální fázi vysychání stélky, tedy v nízkých hodnotách RWC (pod 20 %).

Hodnoty PRI však poklesly s vysycháním pouze v *B. pseudotriquetrum* (podobně jako v práci Harris 2008). *B. austro-glareosum* vykazoval bifázickou změnu PRI během vysychání (snížení následované zvýšením). Důvod tohoto chování zůstává neznámý. Podobná bifázická změna s poklesem RWC byla zjištěna např. u lišejníku (*Physconia muscigena*, Barták et al. 2018a). Pokles PRI přinesl jak nárůst (*B. pseudotriquetrum*), tak pokles (*B. austro-glareosum*) hodnot qN. Nelze proto najít přesný vztah mezi PRI a qN. Důvod těchto dvou protikladných odpovědí (viz Orekhova et al. 2021a) lze hledat ve skutečnosti, že PRI se choval u studovaných dvou druhů jinak v hodnotách RWC pod 30 %. V rozmezí RWC od 0 do 30 % PRI se zvyšoval s vysycháním u *B. austro-glareosum* a snižoval u *B. pseudotriquetrum*. Druhý typ reakce je, včetně nárůstu hodnot nefotochemického během vysychání stélek mechů, uváděn i pro *Sphagnum* sp. (Van Gaalen et

al. 2007). Podobně Rastogi et al. (2019) zjistil pokles PRI při vysychání mechů rodu *Sphagnum*, který souvisel se snížením indexu vitality (PI), parametru ChlF odvozeného z rychlé indukční křivky fluorescence chlorofylu (OJIP). Naše studie prokázala pokles PRI *Bryum pseudotriquetrum* s poklesem RWC. To naznačuje velký potenciál dalších návazných studií využívajících souběžná měření fluorescence chlorofylu a spektrální odrazivosti při analýze vztahu primárních fotochemických procesů fotosyntézy a spektrální odrazivosti v průběhu vysychání stélky.

Vzhledem k tomu, že nízká hodnota RWC dosažená ve finální fázi vysychání (pod 20 %) vedla u obou experimentálních druhů k nárůstu hodnot qN (nad 0.8), je možné usuzovat na zapojení mechanismu konverze pigmentů xanthofylového cyklu do ochrany vysychajícího mechu. Tyto změny, tj. zvýšení obsahu zeaxanthinu způsobené dehydrací (Deltoro et al. 1998b) a deepoxidační stav pigmentů xanthofylového cyklu (DEPS) jsou však spojeny s poklesem hodnot při vysychání (Gamon et al. 1990). Některé lišejníky a mechy nevykazují pokles PRI při nízkých hodnotách RWC během vysychání, což nastoluje otázku ohledně mezidruhových rozdílů v konstitutivním obsahu pigmentů xanthofylového cyklu. Zatímco většina mechů a lišejníků vykazuje pokles PRI s vysycháním stélek při nízkých RWC, existují určité výjimky (*B. austroglareosum* v této studii, *P. muscigena* – Barták et al. 2018b).

Spektrální indexy MCARI a GI vykazovaly pokles hodnot s poklesem RWC. Tato reakce je srovnatelná s údaji zjištěnými na vysychajících stélkách lišejníků (Barták et al. 2016). Proto lze očekávat, že MCARI index bude v budoucích studiích využíván jako indikátor stupně dehydratace stélky mechu. Vzhledem k tomu, že dehydratační křivky GI byly podobné průběhu NDVI v průběhu vysychání, může být Index "zelenosti" (GI) použit jako dobrý indikátor dehydratačního stavu mechu. Pro následné studie u mechů lze však doporučit analýzu několika souběžně měřených indexů spektrální odrazivosti, protože kromě stavu hydratace a obecných optických vlastností ve vlhkém a suchém stavu, umožňuje takový přístup rozlišit rozdíl v GI nejen pro různé druhy mechů, ale také pro další složky vegetačního krytu, jak ukazuje Erudel et al. (2017).

Spektrální vlastnosti mechu *Sanionia uncinata* a vybraných lišejníků v suchém a vlhkém stavu

Spektrální odrazivost mechu Sanionia uncinata v suchém a vlhkém stavu

Spektrální křivky odrazivosti vykazovaly rozdíl mezi vlhkým a suchým stavem. Spektra měřená ve vlhkém stavu dosahovala nižších hodnot než spektra získaná v suchém stavu. Rozdíl však nebyl příliš velký, nejvyššího rozdílu bylo dosaženo při vlnových délkách nad 700 nm. Parametry (indexy) spektrální odrazivosti vykazovaly rovněž rozdíl mezi suchým a vlhkým stavem.

NDVI mělo nižší hodnoty v suchém stavu než vlhkém, což odpovídá dřívějším zjištěním u různých druhů mechů: May et al. (2018) a Orekhova et al. (2021b). U *Sanionia* sp. bylo zjištěno zvýšení hodnot NDVI se zvyšujícím se obsahem vody ve stélce (Valøen 2019). Podobná odpověď byla zjištěna u hodnot NDVI u *Pleurosium* sp., *Sphagnum* sp. (Van Gaalen 2005) a biologické půdní krustě s dominujícím mechem (Fang et al. 2015). Hodnota PRI byla u *S. uncinata* nižší v suchém než ve vlhkém stavu, podobně jako ve studii Varela et al. (2013). Tito autoři studovali sezónní změny a zjistili nižší hodnoty PRI pro jaro/léto (období sucha) než pro zimu (vlhké období). U různých druhů mechů je však zaznamenáván jak nárůst, tak pokles hodnot PRI v suchém stavu (Lovelock a Robinson 2002; Van Gaalen 2005; Orekhova et al. 2021a). Vyšší hodnoty PRI dosahované v průběhu vysychání stélek souvisí s dehydratací vyvolanou aktivací konverze pigmentů xanthofylového cyklu, která je pro mechy a lišejníky prokázána (Van Gaalen et al. 2007; Jupa et al. 2012). Hodnoty spektrálních indexů MCARI a MCARI1 citlivě reagovaly na vlhký/ suchý stav stélky, a proto mohou být považovány za ukazatele stavu vody, podobně jak to navrhuje dřívější studie o antarktických meších (*Bryum pseudotriquetrum*, *Brachythecium austroglareosum*) – (Orekhova et al. 2021a).

Spektrální vlastnosti lišejníků v suchém a vlhkém stavu

Druhově specifické spektrální křivky lze připsat barvě stélky. Jen velmi malá změna ve spektrální odrazivosti ve vlhkých a suchých stélkách *H. lugubris* může být přičítána faktu, že tento lišejník má obecně černou stélku, která má přibližně stejnou odrazivost ve stavu vlhká, resp. a suchá stélka. Podobná odezva byla zjištěna u načernalého lišejníku, obsahujícího cyanobakterii *Leptogium puberulum* (Barták et al. 2018b; Barták et al. 2016) s podobnými hodnotami (odraz pod 0.1).

Pro lišejník *L. brialmontii* měla křivka spektrální odrazivosti ve vlhkém stavu nižší hodnoty odrazivosti než suchá. V obou případech však bylo zjištěno dvojfázové zvýšení v oblasti červeného okraje následovně: vyšší míra byla v rozmezí 680 nm až 710 nm a 710 nm až 800 nm. Přítomnost nárůstu spektrální odrazivosti v oblasti červeného okraje je vlastností lišejníků, obsahujících jako fotobiont řasy. Tato vlastnost byla zjištěna a zdokumentována u mnoha druhů, které vykazují velkou škálu barev stélky (viz Bechtel et al. 2002; Van Der Veen a Csatho 2005). Vzorokly hydratovaného lišejníku, obsahujícího řasy jako fotobiot, s výjimkou černého druhu *H. lugubris*, obecně vykazovaly nižší hodnoty odrazivosti ve vlhkém stavu než když byly v suchém stavu. To platí hlavně pro spektrální rozsah 400 nm-670 nm, kde je rozdíl mezi vlhkým a suchým spektrem

nejvýraznější (Barták et al. 2021). Tento fakt, jak dokládá i další práce (Mishra et al. 2019), která byla zaměřena na spektrální odrazivost u antarktického lišejníku *Dermatocarpon polyphyllum*. Hydratací indukované změny odrazivosti ve viditelné oblasti jsou způsobeny vysokou absorpcí fotosyntetickými pigmenty v hydratovaném stavu stélky, zatímco vysoká odrazivost v oblasti blízké infračervené je způsobena vysokým rozptylem z vnitřních struktur lišejníků (Kiang et al. 2007a; Kiang et al. 2007b).

Naše údaje naznačují, že kromě druhové specifičnosti, se numerické hodnoty indexů NDVI a PRI liší v suchých a vlhkých lišejnících (tab. 2). Zvýšení NDVI v suchém stavu v porovnání s vlhkými stélky u černého druhu *H. lugubris* lze přirovnat k podobné odezvě zjištěné u následujících polárních lišejníků, které mají černé stélky ve vlhkém stavu: *Umbilicaria hirsuta* (Gloser a Glöser 2007), *U. cylindrica* a *U. decusata* (Jupa et al. 2012). Nicméně, jiní zástupci čeledi Umbilicariaceae, které mají sytě zelenou barvu ve vlhkém stavu, vykazují pokles NDVI s vysycháním stélky, stejně jako nižší hodnoty NDVI v suchém stavu než ve vlhkém stavu (*U. arctica*, *U. hyperborea* (viz Barták et al. 2015).

V terénních studiích byl index NDVI testován pro potenciál v oblasti fytogeografického mapování a zjištění druhového složení, respektive funkčního stavu. Šlo zejména o detekci a mapování ekosystémů pokrytých lišejníky na Antarktickém poloostrově (Casanovas et al. 2015). Použití spektrálních křivek odrazivosti a/nebo NDVI nabízí do budoucna velký potenciál pro studie dálkového průzkumu, alespoň pro detekci přítomnosti lišejníku v antarktických ekosystémech a jeho odlišení od dalších vegetačních povrchů (mechy, biologické půdní krusty). S technologickým pokrokem a častějším používáním bezpilotních vzdušných prostředků lze pro následné studie v antarktických terestrických ekosystémech očekávat častější aplikace NDVI v lišejníkových ekofyziologických studiích.

V experimentu zaměřeném na spektrální vlastnosti horního kortexu bylo zjištěno, že odstranění horního kortexu u lišejníků vedlo ke zvýšení hodnot NDVI v celém rozsahu RWC (viz obr. 18) v průběhu vysychání stélky, a to u všech experimentálních druhů kromě *R. melanophthalma*. Taková odezva může být přičítána chybějící části absorpce ve vzorcích lišejníků bez horního kortexu, neboť je dobře prokázáno, že v horním kortexu se nachází mnoho biomolekul se screeningovými účinky v určitých vlnových délkách slunečního záření (Meeßen et al. 2013).

Ve srovnání s kontrolou, hodnoty PRI nevykazovaly žádnou obecnou odpověď ve vzorcích zbavených horního kortexu (obr. 18). V hodnotách PRI u vzorků bez horního kortexu buď nebyly žádné změny (*X. elegans*), nebo byl zaznamenán pokles PRI v rozmezí RWC 20-100 % (*P. muscigena*, *N. commune*) a zvýšení *R. melanophthalma* v RWC rozmezí 10-100 % (viz obr. 18) Vzhledem k tomu, že PRI souvisí s (1) nefotochemickým zhášením absorbované světelné energie fotosyntetickými pigmenty u chloroplastů a (2) množstvím pigmentů xantofylového cyklu, respektive de-epoxidací violaxantinu na zeaxantin přes meziprodukt antheraxantin, lze dojít k závěru, že tyto procesy jsou ovlivněny po odstranění horního kortexu, jak bylo zjištěno u většiny našich experimentálních druhů.

Odolnost mechu *Sanionia uncinata* vůči fotoinhibici

Ovlivnění stélek mechu vysokým zářením vedlo k fotoinhibici, která byla indikována poklesem hodnot F_V/F_M a Φ_{PSII} ve vzorcích z KGI, nikoli však z JRI. Pokles byl však obecně nízký a úplného zotavení bylo dosaženo 90 minut po ukončení fotoinhibičního ovlivnění. Tyto výsledky ukázaly, že primární fotosyntetické procesy v dobře hydratované stélce *S. uncinata* jsou odolné vůči fotoinhibici, více ve vzorcích z JRI než KGI. Během fotoinhibice byly aktivovány fotoochranné mechanismy, jak ukazuje rychlý nárůst nefotochemického zhášení (q_N na obr. 22). Jde o univerzální reakci, protože hodnoty NPQ ve fotoinhibovaných meších ve vlhkém stavu se zvyšují a jsou závislé na dávce záření (Marschall a Proctor 2004 pro *Polytrichum formosum*, Giudici 2019 pro *P. commune*).

Vzhledem k tomu, že fotoinhibiční ovlivnění indukovalo zvýšení NPQ a rychlou (60 min. zotavení) relaxaci na předfotoinhibiční hodnotu ve vzorcích KGI (viz Orekhova et al. 2021b), můžeme předpokládat, že přirozená (konstitutivní) kapacita procesů tvořících nefotochemické zhášení byla dostatečně vysoká, aby se vyrovnala se změnami vyvolanými fotoinhibicí v PSII. U mechů vystavených fotoinhibici se zvyšují složky tvořící nefotochemické zhášení, tedy q_N , tj. q_E (energeticky závislé zhášení), q_I (fotoinhibiční zhášení) a q_T (zhášení spojené se stavovými přechody). Komponenta q_E souvisí s přeměnou violaxanthinu na zeaxanthin a s tepelným rozptýlením absorbované energie, další dvě s konformačními změnami ve struktuře LHC a PSII a stavovými přechody. Zapojení těchto q_N komponent do ochrany vůči fotoinhibici mechu ve vlhkém stavu není dosud dobře prostudováno, protože většina studií kombinuje studium fotoinhibice s vysychajícím stresem, který rovněž aktivuje procesy q_N . Při experimentech tohoto typu nelze stanovit, který z faktorů má na změny hodnot q_N větší vliv. Pouze omezený počet studií se zaměřuje na fotoinhibici mechů ve vlhkém stavu. Nedávná studie Giudici (2019)

naznačuje, že qE je rychle aktivovaná a rychle vratná složka u mechů vystavených fotoinhibici při plně hydratované stélce. Pro objasnění podílu qE/qT a qI je však zapotřebí více dalších detailních experimentů.

Experimentální fotoinhibiční ovlivnění vedlo pouze k mírné fotoinhibici a rychlé obnově primárních fotochemických procesů fotosyntézy u mechu *S. uncinata* z KGI a JRI. To naznačuje, že tento druh může být zařazen jako odolný vůči fotoinhibici, což je podpořeno skutečností, že se hodnoty F_V/F_M a Φ_{PSII} velmi rychle obnovily, tj. vrátily zpět na úroveň před fotoinhibičním ovlivněním (po 90 minutách obnovy u vzorků KGI) nebo zůstaly nezměněné (JRI). Navíc tvar pomalé Kautského kinetiky byl pro kontrolní a fotoinhibiční vzorky téměř stejný a nevykazoval žádné fotoinhibičně indukované zploštění, jak se uvádí u silně fotoinhibovaných lišejníků/mechů (viz např. Barták et al. 2012 pro *Usnea antarctica*, Giudici 2019 pro mechy – nepublikovaná data). Taková rezistence je spojena s účinnými ochrannými mechanismy přítomnými v mechu, zejména nefotochemickým zhášením (viz přehledně Robinson a Waterman 2014). U mechů jde zejména o zhášení spojené s proteiny, jak již bylo zmíněno výše v textu: PsbS a LHCSR1 (*Light Harvesting Complex Stress-Related proteins*). Tyto proteiny se uplatňují při vysokém světelném stresu ve fotosystému II a jsou aktivní při nefotochemickém zhášení (Alboresi et al. 2011; Gerotto et al. 2012). PsbS je spojován především s qE komponentou nefotochemického zhášení (Nyirgi et al. 2004). Nedávno byl zkoumán fotoinhibiční stres u *Physcomitrella patens* v podmínkách *in vitro* spektroskopickými a zhášecími charakteristikami (Stella et al. 2016). Autoři zjistili, že protein LHCSR1 se podílí na termální disipaci energie z PSII.

Účinky fotoinhibice na OJIP a odvozené parametry

Fotoinhibiční ovlivnění způsobilo celkovou inhibici funkce fotosyntetického aparátu u vzorků KGI a JRI s následnou mírnou obnovou (po ukončení fotoinhibičního ovlivnění), jak dokazuje index vitality (viz P_i_Abs na obr. 21). P_i_Abs citlivě reaguje na různé stresové stavy (např. Strasser et al. 2004) včetně teploty (Bednaříková et al. 2020) a vysokými hodnotami záření (Yao et al. 2017). Pokles P_i_Abs vyvolaný fotoinhibicí je univerzální odpovědí ve všech rostlinách vystavených fotoinhibičním účinku (např. Živčák et al. 2014) včetně antarktických autotrofů (Barták et al. 2003; Barták et al. 2006; Barták et al. 2012). V naší studii oba vzorky vykazovaly vysoký nárůst tepelné disipace vyvolané světlem (DI_0/RC) a také pokles fotosyntetického elektronového transportu (ET_0/RC), který je spojen se zvýšeným zapojením fotoprotektivních mechanismů, zejména tepelné disipace. Účinnost tepelné disipace se po fotoinhibičním ovlivnění skutečně zvýšila, více ve vzorcích z JRI než ve vzorcích z KGI (c.f. Φ_{D_0} na obr. 21). Obrázek 20

ukazuje, že fluorescence chlorofylu vzrostla v oblasti bodů O a J, což je spojeno s relativně vyšší emisí fluorescence z LHClI komplexů (ve srovnání s kontrolou) a souvisí s odpojením LHC od RC PSII a inhibicí transportu elektronů z OEC do hotovosti plastochinonů (Yamane et al. 2000).

Ovlivnění fotoinhibicí vedlo ke zvýšení hodnot TR_0/RC a ABS/RC , což je v souladu se skutečností, že počet funkčních center PSII po fotoinhibičním ovlivnění poklesl. Avšak ta RC, která zůstala aktivní, tj. schopná přenosu elektronů k primárnímu akceptoru, pracovala s vyšší účinností než soubor všech RC před fotoinhibicí. Nárůst TR_0/RC a ABS/RC je uváděn i jako důsledek působení dalších stresorů, jako je např. stres z vysoké koncentrace soli a stres suchem (Killi a Haworth 2017). Zvýšení hodnot TR_0/RC a ABS/RC je uváděno u antarktických lišejníků rodu *Usnea* vystavených fotoinhibici (Balarinová et al. 2014). Obecně platí, že fotoinhibiční ovlivnění vede ke zvýšení počtu neaktivních, tj. Q_B -neredukujících RC (Vredenberg et al. 2006), podobně jako u jiných stresorů, jako je např. teplota (Mathur et al. 2011), a osmotický stres (Singh-Tomar et al. 2012). V naší studii analýza parametrů fluorescence chlorofylu odvozených z křivek OJIP prokázala, že *S. uncinata* vykazuje vysoký stupeň rezistence vůči fotoinhibici, protože existuje pouze malé fotoinhibičí indukované zploštění OJIP (data nejsou uvedena) a většina parametrů ChlF odvozených z OJIP vykazuje rychlé částečné zotavení.

Časná fáze fotoinhibice

V laboratorních studiích je fotoinhibice typicky měřena jako pokles F_V/F_M nebo Φ_{PSII} z kontrolních hodnot (před fotoinhibičním ovlivněním) a hodnota dosažená bezprostředně po ovlivnění (trvá typicky 30, 60 min) – (Barbato et al. 2020; Barták et al. 2012). Chování obou parametrů během fotoinhibičního ovlivnění je však věnována mnohem menší pozornost. V našich datech, stejně jako v předchozích studiích zaměřených na cévnaté rostliny a lišejníky (Barták, nepublikovaná data), lze během prvních minut působení fotoinhibičního stresu rozlišit několik fází reakce PSII na vysoké hodnoty záření. Za prvé, pokles na minimální hodnoty je zjištěn během prvních 10 s fotoinhibičního ovlivnění (fáze 1). Pak je zřejmá rychlá fáze aklimace PSII demonstrována jako zvýšení hodnot F_V/F_M a Φ_{PSII} (fáze 2, v období 0-5 min. fotoinhibičního ovlivnění) a pomalá fáze aklimace (fáze 3, v období 5-50 min. fotoinhibičního ovlivnění). Fáze 2 lze přičíst rychle aktivovaným fotoprotektivním mechanismům vedoucím ke zvýšení nefotochemického zhášení (Barták et al. 2003), zatímco fáze 3 se týká procesů (většinou biochemických) zajišťujících rovnováhu mezi fotochemickými a biochemickými procesy fotosyntézy. Během fáze 3 byla zjištěna mírně klesající tendence Φ_{PSII} u vzorků KGI i JRI. Podle našich údajů byla rychlost

nárůstu hodnot Φ_{PSII} ve fázi 2 mnohem rychlejší ve vzorcích z ostrova krále Jiřího než z ostrova Jamese Rosse, což naznačuje, že odolnost vzorků z KGI vůči vysokému světelnému stresu byla vyšší.

Šokové zmrazení

Životaschopnost *Heterococcus* sp. stanovená v devátém dni kultivace (11.3 %) byla nižší než u *Trebouxia* sp., symbiotické řasy v lišejnících (čtvrtý den) v podobně založeném experimentu (Hájek et al. 2012). V této studii autor uvádí, že životaschopnost buněk *Trebouxia* kolísala v rozmezí od 20 % do 69 %. To, ve srovnání s naším pokusem, může znamenat nižší životaschopnost *Heterococcus* sp. než *Trebouxia* sp. způsobené velkým rozsahem intra- a extracelulárního poranění vyvolaným rychlým zmrazením. Poškození v sobě zahrnuje také poškození buněčné stěny a plazmalemy (Honegger 2009). Zjištěný druhově specifický rozdíl v životaschopnosti může být spojen s různými ekologickými nikami *Heterococcus* a *Trebouxia* a rozdíly v cyklech zmrazování/rozmrazování, kterými řasy procházejí v terénu. Bylo například zjištěno, že kryorezistence se významně lišila mezi dvěma skupinami řas z kontrastních polárních stanovišť: sněžné řasy (*Chlamydomonas*) a lišejníkové symbiotické řasy (fotobiont lišejníku – *Trebouxia* sp.) (Hájek et al. 2009a).

Účinky rychlého zmrazení na parametry fluorescence chlorofylu mohou být přičítány rychlým změnám způsobeným zmrazením buněk *Heterococcus* sp. s negativními účinky na úrovni chloroplastů a zejména pigment-proteinových komplexů v thylakoidních membránách. Tyto změny vedou k výraznému snížení energetické přeměny absorbované radiační energie ve fotosystému II (obr. 24) a procesů podílejících se na fotosyntetickém lineárním elektronovém transportním řetězci (snížený F_M' a Φ_{PSII}). Kritická mrazem-indukovaná redukce rychlosti lineárního transportu elektronů může být zdokumentována: (1) omezeným poklesem ChlF signálu od F_P do F_S ve zmrazeném vzorku, a (2) malým rozdílem mezi F_P a F_S , což je spojeno s velmi omezenou reoxidací hotovosti plastochinonů. Taková reakce je popsána také pro krátkodobý účinek nízké teploty a teploty pod nulou, a to na úrovni změny tvaru pomalé Kautského kinetiky v antarktických lišejnících (Marečková a Barták 2016; Mishra et al. 2015). Teplota pod nulou obvykle způsobuje "zploštění" pomalé Kautského kinetiky mezi úrovněmi fluorescence chlorofylu F_P a F_S chlorofylu (Mishra et al. 2015). Obecně platí, že polyfázický průběh pomalé Kautského kinetiky zaznamenaný ve fyziologické teplotě je způsoben několika společně působícími procesy (Kalaji et al. 2014): (1) redoxním stavem elektronové akceptoru (Q_A zejména), (2) podílem mezi fotochemickým a nefotochemickým zhášením absorbované světelné energie, (3) změnami ve

fungování světlosběrného komplexu a (4) zapojení stavových přechodů mezi fotosystémy (Massoz et al 2017), (5) omezení tvorby a následné spotřeby ATP, NADPH v Calvin-Bensonově cyklu.

Také přímý účinek zmrazení v kapalném dusíku na parametry fluorescence chlorofylu bezprostředně po ovlivnění byl prokázán po rozmrazení vzorků řas *Diplosphaera chodatii* a *Stigeoclonium* sp. (v kapalném prostředí). Přestože většina buněk byla zničena šokovým zmrazením, potenciál fotochemických procesů v PS II (F_V/F_M) zůstal konstantní u *D. chodatii*. To může ukazovat na vysokou odolnost druhu k cyklu zmrazení/rozmrazení a schopnost přežívání buněk v extrémních polárních prostředích. Rovněž to svědčí o schopnosti tohoto druhu udržet funkčnost PSII i po ukončení akutního stresu zmrazením. Naopak u druhu *Stigeoclonium* sp. se ukázal pokles F_V/F_M v závislosti na šokovém zmrazení.

5. ZÁVĚR

Údaje prezentované v této doktorské disertační práci i práce jiných autorů pracujících v této problematice (viz kapitola Úvod) ukazují, že metoda fluorescence chlorofylu je velmi citlivá pro indikaci odezvy fotosyntetického aparátu na různé druhy stresových faktorů. S ohledem na tematické zaměření předkládané doktorské disertační práce lze konstatovat, že většina parametrů fluorescence chlorofylu velmi rychle reaguje na změnu obsahu vody v meších a lišejnících při vysychání a na rovněž na zvýšenou úroveň záření (fotoinhibici). Díky tomu lze pomocí různých měřících metod založených na principu indukované fluorescence chlorofylu *in vivo* získat podrobné údaje o funkčnosti fotosyntetického aparátu a vztazích mezi vysycháním / fotoinhibicí a fotosyntetickou aktivitou PSII. Tyto neinvazivní fluorescenční metody jsou mnohem rychlejší než alternativní metody, jako je například měření fotosyntetické výměny CO₂, a také umožňují používat pro měření mnohem menší vzorky mechů a lišejníků, čímž se výrazně snižuje dopad na jejich výskyt a složení společenstev v místě jejich výskytu. Tento aspekt je velmi důležitý, neboť snižuje negativní dopad jakýchkoliv terénních prací (terénní měření a odběry). Nedochozí tak zejména v Antarktidě k ohrožení výskytu druhů na daném stanovišti, kde je tempo růstu pomalé a společenstva vegetačních oáz jsou často nevelká a prostorově omezena. Metody fluorescence chlorofylu ukázaly svoji účinnost i při zkoumání působení velmi nízkých teplot na řasy, a to zejména v experimentech zaměřených na monitorování stavu kultivovaných řas na agaru. Lze tedy konstatovat, že metody fluorescence chlorofylu jsou velmi účinné nejenom při stanovení rozdílů parametrů fluorescence u různých druhů mechů, lišejníků nebo řas, ale také při stanovení ekofyziologické odezvy fotosyntetického aparátu studovaného druhu na působení stresových faktorů v řízeném prostředí laboratorních experimentů.

V disertační práci bylo hlavním studovaným stresovým faktorem vysychání stélky. Reakce fluorometrických parametrů v odezvě na vysychání byla sledována jak u vybraných druhů antarktických mechů, tak i lišejníků. Mechy jsou považovány za vysoce odolné proti vysychání, protože udržují fotosyntetickou aktivitu i při velmi silném stupni dehydratace stélky. Proto byly ve studiích zařazených do této doktorské disertační práce zkoumány změny ve fotochemických procesech fotosyntézy, a spektrální odrazivost parametrů v podmínkách kontrolované rehydratace a vysychání. Šlo o dva Antarktické druhy mechů: *Brachythecium austro-glareosum* a *Bryum pseudotriquetrum*. Ve vysychajících stélkách zůstal efektivní kvantový výtěžek fotosyntetických procesů v PSII (Φ_{PSII}) beze změny v nízkém až středním stupni vyschnutí, tj. v podmínkách relativního obsahu vody (RWC) snižujícího se od plně vlhkého (100 %) až do polosuchého stavu

(30 %). V hodnotách pod 20 % RWC, Φ_{PSII} ukázal druhově specifický pokles, stejně jako fluorescence chlorofylu v rovnovážném stavu (F_S). Pokles Φ_{PSII} na poloviční hodnotu maxima byl dosažen v RWC 12.6 % (*B. austro-glareosum*) a 9.8 % (*B. pseudotriquetrum*). Rychlé světelné křivky ukázaly silné omezení fotosyntetického transportu elektronů (ETR) v hodnotách RWC pod 20 %, a to u obou studovaných druhů. Indexy spektrální odrazivosti reagovaly u obou druhů mechů na vysychání podobně (NDVI, MCARI, GI). Nicméně, druhově specifické rozdíly byly zjištěny v indexu fotochemické odrazivosti (PRI) při středním a silném stupni vyschnutí. Tyto výsledky naznačují, že oba druhy jsou tolerantní k vysychání a dobře přizpůsobené drsnému antarktickému prostředí. *B. pseudotriquetrum* je však odolnější při těžké dehydrataci (RWC pod 20 %) než *B. austro-glareosum*.

Účinek vysychání stélek antarktických lišejníků na primární fotosyntetické procesy byl studován pomocí analýzy pomalé Kautského kinetiky ChlF, která byla zaznamenána během řízené dehydratace (pokles RWC z 100 na 0 %). Byly zkoumány reakce primárních fotochemických procesů fotosyntézy lišejníků na relativní obsah vody (RWC). Změny ChlF v rovnovážném stavu (F_S), potenciální a efektivní kvantové výtěžky PSII (F_V/F_M , Φ_{PSII}), a nefotochemického zhášení (NPQ), reagovaly na vysychání a citlivě indikovaly vysycháním indukovanou inhibici fotosyntetických procesů. Zjištěný pokles hodnot F_V/F_M a Φ_{PSII} způsobený postupnou dehydratací byl druhově specifický, a to počínaje rozsahem RWC v rozmezí 22 % - 32 %. Kritický RWC pro Φ_{PSII} byl u studovaných druhů lišejníků zjištěn pod 5 %. Změny parametrů fluorescence chlorofylu naznačovaly zapojení ochranných mechanismů do chloroplastového aparátu lišejníkových fotobiontů při RWC pod 20 %.

Byly měřeny spektrální křivky odrazivosti a spektrální indexy (NDVI a PRI) ve vlhkém i suchém stavu u různých druhů lišejníků. Spektrální odrazivost ve vlhkém a suchém stavu u lišejníků vykazovala druhovou specifitu, založenou zejména na barvě stélky a optických vlastnostech horního kortexu. PRI neprokázal žádné změny, ani druhově specifické zvýšení / snížení s dehydratací stélek. Odstranění horního kortexu způsobilo buď snížení nebo zvýšení PRI a vedlo ke zvýšení NDVI u všech druhů, obvykle v rozmezí RWC 20-100 %.

Další části doktorské disertační práce jsou věnovány působení stresu vysokým stupněm ozáření (fotoinhibicí) u mechů z různých lokalit Antarktidy. Krátkodobé fotoinhibiční ovlivnění u hydratovaných mechů *S. uncinata* způsobila pouze omezený pokles fotosyntetických parametrů (F_V/F_M a Φ_{PSII}), jehož rozsah se lišil mezi vzorky z ostrovů krále Jiřího a Jamese Rosse. Rychlé

obnovení (angl. *recovery*) primárních fotochemických procesů fotosyntézy bylo zjevné u obou parametrů během 2 hodin po ukončení fotoinhibičního ovlivnění. Spolu s krátkodobým zapojením fotoprotektivních mechanismů (nefotochemické zhášení, NPQ) během fotoinhibičního ovlivnění a následného zotavení umožňují závěr, že mech *S. uncinata* je ve vlhkém stavu vysoce odolný vůči fotoinhibici. Některé ChlF parametry související výhradně s funkcí PSII (parametry odvozené od OJIP) však vyžadují k obnově více než 2 hodiny. Mezi nimi např. tepelná disipace z PSII ukázala nedokončenou regeneraci, což naznačuje, že alespoň některé fotoprotektivní a reparativní mechanismy zůstaly aktivní i po 2 h regeneraci.

Třetím stresem studovaným v rámci doktorské disertační práce bylo šokové zmrazení mikrořas. Zkoumali jsme vliv šokového zmrazení na fyziologické vlastnosti a následný růst antarktické řasy *Heterococcus* sp., řasy *Stigeoclonium* sp. a *Diplosphaera chodatii* v kapalném prostředí, s následnou kultivací na agarových deskách. Přidání ribitolu ke kultuře řasy *Heterococcus* sp. před šokovým zmrazením způsobilo výrazné zvýšení životaschopnosti buněk (P_v) v prvních dvou týdnech kultivace. V následujícím kultivačním období byl pozitivní vliv ribitolu na P_v méně výrazný, ale přesto statisticky významný. Pro hodnocení negativního vlivu šokového zmrazení na parametry fluorescence chlorofylu byly měřeny F_v/F_m a Φ_{PSII} bezprostředně před a po šokovému zmrazení. Přídavek 32 a 50 mM ribitolu vedl k dřívějšímu růstu hodnot těchto sledovaných parametrů fluorescence chlorofylu (d 16) ve srovnání s kontrolou bez přídavku ribitolu (d 23). Přídavek ribitolu vedl také k dřívějšímu dosažení maximálních hodnot parametrů fluorescence chlorofylu (d 23 ve vzorcích ošetřených ribitolem, ve srovnání s d 25 v kontrolních vzorcích). Výsledky získané pro druh antarktické kokální řasy *Heterococcus* sp. ukázaly, že tento druh je odolný vůči rychlému zmrazování. Tato schopnost může pomoci druhu přežít v drsných antarktických podmínkách, charakterizovaných rychlými teplotními výkyvy, které mohou vést k rychlému zamrznutí řas. Výsledky studia vlivu šokového zmrazení na kultury řas *Stigeoclonium* sp. a *Diplosphaera chodatii* ukázaly, že existují mezidruhové rozdíly v jejich toleranci vůči působení nízké a mrazové teploty, stejně tak, jako v rychlosti jejich následného růstu na agarech.

6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Adamson H., Wilson M., Selkirk P., Seppelt R.D. (1988) Photoinhibition in Antarctic mosses. *Polarforschung*, 58: 103-111.
- Ahn T.K., Avenson T.J., Ballottari M., Cheng Y.C., Niyogi K.K., Bassi R., Fleming G.R. (2008) Architecture of a charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein. *Science*, 320: 794-797.
- Alamillo J., Almoguera C., Bartels D., Jordano J. (1995) Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology*, 29: 1093-1099.
- Alboresi A., Gerotto C., Giacometti G.M., Bassi R., Morosinotto T. (2010) *Physcomitrella patens* mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 107: 11128-11133.
- Alboresi A., Gerotto C., Cazzaniga S., Bassi R., Morosinotto T. (2011) A red-shifted antenna protein associated with photosystem II in *Physcomitrella patens*. *The Journal of biological Chemistry*, 286: 28978-28987.
- Allen J.F., Forsberg J. (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Science*, 6(7): 317-326.
- Alpert P. (1988) Survival of a desiccation-tolerant moss, *Grimmia laevigata*, beyond its observed microdistributional limits. *Journal of Bryology*, 15: 219-227.
- Alpert P. (2000) The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. *Plant Ecology*, 15: 5-17.
- Alpert P. (2005) The limits and frontiers of desiccation tolerant life. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 685-695.
- Ambrožová K., Laska K. (2016) The air temperature change on James Ross Island within the context of the Antarctic Peninsula. In: Novacek A. (Eds), Conference Proceedings of Czech Geographical Society, 5-7 September 2016, Ceske Budejovice, Czech Republic, 20-25.
- Andreoli C., Moro I., La Rocca N., Valle L.D., Masiero L., Rascio N., Dalla Vecchia F. (2000) Ecological, physiological, and biomolecular surveys on microalgae from Ross Sea (Antarctica), *Italian Journal of Zoology*, 67 (sup.1) 147.
- Andreyev M.P. (1989) The lichens in the vicinity of Bellingshausen Station, King George Island. *Polar Geography and Geology*, 13: 42-45.
- Armstrong R.A., Smith S.N. (1994) The levels of ribitol, arabitol and mannitol in individual lobes of the lichen *Parmelia conspersa* (Ehrh ex Ach), Ach. *Environmental and Experimental Botany*, 34: 253-260.
- Arnold R.J., Convey P., Hughes K.A., Wynn-Williams D.D. (2003) Seasonal periodicity of physical factors, inorganic nutrients and microalgae in Antarctic fellfields. *Polar Biology*. 26: 396-403.
- Arnoux P., Morosinotto T., Saga G., Bassi R., Pignol D. (2009) A structural basis for the pH-dependent xanthophyll cycle in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 21: 2036-2044.
- Balarinová K., Barták M., Hazdrová J., Hájek J., Jílková J. (2014) Changes in photosynthesis, pigment composition and glutathione contents in two Antarctic lichens during a light stress and recovery. *Photosynthetica*, 52: 538-547.
- Ballottari M., Girardon J., Betterle N., Morosinotto T., Bassi R. (2010) Identification of the chromophores involved in aggregation-dependent energy quenching of the monomeric photosystem II antenna protein Lhcb5. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 28309-28321.

- Barbato R., Tadini L., Cannata R., Peracchio C., Jeran N., Alboresi A., Morosinotto T., Bajwa A.A., Paakkariinen V., Suorsa M., Aro E.-M., Pesaresi P. (2020) Higher order photoprotection mutants reveal the importance of Δ pH-dependent photosynthesis control in preventing light induced damage to both photosystem II and photosystem I. *Scientific Reports*, 10: 6770.
- Barták M., Vráblíková H., Hájek J. (2003) Sensitivity of photosystem 2 of Antarctic lichens to high irradiance stress: Fluorometric study of fruticose (*Usnea antarctica*) and foliose (*Umbilicaria decussata*) species. *Photosynthetica*, 41: 497-504.
- Barták M., Solhaug K.A., Vráblíková H., Gauslaa Y. (2006) Curling during desiccation protects the foliose lichen *Lobaria pulmonaria* against photoinhibition. *Oecologia*, 149: 553-560.
- Barták M., Hájek J., Očenášová P. (2012) Photoinhibition of photosynthesis in Antarctic lichen *Usnea antarctica*. I. Light intensity- and light duration-dependent changes in functioning of photosystem II. *Czech Polar Reports*, 2: 42-51.
- Barták M. (2014) Lichen Photosynthesis. Scaling from the cellular to the organism level. In: Hohmann-Marriott M.F. (Eds), *The Structural Basis of Biological Energy Generation. Advances in Photosynthesis and Respiration; Advances in Photosynthesis and Respiration*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, vol. 39, pp. 379-400.
- Barták M., Trnková K., Hansen E.S., Hazdrová J., Skácelová K., Hájek J., Forbelská M. (2015) Effect of dehydration on spectral reflectance and photosynthetic efficiency in *Umbilicaria arctica* and *U. hyperborea*. *Biologia Plantarum*, 59: 357-365.
- Barták M., Hájek J., Amarillo A.M., Hazdrová J., Carreras H. (2016) Changes in spectral reflectance of selected Antarctic and South American lichens caused by dehydration and artificially-induced absence of secondary compounds. *Czech Polar Reports*, 6: 221-230.
- Barták M., Mishra K.B., Marečková M. (2018a) Spectral reflectance indices sense desiccation induced changes in the thalli of Antarctic lichen *Dermatocarpon polyphyllizum*. *Czech Polar Reports*, 8: 249-259.
- Barták M., Hájek J., Morkusová J., Skácelová K., Košuthová A. (2018b) Dehydration-induced changes in spectral reflectance indices and chlorophyll fluorescence of Antarctic lichens with different thallus color, and intrathalline photobiont. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40: 177.
- Barták M., Hájek J., Orekhova A., Villagra J., Marín C., Palfner G., Casanova-Katny A. (2021) Inhibition of primary photosynthesis in desiccating Antarctic lichens differing in their photobionts, thallus morphology and spectral properties. *Microorganisms*. Special Issue on "Lichen functional traits and Ecosystem Functions", 9(4): 818, <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040818>.
- Bartošková H., Nauš J., Výkruta M. (1999) The arrangement of chloroplasts in cells influences the reabsorption of chlorophyll fluorescence emission. The effect of desiccation on the chlorophyll fluorescence spectra of *Rhizomnium punctatum* leaves. *Photosynthesis Research*, 62: 251-260.
- Bates J.W., Wibbelmann M.H., Proctor M.C.F. (2009) Salinity responses of halophytic and non-halophytic bryophytes determined by chlorophyll fluorometry. *Journal of Bryology*, 31: 11-19.
- Baxter R., Emes M.J., Lee J.A. (1991) Short-term effects of bisulphite on pollution-tolerant and pollution-sensitive populations of *Sphagnum cuspidatum* Ehrh. (ex. Hoffm.). *New Phytologist*, 118(3): 425-431.
- Bechtel R., Rivard B., Sánchez-Azofeifa A. (2002) Spectral properties of foliose and crustose lichens based on laboratory experiments. *Remote Sensing of Environment*, 82: 389-396.
- Beckett R., Csintalan Z., Tuba Z. (2000) ABA treatment increases both the desiccation tolerance of photosynthesis, and nonphotochemical quenching in the moss *Atrichum undulatum*. *Plant Ecology*, 151: 65-71.
- Beckett R.P., Minibayeva F.V., Laufer Z. (2005) Extracellular reactive oxygen species production by lichens. *The Lichenologist*, 37 (5): 397-407.

- Beckett R.P., Kranner I., Minibayeva F.V. (2008) Stress physiology and the symbiosis. In: Nash T.H. III (Eds), *Lichen Biology*, Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 134-151.
- Bednaříková M., Folgar-Cameán Y., Kučerová Z., Lazár D., Špundová M., Hájek J., Barták M. (2020) Analysis of K- and L-band appearance in OJIPs in Antarctic lichens in low and high temperature. *Photosynthetica*, 58 (SI): 646-656.
- Bellini E., Maresca V., Betti C., Castiglione M.R., Fontanini D., Capocchi A., Sorce C., Borsò M., Bruno L., Sorbo S., Basile A., Sanità di Toppi L. (2020) The Moss *Leptodictyum riparium* Counteracts Severe Cadmium Stress by Activation of Glutathione Transferase and Phytochelatin Synthase, but Slightly by Phytochelatins. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 1583.
- Bendarek-Ochyra H., Vaňa J., Ochyra R., Lewis Smith R.I. (2000) The liverwort flora of Antarctica. Crakow. 236 p.
- Betterle N., Ballottari M., Hienerwadel R., Dall'Osto L., Bassi R. (2010) Dynamics of zeaxanthin binding to the photosystem II monomeric antenna protein Lhcb6 (CP24) and modulation of its photoprotection properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 504: 67-77.
- Bewley J.D., Pacey J. (1978) Desiccation-induced ultrastructural changes in drought-sensitive and drought-tolerant plants. In: Crowe J.H., Clegg J.S. (Eds), *Dry biological systems*. Academic Press, London, New York, pp. 53-73.
- Bewley J.D. (1979) Physiological Aspects of Desiccation Tolerance. *Annual Review of Plant Physiology*, 30: 195-238.
- Bewley J.D., Krochko J.E. (1982) Desiccation tolerance. In: Lange O.L., Nobel P.S., Osmond C.B., Ziegler H. (Eds), *Encyclopedia of plant physiology*, vol. 12B, *Physiological Ecology II*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 325-378.
- Bewley J.D., Reynolds T.L., Oliver M.J. (1993) Evolving strategies in the adaptation to desiccation. In: Close T.J., Bray E.A. (Eds), *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress*, Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, pp. 193-201.
- Bilger W., Rimke S., Schreiber U., Lange O.L. (1989) Inhibition of Energy-Transfer to Photosystem II in Lichens by Dehydration: Different Properties of Reversibility with Green and Blue-green Phycobionts. *Journal of Plant Physiology*, 134(3): 261-268.
- Bisson M.A., Kirst G.O. (1995) Osmotic acclimation and turgor pressure regulation in algae. *Naturwissenschaften*, 82: 461-471.
- Bohuslavová O., Macek P., Redčenko O., Láska K., Nedbalová L., Elster J. (2018) Dispersal of lichens along a successional gradient after deglaciation of volcanic mesas on northern James Ross Island, Antarctic Peninsula. *Polar Biology*, 41: 2221-2232.
- Bokhorst S., Convey P., Casanova-Katny A., Aerts R. (2021) Warming impacts potential germination of non-native plants on the Antarctic Peninsula. *Communications biology*, 4: 403.
- Bonente G., Howes B.D., Caffarri S., Smulevich G., Bassi R. (2008) Interactions between the photosystem II subunit PsbS and xanthophylls studied *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 283: 8434-8445.
- Borchhardt N., Baum C., Mikhailyuk T., Karsten U. (2017) Biological soil crusts of Arctic Svalbard – water availability as potential controlling factor for microalgal biodiversity. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1485.
- Bray E.A. (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2: 48-54.
- Broady P.A. (2005) The distribution of terrestrial and hydro-terrestrial algal associations at three contrasting locations in southern Victoria Land, Antarctica. *Algological Studies*, 118: 95-112.

- Bukhov N.G., Heber U., Wiese C., Shuvalov, V.A. (2001a) Energy dissipation in photosynthesis: does the quenching of chlorophyll fluorescence originate from antenna complexes of photosystem II or from the reaction center? *Planta*, 212: 749-758.
- Bukhov N.G., Kopecky J., Pfundel E.E., Klughammer C., Heber U. (2001b) A few molecules of zeaxanthin per reaction centre of photosystem II permit effective thermal dissipation of light energy in photosystem II of a poikilohydric moss. *Planta*, 212: 739-748.
- Caisová L., Komárek J., Elster J., Nedbalová L. (2009) Two freshwater filamentous, branched green algae, newly discovered to Antarctica. In: Barták M., Hájek J., Václav P. (Eds), Structure and Function of Antarctic Terrestrial Ecosystems, Book of Abstracts and Contributed Papers, Conference, Brno, Oct. 22nd -23rd, Masaryk University Brno, pp. 14-20.
- Calatayud A., Deltoro V.I., Barreno E., Del Valle-Tascon S. (1997) Changes in *in vivo* chlorophyll fluorescence emission during desiccation and suggestion of zeaxanthin associated photoprotection. *Physiologia Plantarum*, 101: 93-102.
- Campbell C., Rydin H. (2019) The effects of winter stress on *Sphagnum* species with contrasting macro- and microdistributions. *Journal of Bryology*, 41(3): 205-217.
- Cardinale B.J., Matulich K.L., Hooper D.U., Byrnes J.E., Duffy E., Gamfeldt L., Balvanera P., O'Connor M.I., Gonzalez A. (2011) The functional role of producer diversity in ecosystems. *American Journal of Botany*, 98(3): 572-592.
- Carrell A.A., Lawrence T.J., Cabugao G.K.M., Carper D.L., Pelletier D.A., Jawdy S., Grimwood J., Schmutz J., Hanson P.J., Shaw A.J., Weston J.D. (2020) Sphagnum peat moss thermotolerance is modulated by the microbiome. bioRxiv 2020.08.21.259184; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.21.259184>.
- Casanova-Katny A., Barták M., Gutierrez C. (2019) Open top chamber microclimate may limit photosynthetic processes in Antarctic lichen: Case study from King George Island, Antarctica. *Czech Polar Reports*, 9: 61-77.
- Casanovas P., Black M., Fretwell P., Convey P. (2015) Mapping lichen distribution on the Antarctic Peninsula using remote sensing, lichen spectra and photographic documentation by citizen scientists. *Polar Research*, 34: 1.
- Chapman B.E., Roser D.J., Seppelt, R.D. (1994) ¹³C NMR analysis of Antarctic cryptogram extracts. *Antarctic Science*, 6: 295-305.
- Charron A.J., Quatrano R.S. (2009) Between a Rock and a Dry Place: The Water-Stressed Moss. *Molecular Plant*, 2(3): 478-486.
- Chen Y.E., Wu N., Zhang Z.W., Yuan M., Yuan S. (2019) Perspective of monitoring heavy metals by moss visible chlorophyll fluorescence parameters. *Frontiers Plant Science*, 10: 35. doi: 10.3389/fpls.2019.00035.
- Cho S.M., Lee H., Hong S.G., Lee J. (2020) Study of ecophysiological responses of the Antarctic fruticose lichen *Cladonia borealis* using the PAM fluorescence system under natural and laboratory conditions. *Plants*, 9: 85.
- Chobot V., Kubicová L., Nabbout S., Jahodár L., Hadacek F. (2008) Evaluation of Antioxidant Activity of Some Common Mosses. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen Z Naturforsch. *Journal of Chemical Sciences*, 63(7-8): 476-482.
- Chwedorzewska K.J. (2008) *Poa annua* L. in Antarctic: searching for the source of introduction. *Polar Biology*, 31: 263-268.
- Chwedorzewska K.J., Giełwanowska I., M. Olech, Wódkiewicz M., Galera H. (2014) *Poa annua* L. in the maritime Antarctic: an overview. *Polar Record*, 51(6).

- Cid-Aguero P., Cuello J.L., Ruiz S. (2018) Growth and lipid profiles of the Antarctic snow microalga *Chlamydomonas* sp. in response to changes in temperature, photoperiod, salinity and substrate. *Anales del Instituto de la Patagonia*, 45(3): 45-58.
- Colesie C., Green T.G.A., Raggio J., Büdel B. (2016) Summer activity patterns of Antarctic and high alpine lichen- dominated biological soil crusts – Similar but different? *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 48: 449-460.
- Convey P. (1994) Photosynthesis and dark respiration in Antarctic mosses – an initial comparative study. *Polar Biology*, 14: 65-69.
- Cooper G., Carroll G.C. (1978) Ribitol as a major component of water-soluble leachates from *Lobaria oregana*, *Bryologist*, 81: 568-572.
- Coste C., Chauvet E., Grieu P., Lamaze T. (2016) Photosynthetic traits of freshwater lichens are consistent with the submersion conditions of their habitat. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, EDP sciences, 52: 235-242.
- Coxson D.S., McIntyre D.D., Vogel H.J. (1992) Pulse release of sugars and polyols from canopy bryophytes in tropical montane rain forest (Guadeloupe, French West Indies). *Biotropica*, 24: 121-133.
- Crowe J.H., Crowe L.M., Wolkers W.F., Oliver A.E., Ma X., Auh J.-H., Tang M., Zhu S., Norris J., Tablin F. (2005) Stabilization of dry mammalian cells: lessons from nature. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 810-820.
- Cruz de Carvalho R., Branquinho C., Marques da Silva J. (2011) Physiological consequences of desiccation in the aquatic bryophyte *Fontinalis antipyretica*. *Planta*, 234: 195-205.
- Cruz de Carvalho R., Catalá M., Marques da Silva J., Branquinho C., Barreno E. (2012) The impact of dehydration rate on the production and cellular location of reactive oxygen species in an aquatic moss. *Annals of Botany*, 110: 1007-1016.
- Csintalan Z., Proctor M.C.F., Tuba Z. (1999) Chlorophyll Fluorescence during drying and rehydration in the mosses *Rhytidiadelphus loreus* (Hedw.) Warnst., *Anomodon viticulosus* (Hedw.) Hook. and Tayl. and *Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm. *Annals of Botany*, 84: 235-244.
- Cui X., Gu S., Wu J., Tang Y. (2009) Photosynthetic response to dynamic changes of light and air humidity in two moss species from the Tibetan Plateau. *Ecological Research*, 24: 645-653.
- Dahlman L., Persson J., Nasholm T., Palmqvist K. (2003) Carbon and nitrogen distribution in the green algal lichens *Hypogymnia physodes* and *Platismatia glauca* in relation to nutrient supply. *Planta*, 217: 41-48.
- Dall'Osto L., Caffarri S., Bassi R. (2005) A mechanism of nonphotochemical energy dissipation, independent from PsbS, revealed by a conformational change in the antenna protein CP26. *Plant Cell*, 17: 1217-1232.
- Darling R.B., Friedmann E.I., Broady P.A. (1987) *Heterococcus endolithicus* sp. nov. (Xanthophyceae) and other terrestrial *Heterococcus* species from Antarctica: morphological changes during life history and response to temperature. *Journal of Phycology*, 23: 598-607.
- Daughtry C.S.T., Walthall C.L., Kim M.S., Brown D.E., Colstoun E., McMurtrey J.E. (2000) Estimating corn leaf chlorophyll concentration from leaf and canopy reflectance. *Remote Sensing of Environment*, 74: 229-239.
- Davey M.C. (1991) Effects of Physical factors on the survival and growth of Antarctic terrestrial algae. *British Phycological Journal*, 36: 315-325.
- Davey M.C. (1997) Effects of short-term dehydration and rehydration on photosynthesis and respiration by Antarctic bryophytes. *Environmental and Experimental Botany*, 37(2-3): 187-198.
- Davies W.J., Jones H.G. (1991) Abscisic Acid: Physiology and Biochemistry. Bios Scientific Publishers, Oxford, 266 pp.

- Day J.G. (2007) Cryopreservation of microalgae and cyanobacteria, in: Day J.G., Stacey G.N. (Eds), Cryopreservation and Freeze-drying Protocols. Humana Press, pp. 141-151.
- Deltoro V.I., Calatayud A., Gimeno W.C., Barreno E. (1998a) Water relations, chlorophyll fluorescence, and membrane permeability during desiccation in bryophytes from xeric, mesic, and hydric environments. *Canadian Journal of Botany*, 76: 1923-1929.
- Deltoro V.I., Calatayud A., Gimeno C., Abadia A., Barreno E. (1998b) Changes in chlorophyll a fluorescence, photosynthetic CO₂ assimilation and xanthophyll cycle interconversions during dehydration in desiccation-tolerant and intolerant liverworts. *Planta*, 207: 224-228.
- Deltoro V.I., Morales Á.C.F., Abadía A., Barreno E. (1999) Changes in net photosynthesis, chlorophyll fluorescence and xanthophyll cycle interconversions during freeze-thaw cycles in the Mediterranean moss *Leucodon sciuroides*. *Oecologia*, 120: 499-505.
- Demmig-Adams B., Adams W.W. (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 599-626.
- Dikaios I., Schiphorst Ch., Dall'osto L., Alboresi A., Bassi R., Pinnola A. (2019) Functional analysis of LHCSR1, a protein catalyzing NPQ in mosses, by heterologous expression in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research*, 142: 249-264.
- Doering J.A. (2017) An investigation of the spatial distribution and inference of dispersal method in the semi-aquatic lichenised green alga *Diplosphaera chodatii* around Payuk Lake, Manitoba. Master Thesis, Faculty of Graduate Studies of the University of Manitoba, Canada, 162 p.
- Elster J. (2002) Ecological classification of terrestrial algal communities in polar environments. In: Beyer L., Bolter M. (Eds), *Geocology of Antarctic Ice-free Coastal Landscapes*. Springer-Verlag, pp. 303-326.
- Elster J., Degma P., Kovačik L., Valentova L., Šramkova K., Pereira A.B. (2008) Freezing and desiccation injury resistance in the filamentous green alga *Klebsormidium* from the Antarctic, Arctic and Slovakia. *Biologia*, 63(6): 839-847.
- Elster J., Nedbalová L., Vodrážka R., Láska K., Haloda J., Komárek J. (2016) Unusual biogenic calcite structures in two shallow lakes, James Ross Island, Antarctica. *Biogeosciences*, 13: 535-549.
- Erudel T., Fabre S., Houet T., Mazier F., Briottet X. (2017) Criteria comparison for classifying peatland vegetation types using *in situ* hyperspectral measurements. *Remote Sensing*, 9: 748. <https://doi.org/10.3390/rs9070748>.
- Evenari M. (1985) The desert environment. In: Evenari M., Noy-Meir I., Goodall D.W. (Eds), *Ecosystems of the World. Hot Deserts and Arid Shrublands*, vol. 12A. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-22.
- Fang S., Yu W., Qi Y. (2015) Spectra and vegetation index variations in moss soil crust in different seasons, and in wet and dry conditions. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 38: 261-266.
- Farrant J.M. (2000) A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species. *Plant Ecology*, 151: 29-39.
- Feller G. (2007) Life at low temperatures: is disorder the driving force? *Extremophiles*, 11 (2): 211-216.
- Fernandes A.S., Alencar A.S., Evangelista H., Mazzei J.L., Felzenszwalb I. (2015) Photoprotective and toxicological activities of extracts from the Antarctic moss *Sanionia uncinata*. *Pharmacognosy Magazine*, 11: 38-43.
- Fernandes A.S., Mazzei J.L., Oliveira C.G., Evangelista H., Marques M.R.C., Ferraz E.R.A., Felzenszwalb I. (2017) Protection against UV-induced toxicity and lack of mutagenicity of Antarctic *Sanionia uncinata*. *Toxicology*, 376: 126-136.

- Fernández-Marín B., Míguez F., Becerril J.M., García-Plazaola J.I. (2011) Dehydration-mediated activation of the xanthophyll cycle in darkness: is it related to desiccation tolerance? *Planta*, 234: 579-588.
- Fernández-Marín B., Kranner I., Sebastián M.S., Artetxe U., Laza J.M., Vilas J.L., Pritchard H.W., Nadajaran J., Míguez F., Becerril J.M., García-Plazaola J.I. (2013) Evidence for the absence of enzymatic reactions in the glassy state. A case study of xanthophyll cycle pigments in the desiccation-tolerant moss *Syntrichia ruralis*. *Journal of Experimental Botany*, 64: 3033-3043.
- Flechtner V.R., Johansen J., Clark W. (1998) Algal composition of microbiotic crusts from the central desert of Baja California, Mexico. *Great Basin Naturalist*, 58: 95-311.
- Flechtner V.R., Johansen J.R., Belnap J. (2008) The Biological soil crusts of the San Nicolas Island: enigmatic algae from a geographically isolated ecosystem. *Western North American Naturalist*, 68: 405-436.
- Fontaine K.M., Stocker-Wörgötter E., Booth T., Piercey-Normore M.D. (2013) Genetic diversity of the lichen-forming alga, *Diplosphaera chodatii*, in North America and Europe. *Lichenologist*, 45: 799-813.
- Foyer C.H., Lelandais M., Kunert K.J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 92: 696-717.
- Friedl T., Lorenz M. (2012) The culture collection of algae at Gottingen University (SAG), A biological resource for biotechnological and biodiversity research. *Procedia Environmental Sciences*, 15: 110-117.
- Fuller B.J. (2004) Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state, *Cryo-Letters*, 25 (6): 375-388.
- Furukawa R., Aso M., Fujita T., Akimoto S., Tanaka R., Tanaka A., Yokono M., Takabayashi A. (2019) Formation of a PSI–PSII megacomplex containing LHCSR and PsbS in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Research*, 132: 867- 880.
- Galera H., Wódkiewicz M., Czyż E., Łapiński S., Kowalska M.E., Pasik M., Rajner M., Bylina P., Chwedorzewska K.J. (2017) First step to eradication of *Poa annua* L. from Point Thomas Oasis (King George Island, South Shetlands, Antarctica). *Polar Biology*, 40: 939-945.
- Gamon J.A., Field C.B., Bilger W., Björkman O., Fredeen A., Peñuelas J. (1990) Remote sensing of the xanthophyll cycle and chlorophyll fluorescence in sunflower leaves and canopies. *Oecologia*, 85: 1-7.
- Gamon J.A., Peñuelas J., Field C.B. (1992) A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Remote Sensing of Environment*, 41: 35-44.
- Gamon J.A., Serrano L., Surfus J.S. (1997) The photochemical reflectance index: An optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types and nutrient levels. *Oecologia*, 112: 492-501.
- Gao B., Li X., Zhang D., Liang Y., Yang H., Chen M., Zhang Y., Zhang J., Wood A.J. (2017) Desiccation tolerance in bryophytes: The dehydration and rehydration transcriptomes in the desiccation-tolerant bryophyte *Bryum argenteum*. *Scientific Reports*, 7: 7571.
- Garbary D.J., Miller A.G., Scrosati R., Kim K.-Y., Schofield W.B. (2008) Distribution and salinity tolerance of intertidal mosses from Nova Scotian salt marshes. *Bryologist*, 111: 282-291.
- García-Plazaola J.I., Esteban R., Fernández-Marín B., Kranner I., Porcar-Castell A. (2012) Thermal energy dissipation and xanthophyll cycles beyond the *Arabidopsis* model. *Photosynthesis Research*, 113: 89-103.
- Garty J., Weissman L., Tamir O., Beer S., Cohen Y., Karnieli A., Orlovsky L. (2000) Comparison of five physiological parameters to assess the vitality of the lichen *Ramalina lacera* exposed to air pollution. *Physiologia Plantarum*, 109: 410-418.

- Gauslaa Y., Solhaug K.A. (2001) Fungal melanins as a sunscreen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria*. *Oecologia*, 126: 462e471.
- Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*, 990: 87-92.
- Gerotto C., Alboresi A., Giacometti G.M., Bassi R., Morosinotto T. (2012) Coexistence of plant and algal energy dissipation mechanisms in the moss *Physcomitrella patens*, *New Phytologist*, 196: 763-773.
- Gilmore A.M. (1997) Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher-plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum*, 99: 197-209.
- Giudici G.N.M., Hájek J., Barták M., Kubešová S. (2018) Comparative research of photosynthetic processes in selected poikilohydric organisms from Mediterranean and Central-European alpine habitats. *Czech Polar Reports*, 8(2): 286-298.
- Giudici G.N.M. (2019) Photoinhibition of primary photosynthetic processes in hydrated *Polytrichum commune*: Analysis of non-photochemical quenching affecting species resistance. *Czech Polar Reports*, 9: 160-169.
- Glazer A.N. (1984) Phycobilisome. A macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 68: 29-51.
- Gloser J., Gloser V. (2007) Changes in spectral reflectance of a foliar lichen *Umbilicaria hirsuta* during desiccation. *Biologia Plantarum*, 51: 395-398.
- Goltsev V.N., Kalaji M.K., Kuzmanova M.A., Allakhverdiev S.I. (2014) Variable and delayed fluorescence of chlorophyll *a* – theoretical foundations and practical application in plant research. Moscow-Izhevsk, Institute of Computer Research, 220 p. (v ruštině).
- Gonzalez Garraza G., Mataloni G., Fermani P., Vinocur A. (2011) Ecology of algal communities of different soil types from Cierva. *Polar Biology*, 34: 339-351.
- Govindjee (1987) Photosynthesis. In 2 vols., vol. 1. Translation from English. Moscow, Mir, 728 p. (v ruštině).
- Govindjee (2002) A role for a light-harvesting antenna complex of photosystem II in photoprotection. *Plant Cell*, 14: 1663-1668.
- Green T.G.A., Schroeter B., Sancho L.G. (2007) Plant life in Antarctica. In: Pugnaire F.I., Valladares F. (Eds), *Handbook of Functional Plant Ecology*, Marcel Dekker Inc. pp. 389-433, 495-543.
- Green T., Sancho L., Pintado A., Schroeter B. (2011a) Functional and spatial pressures on terrestrial vegetation in Antarctica forced by global warming. *Polar Biology*, 34: 1643-1656.
- Green T.G.A., Sancho L.G., Pintado A. (2011b) Ecophysiology of desiccation/rehydration cycles in mosses and lichens. In: Lüttge U., Beck E., Bartels D. (Eds), *Plant Desiccation Tolerance*, Ecological Studies 215, Part 2. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 89-120.
- Greenwood J.L., Stark L.R., Chiquoine L.P. (2019) Effects of rate of drying, life history phase, and ecotype on the ability of the moss *Bryum Argenteum* to survive desiccation events and the influence on conservation and selection of material for restoration. *Frontiers of Ecology and Evolution*, 7: 388. doi: 10.3389/fevo.2019.00388.
- Griffin-Nolan R.J., Zelehowsky A., Hamilton J.G., Melcher P.J. (2018) Green light drives photosynthesis in mosses. *Journal of Bryology*, 40(4): 342-349.
- Guyot G. (1990) Optical properties of vegetation canopies. In: Steven M.D., Clark J.A. (Eds), *Applications of Remote Sensing in Agriculture*. Butterworths, London. pp. 19-43.

- Haboudane D., Miller J.R., Pattey E., Zarco-Tejada P.J., Strachan I.B. (2004) Hyperspectral vegetation indices and novel algorithms for predicting green LAI of crop canopies: Modeling and validation in the context of precision agriculture. *Remote Sensing of Environment*, 90: 337-352.
- Haitz M., Lichtenthaler H.K. (1988) The Measurement of Rfd-Values as Plant Vitality Indices with the Portable Field Chlorophyll Fluorometer and the Pam-Fluorometer. In: Lichtenthaler H.K. (Eds), *Applications of Chlorophyll Fluorescence in Photosynthesis Research, Stress Physiology, Hydrobiology and Remote Sensing*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2823-7_31.
- Hájek T., Beckett R.P. (2008) Effect of water content components on desiccation and recovery in *Sphagnum* mosses. *Annals of Botany*, 101: 165-173.
- Hájek J., Vaczi P., Bartak M., Smejkal L., Lipavska H. (2009b) Cryoprotective role of ribitol in *Xanthoparmelia somloensis*. *Biologia plantarum*, 53(4): 677-684.
- Hájek J., Vaczi P., Bartak M. (2009a) Photosynthetic electron transport at low temperatures in the green algal foliose lichens *Lasallia pustulata* and *Umbilicaria hirsuta* affected by manipulated levels of ribitol. *Photosynthetica*, 47(2): 199-205.
- Hájek T., Tuittila E.-S., Ilomets M., Laiho R. (2009c) Light responses of mire mosses: a key to survival after water-level drawdown? *Oikos*, 118: 240-250.
- Hájek J., Vaczi P., Bartak M., Jahnova L. (2012) Interspecific differences in cryoresistance of lichen symbiotic algae of genus *Trebouxia* assessed by cell viability and chlorophyll fluorescence. *Cryobiology*, 64: 215-222.
- Hájek J., Barták M., Hazdrová J., Forbelska M. (2016) Sensitivity of photosynthetic processes to freezing temperature in extremophilic lichens evaluated by linear cooling and chlorophyll fluorescence. *Cryobiology*, 73 (3): 329-334.
- Hájek J., Hojdová A., Trnková K., Váczi P., Bednaříková M., Barták M. (2021) Responses of thallus anatomy and chlorophyll fluorescence-based photosynthetic characteristics of two Antarctic species of genus *Usnea* to low temperature. *Photosynthetica*, 59 (1): 95-105.
- Hamerlynck E.P., Tuba Z., Csintalan Z., Nagy Z., Henebry G., Goodin D. (2000) Diurnal variation in photochemical dynamics and surface reflectance of the desiccation-tolerant moss, *Tortula ruralis*. *Plant Ecology*, 151: 55-63.
- Handa S., Nakahara M., Nakano T., Itskovich V.B. And Masuda Y. (2001) Aerial algae from southwestern area of Lake Baikal. *Hikobia*, 13(3): 463-472.
- Haranczyk H., Casanova-Katny A., Olech M., Strzalka K. (2017) Dehydration and freezing resistance of lichenized fungi. In: Shukla V., Kumar S., Kumar N. (Eds), *Plant Adaptation Strategies in Changing Environment*, Springer Nature Singapore Pte Ltd, pp. 77-102.
- Harris A. (2008) Spectral reflectance and photosynthetic properties of *Sphagnum* mosses exposed to progressive drought. *Ecohydrology*, 1: 35-42.
- Heber U., Bukhov N.G., Shuvalov V.A., Kobayashi Y., Lange O.L. (2001) Protection of the photosynthetic apparatus against damage by excessive illumination in homoiohydric leaves and poikilohydric mosses and lichens. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1999-2006.
- Heber U., Bilger W., Shuvalov V.A. (2006a) Thermal energy dissipation in reaction centers of photosystem II protects desiccated poikilohydric mosses against photooxidation. *Journal of Experimental Botany*, 57: 2993-3006.
- Heber U., Lange O.L., Shuvalov V.A. (2006b) Conservation and dissipation of light energy as complementary processes: Homoiohydric and poikilohydric autotrophs. *Journal of Experimental Botany*, 57: 1211-1223.

- Heber U., Azarkovich M., Shuvalov V. (2007) Activation of mechanisms of photoprotection by desiccation and by light: poikilohydric photoautotrophs. *Journal of Experimental Botany*, 58(11): 2745-2759.
- Heber U. (2008) Photoprotection of green plants: a mechanism of ultra-fast thermal energy dissipation in desiccated lichens. *Planta*, 228(4): 641-650.
- Heber U. (2012) Conservation and dissipation of light energy in desiccation-tolerant photoautotrophs, two sides of the same coin. *Photosynthesis Research*, 113: 5-13.
- Hedenäs L. (1989) The genus *Sanionia* (Musci) in Northwestern Europe, a taxonomic revision. *Annales Botanici Fennici*, 26: 399-419.
- Hedenäs L. (2003) Amblystegiaceae (Musci). *Flora Neotropica Monograph*, 89: 1-107. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00327>.
- Honegger R., Peter M., Scherrer S. (1996) Drought-induced structural alterations at the mycobiont-photobiont interface in a range of foliose macrolichens. *Protoplasma*, 190: 221-232.
- Honegger R. (2009) Lichen-forming fungi and their photobionts. In: The Mycota V. (Chapter 16) Deising H.B. (Eds), Springer, Berlin Heidelberg, pp. 307-333.
- Horton P., Hague A. (1988) Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. 4. Resolution of non-photochemical quenching. *Biochimica et Biophysica Acta*, 932: 107-115.
- Hovind A.B.A., Phinney N.H., Gauslaa Y. (2020) Functional trade-off of hydration strategies in old forest epiphytic cephalolichens. *Fungal Biology*, 124: 903e913.
- Hu R., Xiao L., Bao F., Li X., He Y. (2016) Dehydration-responsive features of *Atrichum undulatum*. *Journal of Plant Research*, 129: 945-954.
- Hughes K.A., Pescott O.L., Peyton J., Adriaens T., Cottier-Cook E.J., Key G., Rabitsch W., Tricarico E., Barnes D.K.A., Baxter N., Belchier M., Blake D., Convey P., Dawson W., Frohlich D., Gardiner L.M., González-Moreno P., James R., Malumphy C., Martin S., Martinou A.F., Minchin D., Monaco A., Moore N., Morley S.A., Ross K., Shanklin J., Turvey K., Vaughan D., Vaux A.G.C., Werenkraut V., Winfield I.J., Roy H.E. (2020) Invasive non-native species likely to threaten biodiversity and ecosystems in the Antarctic Peninsula region. *Global Change Biology*, 26: 2702-2716.
- Huwe B., Fiedler A., Moritz S., Rabbow E., de Vera J.P., Joshi J. (2019) Mosses in Low Earth Orbit: Implications for the Limits of Life and the Habitability of Mars. *Astrobiology*, 19(2): 221-232.
- Jahns P., Latowski D., Strzalka K. (2009) Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787: 3-14.
- Jassey V.E.J., Signarbieux C. (2019) Effects of climate warming on *Sphagnum* photosynthesis in peatlands depend on peat moisture and species-specific anatomical traits. *Global Change Biology*. <https://doi.org/10.1111/gcb.14788>.
- Joliot P., Lavergne J., Beal D. (1992) Plastoquinone compartmentation in chloroplasts: I. Evidence for domains with different rates of photoreduction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1101: 1-12.
- Jupa R., Hájek J., Hazdrová J., Barták M. (2012) Interspecific differences in photosynthetic efficiency and spectral reflectance in two *Umbilicaria* species from Svalbard during controlled desiccation. *Czech Polar Reports*, 2(1): 31-41.
- Kalaji H.M., Schansker G., Ladle R.J., Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S.I., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Dąbrowski P., Elsheery N.I., Ferroni L., Guidi L., Hogewoning S.W., Jajoo A., Misra A.N., Nebauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Poli D., Pollastrini M., Romanowska-Duda Z.B., Rutkowska B., Serodio J., Suresh K., Szulc W., Tambussi E., Yannicari M., Zivcak M. (2014) Frequently asked questions about *in vivo* chlorophyll fluorescence: practical issues, *Photosynthesis Research*, 122: 121-158.

- Kappen L. (1973) Responses to extreme environments. In: Ahmadjian V., Hale M.E. (Eds), *The Lichens*. Academic Press, London, pp. 311-380.
- Kappen L. (1988) Ecophysiological relationships in different climatic regions. In: Galun M. (Eds), *Handbook of Lichenology*, vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 37-100.
- Kappen L. (1993) Plant activity under snow and ice, with particular reference to lichens. *Arctic*, 46: 297-302.
- Kappen L. (2000) Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. *Antarctic Science*, 12: 314-324.
- Kappen L., Schroeter B. (2002) Plants and lichens in the Antarctic, their way of life and their relevance to soil formation. In book: *Geoecology of Antarctic Ice-Free Coastal Landscapes*, pp. 327-373.
- Kennedy A.D. (1993) Water as a Limiting Factor in the Antarctic Terrestrial Environment: A Biogeographical Synthesis. *Arctic and Alpine Research*, 25: 308-315.
- Kiang N.Y., Siefert J., Govindjee, Blankenship R.E. (2007a) Spectral signatures of photosynthesis. I. Review of earth organisms. *Astrobiology*, 7: 222-251.
- Kiang N.Y., Segura A., Tinetti G., Govindjee, Blankenship R.E., Cohen M., Siefert J., Crisp D., Meadows V.S. (2007b) Spectral signatures of photosynthesis. II. Coevolution with other stars and the atmosphere on extrasolar worlds. *Astrobiology*, 7: 252-274.
- Killi D., Haworth M. (2017) Diffusive and metabolic constraints to photosynthesis in quinoa during drought and salt stress. *Plants-Basel*, 6: 49.
- Kleefeld A., Gypser S., Herppich W.B., Bader G., Veste M. (2018) Identification of spatial pattern of photosynthesis hotspots in moss- and lichen-dominated biological soil crusts by combining chlorophyll fluorescence imaging and multispectral BNDVI images. *Pedobiologia*, 68: 1-11.
- Kodru S., Malavath T., Devadasu E., Nellaepalli S., Stirbet A., Subramanyam R., Govindjee (2015) The slow S to M rise of chlorophyll a fluorescence reflects transition from state 2 to state 1 in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research*, 125: 219-231.
- Komárek O., Komárek J. (1999) Diversity of freshwater and terrestrial habitats and their oxyphototroph microflora in the Arctowski Station region, South Shetlands Islands. *Polish Polar Research*, 20(3): 259-282.
- Komárek J., Elster J., Komárek O. (2008) Diversity of the cyanobacterial microflora of the northern part of James Ross Island, NW Weddell Sea, Antarctica. *Polar Biology*, 31: 853-865.
- Komura M., Yamagishi A., Shibata Y., Iwasaki I., Itoh S. (2010) Mechanism of strong quenching of photosystem II chlorophyll fluorescence under drought stress in a lichen, *Physciella melanclia*, studied by subpicosecond fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797: 331-338.
- Korneev D.Yu. (2002) Informational possibilities of the chlorophyll fluorescence induction method. Kiev, Alterpres, 188 p. (v ruštině).
- Koster K.L., Balsamo R.A., Espinoza C., Oliver M.J. (2010) Desiccation sensitivity and tolerance in the moss *Physcomitrella patens*: assessing limits and damage. *Plant Growth Regulation*, 62: 293-302.
- Kotlova E. R., Sinyutina N.F. (2007) Changes in the content of individual lipid classes of a lichen *Peltigera aphthosa* during dehydration and subsequent rehydration. *Russian Journal of Plant Physiology* 52: 35-42.
- Kranner I., Beckett R.P., Wornik S., Zorn M., Pfeifhofer H.W. (2002) Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *Plant Journal*, 31: 13-24.

- Kranner I., Birtic F. (2005) A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 734-740.
- Kranner I., Beckett R., Hochman A., Nash T.H. (2008) Desiccation-tolerance in lichens: A review. *Bryologist*, 111: 576-593.
- Krause H., Weis W. (1991) Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 313-349.
- Krochko J.E., Bewley J.D., Pacey J. (1978) The Effects of Rapid and Very Slow Speeds of Drying on the Ultrastructure and Metabolism of the Desiccation-Sensitive Moss *Cratoneuron filicinum* (Hedw.) Spruce. *Journal of Experimental Botany*, (29) 111: 905-917.
- Kudoh S., Kashino Y., Imura S. (2003) Ecological studies of aquatic moss pillars in Antarctic lakes. Light response and chilling and heat sensitivity of photosynthesis. *Polar Bioscience*, 16: 33-42.
- Kviderova J., Hájek J., Worland R.M. (2013) The ice nucleation activity of extremophilic algae. *Cryo-Letters*, 34: 137-148.
- Laine A.M., Juurola E., Hájek T., Tuittila E.-S. (2011) *Sphagnum* growth and ecophysiology during mire succession. *Oecologia*, 167: 1115-1125.
- Lange O.L., Meyer A., Zellner H., Ullmann I., Wessels D.C.J. (1990) Eight days in the life of a desert lichen: Water relations and photosynthesis of *Teloschistes capensis* in the coastal fog zone of the Namib desert. *Madoqua*, 17: 17-30.
- Lange O.L., Green T.G.A., Heber U. (2001) Hydration-dependent photosynthetic production of lichens: what do laboratory studies tell us about field performance? *Journal of Experimental Botany*, 52 (363): 2033-2042.
- Lazár D. (2003) Chlorophyll a fluorescence rise induced by high light illumination of dark-adapted plant tissue studied by means of a model of photosystem II and considering photosystem II heterogeneity. *Journal of Theoretical Biology*, 220(4): 469-503.
- Leung J., Giraudat J. (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 199-222.
- Li H., Liu X., Wang Y., Hu H., Xu X. (2009) Enhanced expression of antifreeze protein genes drives the development of freeze tolerance in an Antarctica isolate of *Chlorella vulgaris*. *Progress in Natural Science*, 19(9): 1059-1062.
- Li J., Li X., Chen C. (2014) Degradation and reorganization of thylakoid protein complexes of *Bryum argenteum* in response to dehydration and rehydration. *Bryologist*, 117: 110-118.
- Lokhorst G.M. (1992) Taxonomic Studies in the Genus *Heterococcus* (Tribophyceae, Tribonematales, Heteropodiaceae). A Combined Cultural and Electron Microscopy Study, Gustav Fischer. Stuttgart, Jena, New York, 246 pp.
- Lovelock C.E., Robinson S.A. (2002) Surface reflectance properties of Antarctic moss and their relationship to plant species, pigment composition and photosynthetic function. *Plant Cell and Environmental*, 25(10): 1239-1250.
- Lud D., Moerdijk T.C.W., Van De Poll W.H., Buma A.G.J., Huiskes A.H.L. (2002) DNA damage and photosynthesis in Antarctic and Arctic *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske under ambient and enhanced levels of UV-B radiation. *Plant, Cell and Environment*, 25: 1579-1589.
- Lud D., Schlenz M., Schroeter B., Huiskes A.H.L. (2003) The influence of UV-B radiation on light-dependent photosynthetic performance in *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske in Antarctica. *Polar Biology*, 26: 225-232.
- Lukešová A., Hoffmann L. (1996) Soil algae from acid rain impacted forest areas of the Krušnéhory Mts. 1. Algal communities. *Vegetatio*, 125: 123-136.

- Lüttge U., Meirelles S.T., de Mattos E.A. (2008) Strong quenching of chlorophyll fluorescence in the desiccated state in three poikilohydric and homoiochlorophyllous moss species. Chlorophyll fluorescence measurement in bryophyte ecophysiology indicates photo-oxidative protection on highly light-exposed rocks of a tropical inselberg. *Journal of Plant Physiology*, 165: 172-181.
- Lyon B.R., Mock T. (2014) Polar microalgae: new approaches towards understanding adaptations to an extreme and changing environment. *Biology*, 3: 56-80.
- Ma Y.Z., Holt N.E., Li X.P., Niyogi K.K., Fleming G.R. (2003) Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 100: 4377-4382.
- Mahajan S., Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: An Overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158.
- Malenovský Z., Turnbull J.D., Lucieer A., Robinson S.A. (2015) Antarctic moss stress assessment based on chlorophyll content and leaf density retrieved from imaging spectroscopy data. *New Phytologist*, 208: 608-624.
- Maoka T. (2020) Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74: 1-16.
- Marcinkowska-Ochtyra A., Zagajewski B., Raczek E., Ochtyra A., Jarocińska A. (2018) Classification of High-Mountain Vegetation Communities within a Diverse Giant Mountains Ecosystem Using Airborne APEX Hyperspectral Imagery. *Remote Sensing*, 10 (4): 570.
- Marečková M., Bartak M. (2016) Effects of short-term low temperature stress on chlorophyll fluorescence transients in Antarctic lichen species. *Czech Polar Reports*, 6(1): 54-65.
- Marschall M., Proctor M.C.F., Smirnoff N. (1998) Carbohydrate composition and invertase activity of the leafy liverwort *Porella platyphylla*. *New Phytologist*, 138: 343-353.
- Marschall M., Proctor M.C.F. (1999) Desiccation tolerance and recovery of the leafy liverwort *Porella platyphylla* (L.) Pfeiff.: chlorophyll-fluorescence measurements. *Journal of Bryology* 21: 261-267.
- Marschall M., Proctor M.C.F. (2004) Are Bryophytes shade plants? Photosynthetic light responses and proportions of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total carotenoids. *Annals of Botany*, 94: 593-603.
- Marschall M., Borbély P., Pné-Kónya E., Süto S. (2018) Background processes and the components of photoprotection and regeneration under rehydration in desiccation-tolerant and desiccation-sensitive bryophytes. In: *Book for the Plant Biology. Europe Conference in Copenhagen*, p. 80.
- Masoz S., Hanikenne M., Bailleul B., Coosemans N., Radoux M., Miranda-Astudillo H., Cardol P., Larosa V., Remacle C. (2017) *In vivo* chlorophyll fluorescence screening allows the isolation of a *Chlamydomonas* mutant defective for NDUF3, an assembly factor involved in mitochondrial complex I assembly. *Plant Journal*, 92: 584-595.
- Mathur S., Allakhverdiev S.I., Jajoo A. (2011) Analysis of high temperature stress on the dynamics of antenna size and reducing side heterogeneity of photosystem II in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807: 22-29.
- Matorin D.N., Rubin A.B. (2012) Chlorophyll fluorescence of higher plants and algae. Moscow-Izhevsk: Institute of Computer Research, 256 p. (v ruštině).
- Maxwell K., Johnson G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659-668.
- May J.L., Parker T., Unger S., Oberbauer S.F. (2018) Short term changes in moisture content drive strong changes in Normalized Difference Vegetation Index and gross primary productivity in four Arctic moss communities. *Remote Sensing of Environment*, 212: 114-120.
- Mayaba N., Minibayeva M., Beckett R.P. (2002) An oxidative burst of hydrogen peroxide during rehydration following desiccation in the moss *Atrichum androgynum*. *New Phytologist*, 155: 275-283.

- Meeßen J., Sánchez F.J., Brandt A., Balzer E.M., De La Torre R., Sancho L.G., De Vera J.P., Ott S. (2013) Extremotolerance and Resistance of Lichens: Comparative Studies on Five Species Used in Astrobiological Research I. Morphological and Anatomical Characteristics. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 43 (3): 283-303.
- Melick D.R., Seppelt R.D. (1994) Seasonal investigation of soluble carbohydrates and pigment levels in Antarctic bryophytes and lichens. *The Bryologist*, 97: 13-19.
- Michetti K.M., Leonardi P.I., Caceres E.J. (2010) A comprehensive study of the life cycle of a South American population of *Stigeoclonium tenue* (Chaetophorales, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 46: 997-1005.
- Mishra A., Hájek J., Tuhačková T., Bartak M., Mishra K.B. (2015) Features of chlorophyll fluorescence transients can be used to investigate low temperature induced effects on photosystem II of algal lichens from polar regions. *Czech Polar Reports* 5: 99-111.
- Mishra K.B., Vitek P., Barták M. (2019) A correlative approach, combining chlorophyll *a* fluorescence, reflectance, and Raman spectroscopy, for monitoring hydration induced changes in Antarctic lichen *Dermatocarpon polyphyllizum*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 208: 13-23.
- Mishra K.B., Vitek P., Mishra A., Hájek J., Barták M. (2020) Chlorophyll *a* fluorescence and Raman spectroscopy can monitor activation/deactivation of photosynthesis and carotenoids in Antarctic lichens. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 239: 118458.
- Morgan-Kiss R.M., Priscu J.C., Pockock T., Gudynaite-Savitch L., Huner N.P.A. (2006) Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 222-252.
- Morosinotto T., Baronio R., Bassi R. (2002) Dynamics of chromophore binding to Lhc proteins in vivo and *in vitro* during operation of the xanthophyll cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 36913-36920.
- Morris G.J., Coulson G.E., Clarke K.J. (1981) Freezing Injury in *Chlamydomonas*: a Synoptic Approach, Effects of Low Temperatures on Biological Membranes. Academic Press, London, New York, pp. 390-399.
- Mrozinska T., Olech M.A., Massalski A. (1998) Algae of ponds and a stream on moraines of Ecology Glacier (King George Island, South Shetland Islands, Antarctica). *Nova Hedwigia*, 67: 169-188.
- Muller P., Li X.P., Niyogi K.K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*, 125: 1558-1566.
- Murray K.J., Tenhunen J.D., Nowak R.S. (1993) Photoinhibition as a control on photosynthesis and production of *Sphagnum* mosses. *Oecologia*, 96: 200-207.
- Nabe H., Funabiki R., Kashino Y., Koike H., Satoh K. (2007) Responses to desiccation stress in bryophytes and an important role of dithiothreitol – Insensitive non-photochemical quenching against photoinhibition in dehydrated states. *Plant Cell Physiology*, 48(11): 1548-1557.
- Nagao M., Minami A., Arakawa K., Fujikawa S., Takezawa D. (2005) Rapid degradation of starch in chloroplast and concomitant accumulation of soluble sugars associated with ABA-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Physiology*, 162(2): 169-80.
- Nayaka S., Saxena P. (2014) Physiological responses and ecological success of lichen *Stereocaulon foliolosum* and moss *Racomitrium subsecundum* growing in same habitat in Himalaya. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 4(3): 167-179.
- Nedbalová L., Mihál M., Kviderová J., Procházková L., Řezanka T., Elster J. (2017) Identity, ecology and ecophysiology of planktic green algae dominating in ice-covered lakes on James Ross Island (northeastern Antarctic Peninsula). *Extremophiles*, 73 (21): 187-200.

- Neta T., Cheng Q., Bello R.L., Hu B. (2010) Lichens and mosses moisture content assessment through high-spectral resolution remote sensing technology: a case study of the Hudson Bay Lowlands, Canada. *Hydrological Processes*, 24: 1617-1628.
- Newsham K.K., Hodgson A.W., Murray A.W.A., Peat H.J., Smith R.I.L. (2002) Response of two Antarctic bryophytes to stratographic ozone depletion. *Global Change Biology*, 8: 972-983.
- Nilkens M., Kress E., Lambrev P., Miloslavina Y., Muller M., Holzwarth A.R., Jahns P. (2010) Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797: 466-475.
- Nishiyama T., Tomomichi F., Shin-I T., Seki M., Nishide H., Uchiyama I., Kamiya A., Carninci P., Hayashizaki Y., Shinozaki K., Kohara Y., Hasebe M. (2003) Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: Implication for land plant evolution. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 100: 8007-8012.
- Niyogi K.K., Li X.-P., Rosenberg V., Jung H.-S. (2005) Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, 56: 375-382.
- Noctor G., Horton P. (1990) Uncouple titration of energy-dependent chlorophyll fluorescence quenching and photosystem II photochemical yield in intact pea chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1016: 228-234.
- Ochyra R., Lewis Smith R.I., Bendarek-Ochyra H. (2008) The Illustrated moss flora of Antarctica. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 704.
- Olech M. (2004) Lichens of King George Island, Antarctica. Drukarnia Uniwersytetu Jagiellńskiego, Kraków, 391 p.
- Oliver M.J., Mishler B.D., Quisenberry J.E. (1993) Comparative measures of desiccation-tolerance in the *Tortula ruralis* complex. I. Variation in damage control and repair. *American Journal of Botany*, 80: 127-136.
- Oliver M.J. (1996) Desiccation tolerance in vegetative plant cells. *Physiologia Plantarum*, 97(4): 779-787.
- Oliver M.J., Velten J., Wood A.J. (2000) Bryophytes as experimental models for the study of environmental stress tolerance: *Tortula ruralis* and desiccation-tolerance in mosses. *Plant Ecology*, 151:73-84.
- Oliver M.J., Dowd S.E., Zaragoza J., Mauget S.A., Payton P.R. (2004) The rehydration transcriptome of the desiccation tolerant bryophyte *Tortula ruralis*: transcript classification and analysis. *BMC Genomics*, 5: 89.
- Oliver M.J., Velten J., Mischler B.D. (2005) Desiccation tolerance in bryophytes: a reflection of a primitive strategy for plant survival in dehydrating habitats. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 788-799.
- Orehova A., Marečková M., Hazdrová J., Barták M. (2018a) The effect of upper cortex absence on spectral reflectance indices in Antarctic lichens during thallus dehydration. *Czech Polar Reports*, (8)1: 107-118.
- Orehova A., Barták M., Hájek J. (2018b) Post rapid freezing growth of Antarctic strain of *Heterococcus* sp. monitored by cell viability and chlorophyll fluorescence. *Cryobiology*, (85) 6: 39-46.
- Orehova A., Barták M., Ozkar A., Elster J. (2019) The effect of shock freezing on physiological properties and consequent growth of Antarctic filamentous (*Stigeoclonium* sp.) and coccal alga (*Diplospira chodatii*) on agar plates. *Czech Polar Reports*, (9)1: 37-48.
- Orehova A., Barták M., Hájek J., Morkusová J. (2021a) Species-specific responses of spectral reflectance and photosynthetic characteristics in two selected Antarctic mosses to thallus desiccation. *Acta Physiologiae Plantarum*. in press.

- Orekhova A., Barták M., Hájek J. (2021b) Resistance of Antarctic moss *Sanionia uncinata* to photoinhibition: chlorophyll fluorescence analysis of samples from the western and eastern coasts of the Antarctic Peninsula. *Plant Biology*. doi: 10.1111/plb.13270.
- Øvstedal D.O., Lewis-Smith R.I. (2001) Lichens of Antarctica and South Georgia, A Guide to their identification and ecology. Cambridge University Press, 411 p.
- Øvstedal D.O., Lewis Smith R.I. (2004) Further additions to the lichen flora of Antarctica and South Georgia. *Nova Hedwigia*, 88: 157-168.
- Øvstedal D.O., Lewis Smith R.I. (2011) Four additional lichens from the Antarctic and South Georgia, including a new *Leciophysma* species. *Folia Cryptogamica Estonica*, Fasc. 48, pp. 65-68.
- Paciolla M., Tommasi F. (2003) The ascorbate system in two bryophytes: *Brachythecium velutinum* and *Marchantia polymorpha*. *Biologia plantarum*, 47: 387-393.
- Pannewitz S., Green A.T.G., Schlenzog M., Seppelt R., Sancho L.G., Schroeter B. (2006) Photosynthetic performance of *Xanthoria mawsonii* C. W. Dodge in coastal habitats, Ross Sea region, continental Antarctica. *The Lichenologist*, 38(1): 67-81.
- Papageorgiou G.C., Govindjee (2004) Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. – Advances in Photosynthesis and Respiration, Springer, vol. 19, p. 793.
- Papageorgiou G.C., Tsimilli-Michael M., Stamatakis K. (2007) The fast and slow kinetics of chlorophyll *a* fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: A viewpoint. *Photosynthesis Research*, 94: 275-290.
- Papageorgiu G.C., Govindjee (2011) Photosystem II fluorescence: Slow changes – Scaling from the past. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 104: 258-270.
- Parra O.O., Redon J. (1977) Aislamiento de *Heterococcus caespitosus* Vischer ficobionte de *Verrucaria maura* Wahlenb. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción*, 51: 219-224.
- Paulsen H. (1998) Auroxanthin promotes energy dissipation in light-harvesting complexes. Photochemistry and Photobiology Dec. online abstract. <http://www.findarticles.com/p/articles/mi_qa3931/is_199812/ai_n8818901>.
- Peel M.C., Finlayson B.L., McMahon T.A. (2007) Updated world map of the Köppen–Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences*, 11: 1633-1644.
- Peng X., Deng X., Tang X., Tan T., Zhang D., Liu B., Lin H. (2019) Involvement of Lhcb6 and Lhcb5 in Photosynthesis Regulation in *Physcomitrella patens* Response to Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 20: 3665.
- Peñuelas J., Frederic B., Andfilella I. (1995) Semi-Empirical indices to assess carotenoids/chlorophyll *a* ratio from leaf spectral reflectance. *Photosynthetica*, 31: 221-230.
- Peñuelas J., Gamon J.A., Fredeen A.L., Merino J., Andfield C.B. (1994) Reflectance indices associated with physiological changes in nitrogen- and water-limited sunflower leaves. *Remote Sensing of Environment*, 48: 135-146.
- Petzold D.E., Goward S.N. (1988) Reflectance spectra of subarctic lichens. *Remote Sensing of Environment*, 24: 481-492.
- Pinnola A., Dall'Osto L., Gerotto C., Morosinotto T., Bassi R., Alboresi A. (2013) Zeaxanthin Binds to Light-Harvesting Complex Stress-Related Protein to Enhance Nonphotochemical Quenching in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, 25: 3519-3534.
- Pitschmann H. (1963) Vorarbeiten zu einer Monographie der Gattung *Heterococcus*. *Nova Hedwigia*, 5: 487-531.
- Pizarro M., Contreras R.A., Köhler H., Zúñiga G.E. (2019) Desiccation tolerance in the Antarctic moss *Sanionia uncinata*. *Biological Research*, 52: 46.

- Platt K.A., Oliver M., Thomson W.W. (1993) Membranes and organelles of dehydrated *Selaginella* and *Tortula* retain their normal configuration and structural integrity – freeze-fracture evidence. *Plant Physiology*, 102: 89-89.
- Popp M., Smirnov N. (1995) Polyol accumulation and metabolism during water deficit. In: Smirnov N. (Eds), *Environment and Plant metabolism – flexibility and acclimation*. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK., pp. 199-215.
- Post A., Adamson E., Adamson H. (1990) Photoinhibition and recovery of photosynthesis in Antarctic bryophytes under field conditions. In: Baltscheffsky M. (Eds), *Current research in photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, vol IV, pp. 635-638.
- Potts M., Slaughter S.S., Hunneke F.-U., Garst J.F., Helm R.F. (2005) Desiccation tolerance of prokaryotes: application of principles to human cells. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 800-809.
- Pressel S., Ligrone R., Duckett J.G. (2006) The effects of de- and rehydration on foodconducting cells in the moss *Polytrichum formosum* Hedw: A cytological study. *Annals of Botany*, 98: 67-76.
- Proctor M.C.F. (1990) The physiological basis of bryophyte production. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 104: 61-77.
- Proctor M.C.F. (2000) Physiological ecology. In: Goffinet B., Shaw A.J. (Eds), *Bryophyte Biology*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 225-247.
- Proctor M.C.F., Smirnov N. (2000) Rapid recovery of photosystems on rewetting desiccation tolerant mosses: chlorophyll fluorescence and inhibitor experiments. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1695-1704.
- Proctor M.C.F., Ligrone R., Duckett J.G. (2007) Desiccation tolerance in the Moss *Polytrichum formosum*: Physiological and fine-structural changes during desiccation and recovery. *Annals of Botany*, 99: 1243.
- Proctor M.C.F. (2010) Recovery rates of chlorophyll-fluorescence parameters in desiccation-tolerant plants: fitted logistic curves as a versatile and robust source of comparative data. *Plant Growth Regulation*, 62: 233-240.
- Pushparaj B., Paperi R., Sili C., Piccardi R., Faraloni C., Ena A., Torzillo G. (2004) Antarctic micro-organisms for bioactive compound production: Isolation and characterization of cyanobacteria. In: Luporini P., Morbidoni M. (Eds), *Proceedings of the 5th PNRA Meeting on Antarctic Biology, Scientific and Technical Report Series*, pp. 11-18.
- Putzke J., Pereira A.B. (2001) *The Antarctic mosses with special reference to the Shetland Island*. Canoas, Lutheran University of Brazil, Editora da Ulbra, 196 p.
- Raabova L., Kovačik L. (2013) Four aeroterrestrial algae grown at a special substrate of deglaciated coastal areas of Petuniabukta, Svalbard. *Czech Polar Reports*, 3(2): 157-162.
- Rastogi A., Stróżecki M., Kalaji H.M., Łuców D., Lamentowicz M., Juszczak R. (2019) Impact of Warming and Reduced Precipitation on Photosynthetic and Remote Sensing Properties of Peatland Vegetation. *Environmental and Experimental Botany*, 160: 71-80.
- Rastogi A., Antala M., Gąbka M., Rosadziński S., Stróżecki M., Brestic M., Juszczak R. (2020) Impact of warming and reduced precipitation on morphology and chlorophyll concentration in peat mosses (*Sphagnum angustifolium* and *S. fallax*). *Scientific Reports*: 10, Article number: 8592.
- Raymond J.A., Janech M.G., Fritsen Ch. (2009) Novel ice-binding proteins from a psychrophilic Antarctic alga (Chlamydomonadaceae, Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 45(1): 130-136.
- Reed R.H., Richardson D.L., Stewart W.D.P. (1986) Osmotic responses of unicellular bluegreen algae (cyanobacteria): changes in cell volume and intracellular solute levels in response to hyperosmotic treatment. *Plant Cell and Environmental*, 9: 25-31.

- Reigosa M.J. (1997) Técnicas de medida de la fluorescencia in vivo en ecofisiología Vegetal. In: Reigosa M.J., Pedrol N. (Eds), Manual de Técnicas en Ecofisiología Vegetal. Vigo, Spain. Gamesal, pp. 21-30.
- Richardson D.H.S., Smith D.C. Carbohydrate movement from the *Trebouxia* symbiont of *Xanthoria aureola* to the fungus. *New Phytologist*, 67: 61-68.
- Rippin M., Borchhardt N., Williams L., Colesie C., Jung P., Budel B., Karsten U., Becker B. (2018) Genus richness of microalgae and Cyanobacteria in biological soil crusts from Svalbard and Livingston Island: morphological versus molecular approaches. *Polar Biology*, 41: 909-923.
- Robinson S.A., Wasley J., Popp M., Lovelock C.E. (2000) Desiccation tolerance of three moss species from continental Antarctica. *Australian Journal of Plant Physiology*, 27: 379-388.
- Robinson S.A., Wasley J., Tobin A.K. (2003) Living on the edge – plants and global change in continental and maritime Antarctica. *Global Change Biology*, 9: 1681-1717.
- Robinson S.A., Waterman M.J. (2014) Sunsafe bryophytes: Photoprotection from excess and damaging solar radiation. In: Hanson D.T., Rice S.K. (Eds), Photosynthesis in Bryophytes and Early Land Plants, pp. 113-130.
- Roháček K., Barták M. (1999) Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica*, 37: 339-363.
- Roháček K. (2010) Method for resolution and quantification of components of the non-photochemical quenching (qN). *Photosynthesis Research*, 105: 101-113.
- Ronen R., Galun M. (1984) Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of Chlorophyll degradation. *Environmental and Experimental Botany*, 24: 239-245.
- Roser D.J., Melick D.R., Ling H.U., Seppelt R.D. (1992) Polyol and sugar content of terrestrial plants from continental Antarctica. *Antarctic Science*, 4: 413-420.
- Rouse J.W., Haas R.H., Schell J.A., Deering D.W. (1974) Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS. In: Freden S.C., Mercanti E.P., Becker M. (Eds), Third Earth Resources Technology Satellite-1 Symposium, vol. I: Technical Presentations, NASA SP-351, NASA, Washington, D.C., pp. 309-317.
- Rubin A.B. (2013) Biophysics: in 3 volumes. Vol. III. Biophysics of cellular processes. Mechanisms of primary photobiological processes. Moscow-Izhevsk, Institute of Computer Research, 480 p. (v ruštině).
- Rundel P.W. (1988) Water relations. In: Galun M. (Eds), Handbook of lichenology. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 17-36.
- Rütten D., Santarius K.A. (1992) Age-related differences in frost sensitivity of the photosynthetic apparatus of two *Plagiomnium* species. *Planta*, 187(2): 224-229.
- Rybalka N., Andersen R.A., Kostikov I., Mohr K.I., Massalski A., Olech M., Friedl T. (2009) Testing for endemism, genotypic diversity and species concepts in Antarctic terrestrial microalgae of the Tribonemataceae (Stramenopiles, Xanthophyceae). *Environmental Microbiology*, 11(3): 554-565.
- Šabacka M., Elster J. (2006) Response of cyanobacteria and algae from Antarctic. *Polar Biology*, 30: 31-37.
- Sancho L., Pintado A., Green A. (2019) Antarctic Studies Show Lichens to be Excellent Biomonitors of Climate Change. *Diversity*, 11: 42.
- Sancho L., De los Ríos A., Pintado A., Colesie C., Raggio J., Ascaso C., Green A. (2020) *Himantormia lugubris*, an Antarctic endemic on the edge of the lichen symbiosis. *Symbiosis*, 82: 49-58.
- Scheidegger C., Axelrod E. (2000) Low-frequency acoustic radiation during desiccation of *Lobaria pulmonaria*. In: Schroeter B., Schlenzog M., Green T.G.A. (Eds), New aspects in 592 The Bryologist 111(4): 2008 Cryptogamic research: Contributions in honour of Ludger Kappen. *Bibliotheca Lichenologica*, 75: 161-170.

- Schlenzogl M., Schroeter B. (2001) A new method for the accurate in site monitoring of chlorophyll a fluorescence in lichens and bryophytes. *Lichenologist*, 33(5): 443-452.
- Schlenzogl M., Pannowitz S., Green T.G.A., Schroeter B. (2004) Metabolic recovery of continental Antarctic cryptogams after winter. *Polar Biology*, 27: 399-400.
- Schreiber U., Schliwa U., Bilger W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*, 10: 51-62.
- Schroeter B., Scheidegger C. (1995) Water relations in lichens at subzero temperatures: structural changes and carbon dioxide exchange in the lichen *Umbilicaria aprina* from continental Antarctica. *New Phytologist*, 131: 275-285.
- Schroeter B., Green T.G.A., Kulle D., Pannowitz S., Schlenzogl M., Sancho L.G. (2012) The moss *Bryum argenteum* var. *muticum* Brid. is well adapted to cope with high light in continental Antarctica. *Antarctic Science*, 24: 281-291.
- Seaton G.G., Walker D.D. (1990) Chlorophyll fluorescence as a measure of photosynthetic carbon assimilation. *Proceedings of Royal Society*, 242: 29-35.
- Seel W.E., Baker N.R., Lee J.A. (1992a) Analysis of the decrease in photosynthesis on desiccation of mosses from xeric and hydric environments. *Physiologia Plantarum*, 86: 451-458.
- Seel W.E., Hendry G.A.F., Lee J.A. (1992b) The combined effects of desiccation and irradiance on mosses from xeric and hydric habitats. *Journal of Experimental Botany*, 4: 1023-1031.
- Siddiqui K.S., Cavicchioli R. (2006) Cold-adapted enzymes. *The Annual Review of Biochemistry*, 75: 403-433.
- Singh R., Ranjan S., Nayaka S., Pathre U.V., Shirke P.A. (2013) Functional characteristics of a fruticose type of lichen, *Stereocaulon foliosum* Nyl. in response to light and water stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35 (5): 1605-1615.
- Singh-Tomar R., Mathur S., Allakhverdiev S.I., Jajoo A. (2012) Changes in PS II heterogeneity in response to osmotic and ionic stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*), *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 44: 411-419.
- Šinžar-Sekulić J., Sabovljević M., Stevanović B. (2005) Comparison of desiccation tolerance among mosses from different habitats. *Archives of Biological Sciences, Belgrade*, 57(3): 189-192.
- Skinner S., Entwistle T.J. (2004) Non-marine algae of Australia: 5. Macroscopic Chaetophoraceae (Chaetophorales, Chlorophyta). *Telopea*, 10: 613-633.
- Slavov C.H., Reus M., Holzwarth A.R. (2013) Two different mechanisms cooperate in the desiccation-induced excited state quenching in *Parmelia* lichen. *Journal of Physical Chemistry B*, 117(38): 11326-11336.
- Smirnoff N. (1992) The carbohydrates of bryophytes in relation to desiccation tolerance. *Journal of Bryology*, 17: 185-191.
- Smirnoff N. (2005) Antioxidants and reactive oxygen species in plants. In: Smirnoff N. (Eds), Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 302 pp.
- Smith R.C.G., Adams J., Stephens D.J., Hick P.T. (1995) Forecasting wheat yield in a Mediterranean-type environment from the NOAA satellite. *Australian Journal of Agricultural Research*, 46: 113-125.
- Smith R.I.L. (1996) Terrestrial and freshwater biotic components of the western Antarctic Peninsula. In: Ross R.M., Hofmann E.E., Quentin L.B. (Eds), *Foundations of Ecological Research West of the Antarctic Peninsula Antarctic Research Series*, vol. 70. American Geophysical Union, Washington D.C., pp. 15-59.

- Solhaug K.A., Chowdhury D.P., Gauslaa Y. (2018) Short- and long-term freezing effects in a coastal (*Lobaria virens*) versus a widespread lichen (*L. pulmonaria*). *Cryobiology*, 82: 124-129.
- Stark L.R., Greenwood J.L., Brinda J.C., Oliver M.J. (2013) The desert moss *Pterygoneurum lamellatum* (Pottiaceae) exhibits an inducible ecological strategy of desiccation tolerance: Effects of rate of drying on shoot damage and regeneration. *American Journal of Botany*, 100(8): 1522-1531.
- Starmach K. (1995) Freshwater algae of the Thala Hills oasis (Enderby Land, East Antarctic), *Polish Polar Research*, 16(3-4): 113-148.
- Steffen R. (2003) Time-resolved spectroscopic investigations of photosystem II. Ph.D. thesis, Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität, Berlin, 84 p.
- Stella G.R. (2016) Light stress and photoprotection in green algae, mosses and diatoms. Ph.D. thesis, University of Verona and University Pierre et Marie Curie, 144 p.
- Stirbet A., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B., Govindjee (2014) Modeling chlorophyll *a* fluorescence transient: relation to photosynthesis. *Biochemistry (Rus)*, 79(4): 291-323.
- Stoklasa-Wojtasz A., Rzepka A., Rit G. (2012) Responses of mosses species on environment stress factors. In: Grzesiak M.T., Rzepka A., Hura T., Grzesiak S. (Eds), *Plant functioning under environmental stress*. The F. Górski Institute of Plant Physiology. Polish Academy of Science, Cracow, Poland. pp. 69-83.
- Stoop J.H.M., Williamson J.D., Pharr D.M. (1996) Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends plant science*, 1: 139-144.
- Strasser R.J. (1981) The grouping model of plant photosynthesis: heterogeneity of photosynthetic units in thylakoids. In: Akoyunoglou G. (Eds), *Photosynthesis III. Structure and Molecular Organization of the Photosynthetic Apparatus*. Strasser R.J., Philadelphia: Balaban International Science Services, pp. 727-737.
- Strasser R.J. Tsimilli-Michael M., Srivastava A. (2004) Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: Papageorgiou G., Govindjee (Eds), *Advances in Photosynthesis and Respiration. Chlorophyll a Fluorescence: a Signature of Photosynthesis*. The Netherlands: Springer, pp. 321-362.
- Takahashi S., Badger M.R. (2011) Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Science*, 16: 53-60.
- Thomas D.N., Dieckmann G.S. (2002) Antarctic sea ice – a habitat for extremophiles. *Science*, 295: 641-644.
- Thüs H., Schultz M. (2008) *Freshwater Flora of Central Europe*, vol. 21/1: Fungi, Part 1: Lichens. Heidelberg: Spektrum, pp. 224.
- Thüs H., Muggia L., Pérez-Ortega S., Favero-Longo S.E., Joneson S., O'brien H., Nelsen M.P., Duque-Thüs R., Grube M., Friedl T., Brodie J., Andrew C.J., Lücking R., Lutzoni F., Gueidan C. (2011): Revisiting photobiont diversity in the lichen family Verrucariaceae (Ascomycota). *European Journal of Phycology*, 46: 399-415.
- Tonon T., Li Y., McQueen-Mason S. (2017) Mannitol biosynthesis in algae: more widespread and diverse than previously thought. *New Phytologist*, 213(4): 1573-1579.
- Torres-Mellado G.A., Jaña R., Casanova-Katny M.A. (2011) Antarctic hair grass expansion in the South Shetland archipelago and Antarctic Peninsula revisited. *Polar Biology*, 34: 1679-1688.
- Trnková K., Barták M. (2017) Desiccation-induced changes in photochemical processes of photosynthesis and spectral reflectance in *Nostoc commune* (Cyanobacteria, Nostocales) colonies from polar regions. *Phycological Research*, 65(1): 44-50.
- Tschermak E. (1941) Untersuchungen über die Beziehungen von Pilz und Alge im Flechtenthallus. *Oesterreichische botanische Zeitschrift*, 90: 233-307.

- Tschermak-Woess E. (1988) The algal partner. In: Galun M. (Eds), CRC Handbook of Lichenology, vol. I, CRC Press, Boca Raton. pp. 39-92.
- Tuba Z., Csintalan Z., Proctor M.C.F. (1996) Photosynthetic responses of a moss, *Tortula ruralis* ssp. *ruralis*, and the lichens *Cladonia convoluta* and *C. furcata* to water deficit and short periods of desiccation, and their ecophysiological significance: a baseline study at present day CO₂ concentration. *New Phytologist*, 133: 353-361.
- Tuba Z., Proctor M.C.F., Csintalan Z. (1998) Ecophysiological responses of homochlorophyllous and poikilochlorophyllous desiccation-tolerant plants: a comparison and an ecological perspective. *Plant Growth Regulation*, 24: 211-221.
- Tuba Z., Saxena D.K., Srivastava K., Singh S., Czobel S., Kalaji H.M. (2010) Chlorophyll a fluorescence measurements for validating the tolerant bryophytes for heavy metal (Pb) biomapping. *Current Science*, 98(11): 1505-1508.
- Uchida M., Muraoka H., Nakatsubo T., Bekku Y., Ueno T., Kanda H., Koizumi H. (2002) Net Photosynthesis, Respiration, and Production of the Moss *Sanionia uncinata* on a Glacier Foreland in the High Arctic, Ny-Ålesund, Svalbard, *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 34: 287-292.
- Uchida M., Nakatsubo T., Kanda H., Koizumi H. (2006) Estimation of the annual primary production of the lichen *Cetrariella delisei* in a glacier foreland in the high Arctic, Ny-Ålesund, Svalbard. *Polar Research*, 25: 39-49.
- Váczí P. (2018) Oxygen evolution rate in Antarctic filamentous alga *Stigeoclonium* sp. evaluated by optodes relates to chlorophyll fluorescence parameters. *Czech Polar Reports*, 8: 143-150.
- Valøen K. (2019) Stochastic rain events increase NDVI through moss water content: a High-Arctic field experiment. Master's thesis in MLREAL. Norwegian University of Science and Technology, 47 p.
- Van Der Veen C.J., Csatho B.M. (2005) Spectral Characteristics of Greenland Lichens. *Géographie physique et Quaternaire*, 59 (1): 63-73.
- Van Gaalen K.E. (2005) Photosynthetic CO₂ exchange and spectral vegetation indices of boreal mosses. Master thesis, Lethbridge, Alberta, Canada, 110 p.
- Van Gaalen K.E., Flanagan L., Peddle D.R. (2007) Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and spectral reflectance in Sphagnum moss at varying contents. *Oecologia*, 153(1): 19-28.
- Van Kooten O., Snel J.F.H. (1990) The use of chlorophyll fluorescence Nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25: 147-150.
- Van Lipzig N.P.M., King J.C., Lachlan-Cope T. (2004) Precipitation, sublimation, and snow drift in the Antarctic Peninsula region from a regional atmospheric model. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, 109: 10.
- Varela Z., Aboal J.R., Rey-Asensio A., Carballeira A.J., Fernández A. (2013) Establishing reference values of spectral reflectance indices in transplants of *Pseudoscleropodium purum* for potential use in atmospheric biomonitoring. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*, 91: 345-348.
- Veerman J., Vasil'ev S., Paton G.D., Ramanauskas J., Bruce D. (2007) Photoprotection in the lichen *Parmelia sulcata*: The origins of desiccation-induced fluorescence quenching. *Plant Physiology*, 145: 997-1005.
- Vidaver W.E., Lister G.R., Brooke R.C., Binder W.C. (1991) A manual for the use of variable chlorophyll fluorescence in the assessment of the ecophysiology of conifer seedlings, vol. 163. Ministry of Forests, Victoria, BC, Canada, 60 p.
- Virtanen R.J., Lundberg P.A., Moen J., Oksanen L. (1997) Topographic and altitudinal patterns in plant communities on European Arctic islands. *Polar Biology*, 17: 95-113.

- Vredenberg W., Kasalicky V., Durchan M., Prasil O. (2006) The chlorophyll *a* fluorescence induction pattern in chloroplasts upon repetitive single turnover excitations: accumulation and function of QB-nonreducing centers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1757: 173-181.
- Wasley J., Robinson S.A., Lovelock C., Popp M. (2006) Some like it wet - Biological characteristics underpinning tolerance of extreme water stress events in Antarctic bryophytes. *Functional Plant Biology*, 33(5): 443-455.
- Werner O., Espin R.M.R., Bopp M., Atzorn R. (1991) Abscisic acid-induced drought tolerance in *Funaria-Hygrometrica* Hedw. *Planta*, 186: 99-103.
- White A.J., Critchley C. (1999) Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research*, 59: 63-72.
- Wieners P.C., Mudimu O., Bilger W. (2012) Desiccation-induced non-radiative dissipation in isolated green lichen algae. *Photosynthesis Research*, 113: 239-247.
- Wise M.J., Tunnacliffe A. (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science*, 9: 13-17.
- Wolfe J., Bryant G. (1999) Freezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*, 39: 103-129.
- Wood A.J. (2005) Ecophysiological adaptations to limited water environments. In: Jenks M., Hasegawa P. (Eds), *Plant Abiotic Stress*. Blackwell, Oxford, p. 1-13.
- Wood A.J. (2007) The nature and distribution of vegetative desiccation-tolerance in hornworts, liverworts and mosses. *Bryologist*, 110: 163-177.
- Wu L., Lei Y., Lan S., Hu C. (2017) Photosynthetic recovery and acclimation to excess light intensity in the rehydrated lichen soil crusts. *PLoS ONE* 12(3): e0172537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172537>.
- Yamakawa H., Fukushima Y., Itoh S., Heber U. (2012) Three different mechanisms of energy dissipation of a desiccation-tolerant moss serve one common purpose: To protect reaction centres against photo-oxidation. *Journal of Experimental Botany*, 63: 3765-3775.
- Yamane Y., Shikanai T., Kashino, Y., Koike H., Satoh K. (2000) Reduction of Q_A in the dark: Another cause of fluorescence F_0 increases by high temperatures in higher plants. *Photosynthesis Research*, 63: 23-34.
- Yao X., Zhou H., Zhu Q., Li C., Zhang H., Wu J.-J., Xie F. (2017) Photosynthetic Response of Soybean Leaf to Wide Light-Fluctuation in Maize-Soybean Intercropping System. *Frontiers in Plant Science*, 28.
- Zhang J., Zhang Y.M., Downing A., Wu N., Zhang B.C. (2011) Photosynthetic and cytological recovery on remoistening *Syntrichia caninervis* Mitt., a desiccation-tolerant moss from Northwestern China *Photosynthetica*, 49(1): 13-20.
- Zhang X. (2016) Effects of drought stress and rehydration on chlorophyll fluorescence characteristics of *Erythrodontium julaceum* (Schwaegr.) par. In areas of puding karst rock desertification. *Bangladesh Journal of Botany*, 45(4): 911-917.
- Zhang X., Zhao Y., Wang S. (2017) Responses of antioxidant defense system of epilithic mosses to drought stress in karst rock desertified areas. *Acta Geochimica*, 36(2): 205-212.
- Živčák M., Olšovská K., Slamka P., Galambošová J., Rataj V., Shao H.B., Brestič M. (2014) Application of chlorophyll fluorescence performance indices to assess the wheat photosynthetic functions influenced by nitrogen deficiency. *Plant Soil and Environment*, 60: 210-215.
- Zotz G., Kahler H. (2007) A moss "canopy" – Small-scale differences in microclimate and physiological traits in *Tortula ruralis*. *Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants. Flora*, 202: 661-666.

Zúñiga-González P., Zúñiga-González G.E., Pizzaro M., Casanova-Katny A. (2016) Soluble carbohydrate content variation in *Sanionia uncinata* and *Polytrichastrum alpinum*, two Antarctic mosses with contrasting desiccation capacities. *Biological Research*, 49, Article number: 6.

Další (elektronické) zdroje

Station Bellingshausen. Arctic and Antarctic Research Institute. Archived from the original on 16 April 2004. Retrieved 2 October 2016.

[http:// www.absoluteastronomy.com/topics/Photosystem\)](http://www.absoluteastronomy.com/topics/Photosystem)

[http:// www.walz.com](http://www.walz.com)

PŘÍLOHA 1

Tabulka 1. Základní parametry fluorescence chlorofylu odvozené z pomalé indukční kinetiky (Kautského kinetika).

Parametr	Rovnice
Základní fluorescenční poměr, potenciální kvantový výtěžek fotosyntetických procesů v PSII (F_V/F_M)	$F_V/F_M = (F_M - F_0) / F_M$
Efektivní kvantový výtěžek fotosyntetických procesů v PSII (Φ_{PSII})	$\Phi_{PSII} = (F_{M'} - F_S) / F_{M'}$
Koeficient nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu (q_N)	$q_N = (F_M - F_{M'}) / (F_M - F_0)$
Nefotochemické zhášení fluorescence (NPQ)	$NPQ = (F_M - F_{M'}) / F_{M'}$
Relativní pokles fluorescence (Rfd)	$Rfd = (F_P - F_S) / F_S$

Tabulka 2. Definice indexů spektrální odrazivosti se zdroji rovnic.

Indexy	Rovnice	Odkaz
Normalizovaný diferenční vegetační index (NDVI)	$NDVI = (R_{NIR} - R_{RED}) / (R_{NIR} + R_{RED})$	Rouse et al. 1974
Fotochemický reflektanční index (PRI)	$PRI = (R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$	Gamon et al. 1992
Modifikovaná absorpce chlorofylu v indexu odrazivosti (MCARI)	$MCARI = [(R_{700} - R_{670}) - 0.2 * (R_{700} - R_{550})] * (R_{700} / R_{670})$	Daughtry et al. 2000
Modifikovaná absorpce chlorofylu v indexu odrazivosti (MCARI) ₁	$MCARI = 1.2 * [2.5 * (R_{790} - R_{670}) - 1.3 * (R_{790} - R_{550})]$	Haboudane et al. 2004
Jednoduchý pigmentový index (SRPI)	$SRPI = R_{430} / R_{680}$	Peñuelas et al. 1995
Index "zelenosti" (GI)	$GI = R_{554} / R_{677}$	Smith et al. 1995
Normalizovaný index chlorofylového pigmentu (NPCI)	$NPCI = (R_{680} - R_{430}) / (R_{680} + R_{430})$	Peñuelas et al. 1994
Index feofitinizace (Pq)	$Pq = R_{435} / R_{415}$	Ronen a Galun 1984

Tabulka 3 Definice OJIP odvozených parametrů se zdroji rovnic, upraveno dle Strasser et al. (2004).

Indexy	Rovnice
Maximální kvantový výtěžek primární fotochemie (Φ_{P_0})	$\Phi_{P_0} = TR_0/ABS = [1 - (F_0/F_M)]$
Účinnost tepelného rozptylu (Φ_{D_0})	$\Phi_{D_0} = 1 - \Phi_{P_0} = F_0/F_M$
Index vitality (Ψ_{Abs})	$\Psi_{Abs} = (RC/ABS)[\Phi_{P_0}/(1-\Phi_{P_0})]$ $[\Psi_{0_0}/(1 - \Psi_{0_0})]$
Absorpce vztažená na 1 reakční centrum (ABS/RC)	$ABS/RC = M_0 (1/V_J) (1/\Phi_{P_0})$
Rychlost zachycení vztažená na 1 reakční centrum (TR_0/RC)	$TR_0/RC = M_0(1/V_J)$
Fotosyntetický transport elektronů vztažený na 1 reakční centrum (ET_0/RC)	$ET_0/RC = M_0(1/V_J) \Psi_{0_0}$
Tepelná disipace vztažená na 1 reakční centrum (DI_0/RC)	$DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$

Publikace 1 (Příloha 2)

Orekhova A., Barták M., Hájek J., Morkusová J. (2021a) Species-specific responses of spectral reflectance and photosynthetic characteristics in two selected Antarctic mosses to thallus desiccation. *Acta Physiologiae Plantarum – in press.*

Species-specific responses to spectral reflectance and the photosynthetic characteristics in two selected Antarctic mosses to thallus desiccation

Alla Orekhova, Miloš Barták^{*1}, Josef Hájek^{*2}, Jana Morkusová

Department of Experimental Biology, Division of Plant Physiology and Anatomy, Faculty of Science, Masaryk University, Laboratory of Photosynthetic Processes, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

^{*1,2} Corresponding authors: Miloš Barták (mbartak@sci.muni.cz), Josef Hájek (jhajek@sci.muni.cz)

Abstract

Mosses are considered highly resistant against desiccation because they maintain photosynthetic activity even when severely dehydrated. In our study, we investigated changes in the photochemical processes of photosynthesis, as well as the spectral reflectance parameters during controlled rehydration and desiccation in two Antarctic species, i.e. *Brachythecium austro-glareosum* and *Bryum pseudotriquetrum*. Changes in primary photochemical processes were evaluated by chlorophyll fluorescence, i.e. slow Kautsky kinetics supplemented with saturation light pulses. In desiccating thalli, an effective quantum yield of photosynthetic processes in PS II (Φ_{PSII}) remained unchanged within low to moderate desiccation, i.e. with a relative water content (RWC) decrease from fully wet (100%) to semidry (30%). Below 20% RWC, Φ_{PSII} showed a species-specific decline, as well as steady-state fluorescence (F_S). A half decrease in Φ_{PSII} was reached at an RWC of 12.6% (*B. austro-glareosum*) and 9.8% (*B. pseudotriquetrum*). Rapid light-response curves showed a strong limitation of photosynthetic electron transport (ETR) at an RWC below 20% in both species. The Φ_{PSII} and ETR data suggested that both species were desiccation-tolerant and well-adapted to harsh Antarctic environments. However, *B. pseudotriquetrum* was more resistant in a state of severe dehydration (RWC below 20%) than *B. austro-glareosum*. Spectral reflectance indices responded to desiccation either (a) similarly in the two species (normalised difference vegetation index [NDVI]), (b) with similar trends but different values (modified chlorophyll absorption in reflectance index [MCARI] and greenness index [GI]) and (c) species-specifically (photochemical reflectance index [PRI]).

Acknowledgements: The authors thank the ECOPOLARIS and CzechPolar-I and II projects (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001708, LM2010009 and LM2015078) for providing facilities and the infrastructure used to conduct the research reported in this study.

Keywords: Antarctica, dehydration, rehydration, chlorophyll fluorescence, light response curves, *Brachythecium austro-glareosum*, *Bryum pseudotriquetrum*

Symbols and abbreviations

ChlF: chlorophyll fluorescence; KK: Kautsky kinetics of chlorophyll fluorescence; F_v/F_m : potential yield of photochemical photosynthetic processes in PS II; Φ_{PSII} : effective yield of photochemical photosynthetic processes in PS II; NPQ: non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence; F_S : steady-state fluorescence; RLCs: rapid light curves; ETR: electron transport rate; RWC: relative water content; WP: water potential; NDVI: normalised difference vegetation index; PRI: photochemical reflectance index; PSII: photosystem II, MCARI: modified chlorophyll absorption in reflectance index;

G: greenness index; CARI: carotenoid index; $CI_{\text{red-edge}}$: red-edge chlorophyll index; CCRI: carotenoid/chlorophyll ratio index; Pq: phaeophytisation index

Introduction

In addition to lichens, mosses are dominant components of non-vascular flora in the Polar Regions, based on their ability to cope with a variety of harsh conditions. Due to their poikilohydric character, mosses are well-adapted to repeated dehydration/rehydration and long periods spent in a dry state, which may be quite frequent events in Polar Regions.

Most moss species are highly resistant to desiccation. Some genera, however, are considered sensitive to drought stress (Jassey and Signarbieux 2019; Rastogi et al. 2020). The process of drying and rehydration can be repeated several times without causing major changes in the functioning of the moss (Stoklasa-Wojtasz 2012). It has been established that mosses can withstand considerable desiccation (water content of $5\% \pm 10\%$ of their dry weight), followed by recovery to normal vitality upon rehydration (Alpert 2000). This ability is a common property of bryophytes and a high number of mosses have been experimentally verified to be desiccation-tolerant (Wood 2007). Bryophytes are frequently subjected to cyclical desiccation–rehydration events and have evolved remarkable constitutive and inducible mechanisms of desiccation tolerance to survive in arid desert environments (Li et al. 2014). Studies conducted by Bewley (1979), Bewley and Krochko (1982), Proctor (1990), Oliver et al. (1993), Tuba et al. (1996) and Hu et al. (2016) focused on desiccation tolerance-evaluated photosynthesis at different thallus hydration levels ranging from a fully wet to dry state. These studies used gas exchange and/or chlorophyll fluorescence (ChlF) measurements to evaluate hydration-dependent changes in photosynthesis.

The exploitation of ChlF is beneficial in photosynthetic studies because methods based on ChlF can detect the impact of environmental stressors. Stress-induced changes in the functioning of photosynthetic systems can be sensed without any damage to leaves. Within the past number of decades, several aspects of photosynthetic processes have been studied using ChlF, such as reactivation of photosynthetic activity in moss and lichen thalli after rewetting (Schlensog and Schroeter 2001). The idiosyncrasies of several ChlF techniques and their proper application were reviewed by Kalaji et al. (2014). In mosses, ChlF was used to evaluate the effects of different stressors. Baxter et al. (1991) used ChlF to study moss response to different concentrations of bisulphite ions. Photosynthetic response to freezing was determined in mosses by Rütten and Santarius (1992) by measuring the freezing-induced decrease in ChlF ratio (F_v/F_m), the results indicating an increased sensitivity to frost damage in young and old tissue. Similarly, Deltoro et al. (1999) reported a freezing-induced decrease in photosynthetic CO_2 fixation, accompanied by an increase in non-photochemical quenching of ChlF. The effect of photoinhibition on photosynthesis and the growth of arctic moss was studied under field and laboratory conditions by Murray et al. (1993). The study reported a moderate light-induced decrease in F_v/F_m in *Sphagnum* sp., indicating sensitivity to photoinhibition in open habitats of the Alaskan tundra. Since the 1990s, chlorophyll fluorescence has been used in the measurement of moss photosynthetic processes under different degrees of thallus desiccation. Seel et al. (1992a) studied changes in the activity of PS II during drying and gradual rehydration in *Tortula ruralis* ssp. *ruraliformis* and *Dicranella palustris* mosses. The results showed differences in PS II activity between the mosses rehydrated immediately after reaching a dry state and those that remained in a dry state for one week before rehydration. Changes in ChlF parameters during drying and consequent rewetting were highlighted in a study by Deltoro et al. (1998a), who found species-specific responses, e.g. the capability of mosses from xeric but not hydric and mesic habitats to restore photochemical activity after rewetting from a dry state. Recently, several detailed studies focused on the underlying mechanisms of moss photosynthesis resistance to

dehydration, e.g. the glassy state of thalli in rapidly desiccating mosses and the activity of violaxanthin de-epoxidase (Fernández-Marín et al. 2011), protective mechanisms based on energy dissipation during moss desiccation (Hamerlynck et al. 2000), the rate of mRNA loss during rapid drying and its synthesis during rehydration, as well as a turnover of mRNAs stored in the dried state (Oliver et al. 2000). Gene expression analysis suggested that jasmonic acid signalling, proteosomal activation and alternative splicing are components of desiccation tolerance mechanisms in mosses (*Tortula ruralis* in Oliver et al. 2009). Pressel and Duckett (2010) reported that in the de- and repolymerisation of microtubules during a drying–rewetting cycle in a moss protonemata plays a role during fast and slow desiccation.

For a better understanding of the mechanisms of moss resistance to desiccation, an integrated approach can be used. Typically, such studies combine different approaches that include special ChlF techniques. Tuba et al. (1996) presented measurements of the R_{Fd} parameter in parallel with gas-exchange measurements through a drying-rehydration cycle using *Tortula ruralis* ssp. Detailed analysis of ChlF parameters, their interspecific differences, particularly in response to drying and remoistening, was conducted by Csintalan et al. (1999) for three species (*Rhytidiadelphus loreus*, *Anomodon viticulosus* and *Grimmia pulvinata*) with different degrees of desiccation tolerance. Bartošková et al. (1999) and Nabe et al. (2007) showed that dehydration-induced changes in chlorophyll emission and the absorption spectra of *Rhizomnium punctatum* indicated the grouping of chlorophyll molecules, as well as the reabsorption of ChlF. The study explored the basic physiological features and time relations of the recovery of photosynthetic activity and CO₂ uptake following rehydration of a desiccation-tolerant moss in relation to the full temporal sequence of cytological changes associated with recovery to the normal hydrated state (Proctor 2007; Stark et al. 2013). Additionally, changes in ChlF parameters, based on different water content were underscored by Zhang (2016).

Although many of the protective mechanisms of bryophytes are common within vascular plants, there are fundamental interspecific differences in their response to desiccation. Marschall et al. (2018) reported desiccation-tolerant (*Porella platyphylla*) and desiccation-sensitive (*Sphagnum angustifolium*) mosses. Recently, moss tolerance to desiccation and underlying physiological mechanisms were studied using a wide range of methods and approaches. These included measurements of (1) the ionic conductivity of cellular membranes (Šinžar-Sekulić et al. 2005), (2) the accumulation of osmoprotective compounds, (3) the activation of ROS scavengers, protection against ROS-induced damage, and the repair of ROS-induced damage (Hu et al. 2016), (4) the protection of membrane integrity by restructuring the cell membrane and the synthesis of osmolytes following disruption of the membrane (Mahajan and Tuteja 2005) and, most recently, (5) a genetic approach focused on transcriptomes during the hydration–dehydration–rehydration cycle (*Bryum argenteum* in Gao et al. 2017).

Spectral characteristics of thalli may change in poikilohydric autotrophs such as lichens (Barták et al. 2018) and mosses (Van Gaalen et al. 2007) during desiccation. In the case of mosses, however, only a small number of physiological studies have addressed spectral reflectance change during desiccation. Lovelock and Robinson (2002) studied Antarctic mosses (*Bryum pseudotriquetrum*, *Ceratodon purpureus*, *Grimmia Antarctica*), spectral reflectance parameters in relation to pigment composition, photosynthetic performance and water content. The results showed the strongest correlation with spectral reflectance parameters as being with intrathalline water content. Similarly, Van Gaalen et al. (2007) showed that the photochemical reflectance index (PRI) correlated with the rate of net photosynthesis, as well as with the xanthophyll-cycle pigment content and non-photochemical quenching (NPQ). Harris (2008) used parallel ChlF measurements and spectral reflectance parameters during the desiccation of *Sphagnum*. Here, desiccation led to a significant reduction in Φ_{PSII} , which weakly correlated with the PRI. Moreover, a strong negative correlation was found between changes in PRI and NPQ. The NDVI indicated a change in thallus dehydration. These data suggest that NDVI and PRI are good proxies for short-term hydration/dehydration-induced changes in the photosynthetic

activity of mosses, similarly to what was reported for lichens (Barták et al. 2015). Therefore, simultaneous measurements of photosynthetic processes by ChlF and spectral properties during the dehydration of moss species is beneficial for analysing their physiological responses activated by wetting.

For Antarctic mosses, only a small number of studies have been devoted to photosynthetic performance during partial dehydration and their desiccation tolerance in the field and under laboratory conditions. Davey (1997) studied rehydration times by carbon exchange rate in Antarctic bryophytes using an infrared gas analysis system. The study found fast respiration bursts and slow restoration of net photosynthesis; for Antarctic species, this required more time compared to non-polar species. Robinson et al. (2000) focused on the physiological tolerance to desiccation measured by ChlF of Antarctic moss during natural drying in the laboratory. More recent studies addressed several aspects of moss photosynthesis in response to their hydration status. These have investigated the metabolic recovery of continental Antarctic cryptogams following a dry winter season, e.g. Schlenzog et al. (2004), where F_v/F_m and the effective quantum yield of PS II (Φ_{PSII}) were employed to show the rapid and slow phases of recovery of photosynthetic processes after rewetting. Wasley et al. (2006) documented the species-specific responses of mosses from differently hydrated niches in Antarctic terrestrial ecosystems. The role of desiccation in the UV-B tolerance of mosses, as well as stress assessment using imaging spectroscopy data, were studied by Malenovský (2015), who found a satisfactory relationship between chlorophyll content, ChlF parameters and spectral image data of the Antarctic moss carpet.

In our study, we focused on the dehydration-induced responses of primary photosynthetic processes and spectral reflectance in two moss species from the James Ross Island of Antarctica. Although both of the studied mosses occurred within similar habitats, we hypothesised that their tolerance towards drying, though high, would be species-specific. Concerning the anatomical–morphological characteristics of each species, we assumed that *Brachythecium austro-glareosum*'s photosynthetic processes would show lower resistance to a strong degree of drying compared with *Bryum pseudotriquetrum*. Finally, we analysed the extent of the protective quenching mechanism activated in the two species by dehydration.

Materials and method

Collection and site characteristics

Samples of *Brachythecium austro-glareosum* and *Bryum pseudotriquetrum* were collected from James Ross Island (Antarctica). The collection site was located on an N-facing slope (63°48'12'' S, 57°51'02'' W) and fed by several snowfields located on the northern foothills of the Berry Hill mesa. The site is denoted as Area 2 in the list of vegetation oases of the James Ross Island (Barták et al. 2015). The area is rich in mosses, carpets of which form irregular patches related to individual water streams rich in cyanobacterial and algal species. Moss vegetation is dominated by *Bryum pseudotriquetrum* and *Hypnum revolutum*. Apart from mosses, several lichen species contribute to the vegetation oasis community.

Species characteristics

***Brachythecium austro-glareosum* (C. Muell.) Kindb.** This species forms relatively thin carpets covering wet post-glacial lowlands. In Antarctica, it has been reported for several locations in the Shetland Islands, Argentine Islands and the Danco Coast (the west coast of the Antarctic peninsula) (Putzke and Pereira 2001). It prefers wet areas, such as regions in which the drainage of meltwater occurs. The mosses are rarely cespitose, bright, brownish or yellowish-green above and generally somewhat brown below. The stems are 1.0–6.5 cm high, prostrate or ascending, irregularly or

subpinnately branched, with brown rhizoids in groups under the leaf insertion. The leaf margins are intermittently recurved throughout, with costa ending near the mid-leaf. Photosynthetic performance of *B. austro-glareosum* has not yet been investigated in either the field or a laboratory setting.

***Bryum pseudotriquetrum* (Hedw.) Gaertn., Meyer and Scherb.** Plants forming dense tufts of dark-green to reddish colour, approximately 1.5–5.0 cm high. The stems are simple or forked, typically red and somewhat tomentose below. The leaves are more crowded at the top. When dry, the leaves are contorted but change to erect spreading when wet; leaves are variable in shape but range generally from oblong–lanceolate to ovate–lanceolate, with an obtuse, acute or acuminate apex. The margins of the leaves are revolute or not and entirely or variably serrulate near the apex; costa red below, percurrent or ending near the apex. In Antarctica, *B. pseudotriquetrum* is quite abundant. Field studies using gas exchange measurements revealed a net photosynthetic rate of $4.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Ino et al. 1990; Pannowitz et al. 2005). Photosynthetic processes of the species that are dependent on desiccation were studied by ChlF (Robinson et al. 2000). However, only the potential yield of photochemical processes in photosystem II (F_v/F_M) was analysed.

Evaluation of constitutive amounts of pigments

From each sample, 100 mg of biomass (dry matter) was taken to determine pigment content. After homogenisation, ethanol extracts were used for spectrophotometric evaluation of chlorophyll (Chl *a*/Chl *b*) and carotenoids (Car) according to Lichtenthaler (1983), using a Specord 205 (Analytik, Jena, Germany) spectrophotometer. The absorbance measured at 649 and 665 nm was used for Chl and 470 nm for Car evaluation.

Rehydration and activation of photosynthetic processes

Restoration of photosynthetic processes upon rehydration was studied by ChlF. Dry samples of *B. austro-glareosum* and *B. pseudotriquetrum* were rehydrated in petri dishes by regular spraying for 48 h. The rehydration was done at a temperature of 5°C and under low light ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically-active radiation [PAR]). Activation of primary photosynthetic processes was evaluated by slow Kautsky kinetic measurements with quenching mechanism analysis (typically at 1 h intervals). The kinetics were measured by a FluorCam HFC-010 fluorometer (Photon Systems Instruments, Drásov, Czech Republic) using the method described elsewhere (Trnková and Barták 2017). From the ChlF measurements, the following parameters were calculated and expressed as dependent on the time of rehydration: F_v/F_M (potential yield of photosynthetic processes in PS II), Φ_{PSII} (effective quantum yields from the photosynthetic processes of PS II), F_s (steady-state fluorescence) and R_{Fd} (relative fluorescence decline ratio, vitality index).

Desiccation and relative water content determination

For desiccation experiments, the moss samples were handled as follows. Before conducting experiments, moss clusters approximately 1 cm in diameter were rehydrated in the laboratory for 48 h at 10°C . Then, excess surface water was removed by blotting the samples on a paper towel. The samples were placed into a plastic tube of the same diameter and with numerous perforations across its surface, allowing for desiccation of the moss cluster from the side. Then, the samples were allowed to desiccate naturally at room temperature and in dim light ($20 \mu\text{mol (photons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation). During desiccation, the change in water content of each sample was determined gravimetrically using a Mettler AE 100 scale (Germany). The relative water content (RWC) was calculated using the formula:

$$\text{RWC} = [(\text{fresh weight} - \text{dry weight}) / (\text{saturated weight} - \text{dry weight})] * 100$$

During the dehydration from a fully wet to dry state, changes in the water potential (WP) of moss clusters were also measured. For a single WP measurement, a sample of thallus was equilibrated in a chamber of a dew point water potential meter (WP4T, Decagon Devices, Pullman, USA) for 10–20 min; then, the WP reading was taken using a method described by Jupa et al. (2012). Finally, the relation between WP and RWC was evaluated for particular moss species.

Chlorophyll fluorescence parameters during desiccation

During desiccation from a fully wet (RWC = 100%, WP = 0) to dry (RWC = 0%) state, the following ChlF parameters were measured repeatedly (in 10 min steps): (1) the effective quantum yield (Φ_{PSII}) of photosystem II, (2) steady-state ChlF F_s (for parameter definition and equations, see, e.g. Roháček and Barták 1999; Roháček 2010). For this purpose, a PAM-2000 fluorometer (Walz, Germany) with a custom-programmed measuring routine was used. Saturation pulses were applied on the samples at a light-acclimated state (exposure, $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of PAR) at 10 min intervals. The dehydration response curves of Φ_{PSII} and F_s were constructed (pooled data from three replicates for each species). Species-specific responses in the dehydration-induced change of Φ_{PSII} and F_s were evaluated; critical points for primary photosynthetic processes (RWC, WP) in which the most rapid changes occurred were measured.

Rapid light response curves of ETR

Light response curves of apparent electron transport rate (ETR) were measured on samples of mosses that had been maintained fully hydrated for at least 24 h before the experiment. Then, the curves were measured by a modulated fluorometer (PAM 2500; Walz, Germany) using a standard protocol that had been pre-programmed into the instrument during progressive drying at laboratory temperature. During desiccation, RWC was gravimetrically evaluated (see above). Readings of ETR were taken at 30 min intervals for three replicates of each species. This method comprised the measurements of rapid light curves (RLC; see White and Critchley 1999), i.e. measurements of Φ_{PSII} in samples exposed to increasing intensities of actinic light (from 0 to $1050 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of PAR). We measured apparent ETR i.e. ETR exploiting the effective quantum yields of photosystem II ($\Delta F/F_m'$ or Φ_{PSII}) according to $\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} \times \text{PAR} \times 0.42$. The time interval for each PAR intensity level was 20 sec for full equilibration of photosynthetic reactions. Then, ETR data were plotted against PAR and the following parameters were evaluated: (1) α , the initial slope of RLC, which is related to the quantum efficiency of photosynthesis; (2) ETRmax, the maximum electron transport rate.

Spectral reflectance and absorbance measurements

Reflectance spectra were measured within the range of 380–800 nm using a PolyPen RP 400 ultraviolet–visible (UV-VIS) spectroreflectometer (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic). Moss samples were measured repeatedly during gradual dehydration from a fully wet to dry state. From spectral reflectance data, the photochemical reflectance index (PRI) and normalised difference vegetation index (NDVI), as well as several others (CARI, MCARI, GI, CI, CCRI, Pq – see Table 1 for definitions and equations) were calculated.

Statistical analysis

Species-specific differences were evaluated for ChlF signals (F_s), ChlF parameters (Φ_{PSII} , NPQ and ETR dependent on RWC [independent variable]) for the rehydration and dehydration experiments. The

species-specific differences in spectral reflectance were evaluated (using wavelength as an independent value) in wet and dry states, as well as by a paired t-test at the $P = 0.005$ level of significance. The same paired t-test was used for the evaluation of species-specific differences in spectral reflectance indices during desiccation (using RWC as the independent variable).

Results

Pigment content

The moss species differed slightly in terms of Chl *a* and Chl *b* values, as well as total chlorophyll content (Chl *a* + *b*) (see Table 2). There was a statistically significant difference in chlorophyll *b* content; *B. pseudotriquetrum* had a higher concentration of Chl *b* than *B. austro-glareosum*. The total carotenoid content in *B. pseudotriquetrum* was higher than in *B. austro-glareosum*.

Rehydration

Rehydration response curves showed the time required for the complete restoration of primary photosynthetic processes in PS II (Figs. 1, 2). For both species, 32 h was required to reach maximum values for F_v/F_m and Φ_{PSII} . The rise of both parameters, however, was polyphasic, showing a lag phase (0–3 h for *B. austro-glareosum* and 0–5 h for *B. pseudotriquetrum*) with constant values. Then (2/5–30 h), F_v/F_m and Φ_{PSII} increased and followed an S-curve in both species. Maximum values of F_v/F_m and Φ_{PSII} were found to be somewhat lower in *B. pseudotriquetrum* compared with *B. austro-glareosum*. The rehydration response courses of NPQ were found to be species-specific. For *B. austro-glareosum*, NPQ showed polyphasic and complex curves with a local minimum found in the interval of 5–9 h of rehydration, as well as two maxima (45 min and 27 h). The NPQ minimum corresponded to the time at which F_v/F_m and Φ_{PSII} exhibited the most rapid increase and the local maximum of steady-state ChlF (F_s); *B. pseudotriquetrum* showed more or less a constant but slow rate of increase in NPQ values throughout the rehydration period. The F_s values were found to be constant at the very beginning (0–9 h) but slightly decreased after 24 h of rehydration.

Dehydration

Within the RWC range of 40%–100%, Φ_{PSII} showed no change in terms of dehydration for both species. With pronounced desiccation (RWC decreased from 40% to 0%, i.e. from a water potential of 8.0 MPa; see Fig. 3), a rapid decline to the full inhibition of the primary photochemical processes of photosynthesis ($\Phi_{PSII} = 0$) was apparent. The decline was comparable in both species; however, *B. pseudotriquetrum* showed higher resistance to dehydration since the half of maximum value was found at a lower RWC compared with *B. austro-glareosum* (see Fig. 4). In both species, 40% of RWC equaled a value of –7 MPa of water potential (see Fig. 3). The decline of Φ_{PSII} was found in the WP range of –10 to –33 MPa in both species.

During gradual dehydration, F_s declined in a polyphasic manner and showed species-specific differences. The rapid dehydration-induced decline began at different RWCs. The starting point was found at a higher RWC for *B. austro-glareosum* (40%) than *B. pseudotriquetrum* (30% RWC). The decline in F_s in low-to-moderate thallus dehydration (from RWC 100% to 40%) also differed between the two experimental species. This showed an S-like curve with F_s values decreasing alongside dehydration (from right to left in Fig. 5); a slight increase in F_s of approximately 14% was found during the decrease of RWC from 100% to 40% in *B. austro-glareosum*.

Rapid light curves during dehydration

The ETR responded differently to gradual desiccation in both species. An increase in ETR was found during the initial phase of dehydration (RWC decrease from 100% to 60%), followed by a decrease in ETR at an RWC below 60% in *B. austro-glareosum*. In *B. pseudotriquetrum*, a decrease in ETR was only found alongside an RWC decrease (Fig. 6). In the latter species, ETR in response to PAR did not change within the range of RWC decreasing from 100% to 40% and was followed by an ETR decrease beginning at 20% RWC. A substantial decrease was found for both species at an RWC below 10%. The experimental species differed regarding the α parameter (the effectivity of photosynthetic electron transport per PAR unit), which represented the initial slope of the curve in low light. Parameter α reached 0.25 and 0.14 electrons quanta⁻¹ in fully-hydrated (RWC = 100%) *B. austro-glareosum* and *B. pseudotriquetrum*, respectively. In both species, α decreased with desiccation and reached minima of 0.08 and 0.04, respectively, at an RWC of approximately 10%.

Spectral reflectance indices

Spectral reflectance curves and indices showed different sensitivity to dehydration (see Table 3 and Fig. 7). In the case of spectral curves, the most pronounced differences between wet and dry spectra were found in 530, 617 and 663 nm (*B. austro-glareosum*) and 530, 617 and 579 nm (*B. pseudotriquetrum*). The NDVI, G and MCARI declined with a decrease in RWC. Despite similar trends in dehydration-response curves of NDVI, GI, MCARI, species-specific differences were found for these parameters (lower ranges in *B. austro-glareosum* compared with *B. pseudotriquetrum* throughout the entire RWC range).

The relationship between NDVI and RWC (see Fig. 8) appeared to be biphasic during dehydration. In *B. pseudotriquetrum*, NDVI slightly increased during the initial phase of dehydration (with a peak at 70%–80% of RWC); then, NDVI declined with an RWC decreased from 70% to 0% with a minimum of 0.45 found at extremely low RWCs. In general, the dehydration response curve of NDVI showed a curvilinear relationship with a pronounced decrease in NDVI value at RWCs below 40%. Additionally, *B. austro-glareosum* showed a similar dehydration-response curve for NDVI; however, the NDVI values were smaller in the best-fit curve and the extremely dehydrated thallus (NDVI, 0.4).

The PRI dehydration-response curve showed a different shape for *B. austro-glareosum* and *B. pseudotriquetrum*. In severely dehydrated thalli (RWC below 30%), an increase was apparent in the desiccating *B. austro-glareosum* while an opposite trend was observed for *B. pseudotriquetrum*. The PRI and NDVI were related to non-photochemical quenching (Fig. 8); however, the relationships were species-specific. For PRI, opposing trends of non-photochemical quenching (qN) were found in each species. The MCARI decreased alongside desiccation in both species. Absolute MCARI values were, however, generally lower in *B. austro-glareosum* compared with *B. pseudotriquetrum*. Generally, the GI declined with a decrease in RWC, except in the case of full hydration in *B. pseudotriquetrum*. Within the range of 80%–100% RWC, GI increased with desiccation. In the RWC range of 0%–80%, G declined with desiccation.

The phaeophytisation index (Pq) increased with a decrease in RWC. This relationship was found to be polyphasic in *B. austro-glareosum* but linear in *B. pseudotriquetrum*. Carotenoid index (CARI), the carotenoid to chlorophyll ratio (CCRI), as well as the red edge chlorophyll index (CI_{red-edge}) decreased and increased in the dry states of *B. austro-glareosum* and *B. pseudotriquetrum*, respectively (see Table 3).

Absorption spectra of moss extracts

Absorption spectra are presented showing high peaks in the area of 190–220 nm and are more pronounced in *B. pseudotriquetrum* than *B. austro-glariosum* (Fig. 9). Other, much smaller absorbance peaks were evident at 270 and 300 nm on the spectral curve, followed by peaks related to carotenoids (450 nm) and chlorophyll (663 nm).

Discussion

Photosynthetic pigment content

Chlorophyll content has been widely studied in vascular plants in Antarctica. In bryophytes, however, such studies are much scarcer. Our data on total Chl content are in good agreement with those of Russell (1985), who reported 0.143 and 1.357 mg g⁻¹ DW (for *Ditrichum strictum* and *Brachythecium rutabulum* from Marion Island). Our data on total Chl content, however, were lower than those reported by Barcikowski and Loro (1999) from the King George Island, i.e. *Sanionia georgico-uncinata* (5.14 mg g⁻¹ DW), *Brachythecium austro-salebrosum* (4.55 mg g⁻¹ DW), *Sanionia uncinata* (4.47 mg g⁻¹ DW) and *Polytrichastrum alpinum* (2.34 mg g⁻¹ DW). It seems that such Chl values in mosses resulted from the natural fertilisation of habitats (ornithogenic soils) with organic matter (Tatur et al. 1997). Our samples from the James Ross Island were collected from sites with low organic matter availability, which suggests that they may have lower chlorophyll content. Other interacting factors affecting Chl contents in Antarctic mosses may be seasonal (Barcikowski and Loro 1999) and the negative effects of high UV-B (Robinson et al. 2005), which is apparent in Antarctica in September–November due to ozone-hole formation.

The total carotenoid content was higher in *B. pseudotriquetrum* than in *B. austro-glareosum*. However, the content was in a good agreement with the data reported by several authors for mosses from subpolar and Polar Regions (Lappalainen et al. 2008; Newsham 2002; Schroeter 2012). Carotenoids have photoprotective and antioxidative functions. They protect photosystem II from overenergisation by thermal dissipation of excess energy under a wide variety of environmental factors/stressors. Therefore, in Antarctica, the total carotenoid content may differ within the growing season, particularly from September to November, when increased levels of UV-B radiation are available as a result of stratospheric ozone depletion. It has been well-documented that ozone hole induced an increase in UV-B and led to an increase in UV-B absorbing compounds (Waterman et al. 2018) as well as total carotenoids in Antarctic mosses (Newsham 2002). Additionally, in situ experiments using the UV-B exclusion approach indicated that UV-B-exposed mosses had a higher total carotenoid content than mosses not exposed to UV-B (Singh and Singh 2012). Similarly, long-term experiments with UV-B enhancement led to an increased content of carotenoids in the sub-Arctic tundra (Arróniz-Crespo et al. 2011).

Rehydration

Rehydration time (30 h for maximum F_V/F_M) for the mosses included in this study was comparable to other moss species; however, shorter times were reported by ecophysiological studies for several moss species (1 h by Proctor et al. 2007, 16 h by Csintalan et al. 1999, 20 h by Nabe et al. 2007 and 25 h by Nakaya and Saxena 2014). However, species-specific differences were observed in the re-wetting time that may be attributable to the length of the hydrated activity period before desiccation. Green et al. (2011) reported rapid recovery of photosynthetic processes in mosses from rock surfaces (fast and repetitive hydration/dehydration), while those that were wet for long periods before desiccation required

a longer time to restore their photosynthetic processes. This could be supported by a follow-up experiment involving a desert moss conducted by Stark et al. (2013), who reported that the rate of drying was significantly affected following rehydration responses and prolonged recovery time of F_v/F_M (8 h for slowly desiccated and 72 h for rapidly desiccated). Since the two Antarctic mosses used in our study underwent rather rapid desiccation in the field (due to the dual action of wind speed and temperature), it is feasible to attribute the time of rehydration established in our study (32 h) to a site-related ecophysiological strategy. Based on this concept, the desiccation tolerance of the two moss species was related to the site-dependent rapidity of desiccation. A recent study by Pizzaro et al. (2019) reported requiring approximately 40 h to restore PS II efficiency in rehydrated *Sanionia uncinata* from King George Island, Antarctica.

Environmental factors, such as light and temperature may also play a role and interact during the rehydration period since both the photosynthesis and respiration that occurs during the rehydration time are light- and temperature-dependent. Li et al. (2014) documented a large difference in rehydration time for *Bryum argenteum* in light (3 h) and dark (24 h) conditions. In our data, F_v/F_M and Φ_{PSII} were well-linked, indicating that for all thallus hydration and stages of cell function restoration, both potential and actual photosynthetic processes in PS II were well-coupled.

Non-photochemical quenching course alongside the time of rehydration for *B. austro-glareosum* showed two comparably high maxima followed by a decrease (Fig. 2). This phenomenon is comparable to data reported by Csintalan et al. (1999), who found an increase in NPQ followed by a decrease within the first 1 h. Our data showed this decrease lasted for at least 9 h. The following increase in NPQ, observed in the rehydration period (24–27 h), may be attributable to the protection of PS II during the adjustment of PSII full functioning (see F_v/F_M and Φ_{PSII} courses between 24 and 27 h). However, the course of NPQ adjustment during rehydration was affected by a complex range of factors that may have interacted, causing a dynamically changing curve shape. For example, the rehydration time required for the final adjustment of NPQ varied between species and reflected peculiarities of the experimental set-up. It may be as fast as 1 h (Csintalan et al. 1999 for *Rhytidiadelphus loreus*) or may only be completed after 8 h (Mayaba et al. 2002 for *Atrichum androgynum*).

Dehydration response curves of ChlF parameters

In both species, the decline of F_s at the RWCs below 45% could be attributable to a gradual loss of water from cells and a consequent decrease in the ChlF signal. The F_s decline is comparable to the evidence for *Rhizomnium punctatum* (Giudici et al. 2018, 20% RWC). Similarly, Yamakawa et al. (2012) reported an F_s decline with progressive dehydration in *Rhytidium rugosum*. However, some moss species do not show any F_s decline during desiccation (RWC from 100% to 0%), e.g. *Palustriella commutate* and *Rhytidiadelphus squarrosus* (Giudici et al. 2018). The reason for the constant F_s during moss desiccation remains unclear.

The dehydration response curve for Φ_{PSII} showed that a substantial decrease in Φ_{PSII} values in *B. austro-glareosum* (see the arrow in Fig. 4) began at a higher RWC (23%, - 9.9 MPa) than *B. pseudotriquetrum* (14%, -17.0 MPa). The interspecific differences appear quite obvious. These differences were previously reported by Deltoro et al. (1998a) even for mosses from xeric environments. The authors found sensitive (*Leucodon sciuroides*, RWC of 30%) and resistant (*Orthotrichum cupulatum*, 5% RWC) species. The same authors reported much higher RWCs (10%–40%) for mosses from hydric and mesic environments. Proctor et al. (2007) reported RWC as high as 75% for *Polytrichum formosum* in a humid site (Exeter, UK). Our Φ_{PSII} data indicate that *B. austro-glareosum* and *B. pseudotriquetrum* could be considered drought-resistant (based on Antarctic semi-desert conditions). The dehydration response curves of Φ_{PSII} allowed us to classify the two experimental species in terms of desiccation tolerance. The majority of

mosses are considered desiccation-tolerant; however, desiccation-sensitive species exists. Marschall et al. (2018) reported desiccation-tolerant (*Porella platyphylla*) and desiccation-sensitive (*Sphagnum angustifolium*) species. In our experiment, the analysis of $RWC_{0.5}$, i.e. the RWC at which the sample showed half of maximum Φ_{PSII} , reflected the species-specificity. It reached 12.6% RWC in desiccation-tolerant (*B. austro-glareosum*) and 9.8% RWC in highly-tolerant (*B. pseudotriquetrum*) species. The concept of species-specific desiccation tolerance, however, is not generally accepted as valid since there are many interacting factors. These include the phenotypic (Proctor et al. 2007) and ecotypic plasticity of the species, physiological 'history' of the sample, microclimate effects (temperature, light) and the rate of desiccation/dehydration, which may co-act and change the desiccation tolerance/sensitivity. Although many of the protective mechanisms of bryophytes are common among the vascular plants, there are fundamental interspecific differences in their responses to desiccation. The mechanism can be divided into two groups, the first related to a chloroplastic apparatus and effective quenching of absorbed light energy (for details see below), while the second is related to the cellular response to dehydration. The latter one comprises sucrose accumulation, antioxidant synthesis (e.g. glutathione), stress proteins and the synthesis of dehydrins (for mosses reviewed by Proctor et al. 2007).

Several protective mechanisms are activated in mosses during dehydration including energy dissipation by three types of quenchers (for a review see, e.g. Yamakawa et al. 2012). These quenchers are (1) protonation of a thylakoid protein, (2) thermal dissipation of energy from light-harvesting complexes (Heber et al. 2006, 2008) and (3) a third mechanism based on the reversible photo-accumulation of a chlorophyll radical in PS II RCs. Activation of these mechanisms provides an increase in non-photochemical quenching (qN, NPQ) in desiccating mosses. Heber (2012) reviewed thermal dissipation from LHC II in desiccating mosses and showed that dissipation occurred faster than energy capture by functional reaction centres. When this mechanism is insufficient, the other mechanism described below permits energy dissipation from the RCs. It is based on the involvement of an efficient spillover, i.e. energy transfer from PS II to PS I as suggested by Slavov et al. (2013). This phenomenon is called desiccation-induced quenching and is described as a property of photosystem II reaction centres in *Rhytidiadelphus squarrosus* (Heber et al. 2006). In the photosynthetic apparatus of mosses, both (1) PSBS and (2) light-harvesting complex stress-related proteins (LHCSRs) are expressed during stress and active in non-photochemical quenching (Alboresi et al. 2011; Gerotto et al. 2012). A small protein (PSBS) is associated primarily with the energy quenching (qE) component of non-photochemical quenching (Nyíogi et al. 2005). Conversely, LHCSR protein is involved in thermal dissipation as reported by Stella et al. (2016) for *Physcomitrella patens*.

The above-specified mechanisms were involved in the protection of PS II and were demonstrated as qN (NPQ) increased during desiccation. Our data support such an interpretation because qN tended to increase (exponentially or following an S-curve [data not shown]) at RWCs below 50 (*B. austro-glareosum*) and by 15%–30% (*B. pseudotriquetrum*).

In addition to the above-noted three quenching mechanisms, several antioxidative substrates and enzymes are involved in non-photochemical quenching during desiccation (ASC in Paciolla and Tommasi [2003], SOD, CAT, APX and POD in Seel et al. [1992b] and Pizarro et al. [2019]). In general, mosses possess two types of antioxidant defence mechanisms (Chobot et al. 2008). The first of these removes or reduces free radicals including enzymes and antioxidants SOD, CAT, POD, vitamin C, Car, GSH (reviewed by Zhang et al. 2017) and zeaxanthin (see Deltoro et al. 1998b; Nabe et al. 2007). The second type produces antioxidants, such as glutathione reductase and ascorbate peroxidase (Oliver et al. 2005).

Photosynthetic electron transport curves during dehydration

In our data, ETR in response to light declined in severely desiccated mosses (RWC below 20%; see RLCs in Fig. 6.). This was indicative of a dehydration-dependent decline in Φ_{PSII} that was documented

for mosses (see, e.g. Proctor et al. 2007). However, several other factors may interact with and affect ETR and the shape of RLC in mosses. Among them, the light and temperature to which the samples were exposed and/or acclimated to before the experiment play an important role. Griffin-Nolan et al. (2018) showed that acclimation to low/high light caused differences in the ETR light-response curves in temperate moss species. Similarly, Schroeter et al. (2012) showed a substantial difference between ETR curves recorded for 'sun' and 'shade' ecotypes of *B. argenteum*. Peng et al. (2019) reported that short-term high light treatment led to the flattening of ETR curves (a lower ETR_{max}) due to photoinhibition in *Physcomitrella patens* deficient in LHC components. This was also supported by the data of Schroeter et al. (2012), who reported a 50% reduction in the ETR_{max} of shade ecotype *B. argenteum* treated by high light for 6 h. Interspecific differences found in maximum light utilization coefficient (α , see Results) could be interpreted as the better use of absorbed light energy in primary photosynthetic processes in *B. austro-glareosum* compared with *B. pseudotriquetrum* throughout a broad range of thallus dehydration. However, *B. austro-glareosum* showed a more rapid decline in ETR during dehydration (see the RLCs at 40% RWC in Fig. 6). For *B. pseudotriquetrum*, Kudoh et al. (2003) reported an ETR_{max} of 25, which is comparable to our data.

Spectral reflectance indices

Hydration-induced reflectance changes in the visible region were mainly due to high absorption by photosynthetic pigments. Malenovský et al. (2015) suggested that green and red moss reflectance (i.e. wavelengths at 530–600 nm) could be used to reveal the content of xanthophyll cycle pigments that changes during desiccation as reported by Calatayud et al. (1997) and Deltoro et al. (1999) and which function as part of the protective mechanisms required by moss in response to oxidative stress in chloroplasts. The increase in the ratio of zeaxanthin to the total xanthophyll cycle pigments pool is typically reported in high light-exposed mosses (a photoprotective mechanism); however, it was also found in slow desiccating mosses (Fernández-Marín et al. 2013). A comparison of spectral reflectance curves in the range of 650–680 nm wavelengths revealed that both *B. pseudotriquetrum* and *B. austro-glareosum* had higher reflectance in a dry state, which is consistent with the data presented by Malenovský et al. (2015). Specifically, for *B. pseudotriquetrum*, lower reflectance values for a dry state compared with a wet state were found at a 520 nm wavelength, similar to Malenovský et al. (2015).

It has been well-established that in poikilohydric autotrophs, dehydration leads to significant changes in spectral reflectance, particularly in the visible (380–720 nm) range (Guyot 1990). Such changes bring about differences in PRI and NDVI, which are species-specific and based on structural changes and pigmentation during desiccation. Our data indicate a good comparison to the NDVI (0.835) and PRI (0.160) reported for hydrated Antarctic moss *B. pseudotriquetrum* by Lovelock and Robinson (2002). In partly dehydrated moss thalli, however, several interacting factors may play a role including the dehydration-dependent movements of leaves. During desiccation, the leaves of moss reduce photosynthetic activity and pass through shape changes and geometrical rearrangement, i.e. 'shrinking' and 'curling' (see Zotz and Kahler 2007). These changes affect spectral reflectance curves and spectral indices. Generally, the top of a wet moss canopy with expanded leaves reflects significantly more near-infrared light than a dry canopy (Malenovský et al. 2015). The shrunken shoots and curled leaves of dry moss allow photons to penetrate deeper inside the turf, where they are absorbed.

The dehydration-induced decline in NDVI and PRI has been reported for several species of the *Sphagnum* genus; however, substantial interspecific differences do exist (Harris 2008). Similarly, May et al. (2018) reported a desiccation-induced decline in NDVI for several moss species in a manipulated drying experiment. Field evidence (e.g. in Svalbard as denoted by Valøen 2019) supports a dehydration-induced decline in NDVI in Arctic mosses. Our data support a decline in NDVI in desiccating *B. pseudotriquetrum* and *B. austro-glareosum*. The physiological consequences of a dehydration-induced decline in NDVI are generally unknown for mosses. However, lower NDVI values and higher levels of red reflectance at a low RWC may act as mechanisms for minimising the absorption of incident light to

prevent further evaporative water loss or cellular damage (Charron and Quatrano 2009; Cruz de Carvalho et al. 2012). In both species, non-photochemical quenching (qN) increased at NDVI values below 0.54, which indicated the involvement of a protective mechanism at low RWC (below 20%).

However, PRI values declined with desiccation only in *B. pseudotriquetrum* (similar to the data of Harris 2008). The reason for a biphasic change in PRI during desiccation (a decrease followed by an increase) in *B. austro-glareosum* remains unknown. Similar biphasic changes with an RWC decline was found in, e.g. a lichen (*Physconia muscigena*, Barták et al. 2018). The PRI decline caused both an increase (*B. pseudotriquetrum*) and a decrease (*B. austro-glareosum*) in qN. The reason for the two contrasting responses (see Fig. 8) was that PRI behaved differently at RWCs below 30%. In the RWC range of 0%–30%, PRI increased with desiccation in *B. austro-glareosum* and decreased in *B. pseudotriquetrum*. The latter response, including the non-photochemical quenching rise with desiccation, was reported for *Sphagnum* sp. (Van Gaalen et al. 2007). Similarly, Rastogi et al. (2019) found a decrease in PRI in desiccating *Sphagnum*, which was related to a decrease in the performance index (PI), a ChlF parameter derived from a rapid ChlF induction curve (OJIP). An earlier study by Orekhova (unpublished data, manuscript in preparation) showed an S-curve decline in the PI of *Bryum pseudotriquetrum* with a decrease in RWC. This indicated the significant potential of studies exploiting simultaneous ChlF and spectral reflectance measurements in the analysis of the relationship between the two groups of data.

Since low RWC (below 20%) led to high qN (above 0.8) in both experimental species, the involvement of xanthophyll cycle pigment in the protection of desiccating moss was considered. These changes, i.e. a desiccation-induced increase of zeaxanthin content (Deltoro et al. 1998b) and a de-epoxidation state of the xanthophyll cycle pigments (DEPS) are, however, associated with a decrease in PRI since the interconversion of xanthophyll cycle pigments can be detected by changes in leaf absorbance at 505–515 nm or via reflectance (e.g. Gamon et al. 1990). Some lichens and mosses do not exhibit a decrease in PRI at low RWC, which raises questions about interspecific differences concerning the constitutive amount of xanthophyll cycle pigments pool and the shape of the dehydration response curves of PRI. While the majority of mosses and lichens show a decline in PRI with thallus desiccation at a low RWC, some exceptions exist (*B. austro-glareosum* in this study and *Physconia muscigena* in Barták et al. 2018).

Both MCARI and G spectral indices showed a decline with an RWC decrease, which is comparable to evidence derived from desiccating lichens in the study of Barták et al. (2016). In current study, they exhibited a high sensitivity to dehydration. Therefore, the MCARI index could be used as an indicator of dehydration status in moss thalli. Since the G courses were similar to NDVI, the GI can be used as a good proxy for dehydration state in mosses, similar to NDVI. For follow-up studies involving mosses, the analysis of several simultaneously measured spectral reflectance indices may be recommended since, other than the hydration status and general optical properties in a wet and dry state, such an approach will allow for distinguishing the difference between moss species and co-occurring components of vegetation types as shown by Erudel et al. (2017).

Spectral absorbance curves showed high peaks in the UV-range, indicating a high level of UV-B absorbing compounds. Our data suggest a high constitutive amount of UV-screening compounds in *B. austro-glareosum* and *B. pseudotriquetrum*. (Fig. 9). Since both moss species were collected in Antarctica, the high content of UV-B screens could be attributed to the ozone hole and its effect on UV-B incidence on Antarctic terrestrial ecosystems. Recent climate change holds significant implications for the survival and physiological processes of Antarctic bryophytes (Robinson et al. 2018) due to stratospheric ozone depletion beginning in the 1970s, which produced a rapid increase in biologically damaging UV-B radiation. Additionally, *B. pseudotriquetrum* is reported to have high levels of UV absorbing compounds (Waterman et al. 2018). In Antarctic mosses, UV-B screening compounds were identified as cell wall-bound (Waterman et al. 2018) and soluble phenolics (Clark and Robinson 2008). These are found in lichens in large quantities (see, e.g. Klavina et al. 2015).

Conflict of Interest

The authors declare that no conflict of interest.

References

- Alboresi A, Gerotto C, Cazzaniga S, Bassi R, Morosinotto T (2011) A red-shifted antenna protein associated with photosystem II in *Physcomitrella patens*. *J Biol Chem* 286:28978–28987.
- Alpert P (2000) The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. *Plant Ecol* 15:5–17.
- Arróniz-Crespo M, Gwynn-Jones D, Callaghan TV, Núñez-Olivera E, Martínez-Abaigar J, Horton P, Phoenix GK (2011) Impacts of long-term enhanced UV-B radiation on bryophytes in two sub-Arctic heathland sites of contrasting water availability. *Ann Bot* 108:557–565.
- Barcikowski A, Loro P (1999) Changes in chlorophyll content throughout the year in selected species of mosses on King George Island, South Shetland Islands, maritime Antarctic. *Pol Polar Res* 20(3):291–299.
- Barták M, Trnková K, Hansen ES, Hazdrová J, Skácelová K, Hájek J, Forbelská M (2015a) Effect of dehydration on spectral reflectance and photosynthetic efficiency in *Umbilicaria arctica* and *U. hyperborea*. *Biol Plantarum* 59(2):357–365.
- Barták M, Váczi P, Stachoň Z, Kubešová S (2015b) Vegetation mapping of moss-dominated areas of northern part of James Ross Island (Antarctica) and a suggestion of protective measures. *Czech Polar Reports* 5:75–87.
- Barták M, Hájek J, Amarillo AC, Hazdrová J, Carreras H (2016) Changes in spectral reflectance of selected Antarctic and South American lichens caused by dehydration and artificially-induced absence of secondary compounds. *Czech Polar Reports* 6:221–230.
- Barták M, Hájek J, Morkusová J, Skácelová K, Košuthová A (2018) Dehydration-induced changes in spectral reflectance indices and chlorophyll fluorescence of Antarctic lichens with different thallus color, and intrathalline photobiont. *Acta Physiol Plant.* 40:177.
- Bartošková H, Nauš J, Výkruta M (1999) The arrangement of chloroplasts in cells influences the reabsorption of chlorophyll fluorescence emission. The effect of desiccation on the chlorophyll fluorescence spectra of *Rhizomnium punctatum* leaves. *Photosynth Res* 62:251–260.
- Baxter R, Emes MJ, Lee JA (1991) Short-term effects of bisulphite on pollution-tolerant and pollution-sensitive populations of *Sphagnum cuspidatum* Ehrh. (ex. Hoffm.). *New Phytol* 118(3):425–431.
- Bewley JD (1979) Physiological Aspects of Desiccation Tolerance. *Annu Rev Plant Physiol* 30: 195–238.
- Bewley JD, Krochko JE (1982) Desiccation tolerance. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H (eds) *Encyclopedia of plant physiology*. Vol 12B, *Physiological Ecology II*. pp. 325–378, Springer-Verlag, Berlin.
- Calatayud A, Deltoro VI, Barreno E, Del Valle-Tascon S (1997) Changes in *in vivo* chlorophyll fluorescence emission during desiccation and suggestion of zeaxanthin associated photoprotection. *Physiol Plant* 101:93–102.
- Charron AJ, Quatrano RS (2009) Between a Rock and a Dry Place: The Water-Stressed Moss. *Mol Plant* 2(3):478–486.

- Chobot V, Kubicová L, Nabbout S, Jahodár L, Hadacek F (2008) Evaluation of Antioxidant Activity of Some Common Mosses. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen Z Naturforsch C J Biosci* 63(7-8):476–482.
- Clarke LJ, Robinson SA (2008) Cell wall-bound ultraviolet-screening compounds explain the high ultraviolet tolerance of the antarctic moss, *Ceratodon Purpureus*. *New Phytol* 179:776–783.
- Cruz de Carvalho RC, Bernardes da Silva A, Soares R, Almeida AM, Coelho AV, Marques da Silva J, Branquinho C (2014) Differential proteomics of dehydration and rehydration in bryophytes: evidence towards a common desiccation tolerance mechanism. *Plant Cell Environ* 37:1499–1515.
- Csintalan Z, Proctor MCF, Tuba Z (1999) Chlorophyll Fluorescence during drying and rehydration in the mosses *Rhytidiadelphus loreus* (Hedw.) Warnst., *Anomodon viticulosus* (Hedw.) Hook. & Tayl. and *Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm. *Ann Bot* 84:235–244.
- Daughtry CST, Walthall CL, Kim MS, Brown DE, Colstoun E, McMurtrey JE (2000) Estimating corn leaf chlorophyll concentration from leaf and canopy reflectance. *Remote Sens Environ* 74:229–239.
- Davey MC (1997) Effects of short-term dehydration and rehydration on photosynthesis and respiration by Antarctic bryophytes. *Environ Exp Bot* 37(2–3):187–198.
- Deltoro VI, Morales ÁCF, Abadía A, Barreno E (1999) Changes in net photosynthesis, chlorophyll fluorescence and xanthophyll cycle interconversions during freeze-thaw cycles in the Mediterranean moss *Leucodon sciuroides*. *Oecologia* 120:499–505.
- Deltoro VI, Calatayud A, Gimeno WC, Barreno E (1998a) Water relations, chlorophyll fluorescence, and membrane permeability during desiccation in bryophytes from xeric, mesic, and hydric environments. *Can J Bot* 76:1923–1929.
- Deltoro VI, Calatayud A, Gimeno C, Abadía A, Barreno E (1998b) Changes in chlorophyll *a* fluorescence, photosynthetic CO₂ assimilation and xanthophyll cycle interconversions during dehydration in desiccation-tolerant and intolerant liverworts. *Planta* 207:224–228.
- Erudel T, Fabre S, Houet T, Mazier F, Briottet X. (2017) Criteria comparison for classifying peatland vegetation types using *in situ* hyperspectral measurements. *Remote Sensing* 9:748.
- Fernández-Marín B, Kranner I, Sebastián MS, Artetxe U, Laza JM, Vilas JL, Pritchard HW, Nadajaran J, Míguez F, Becerril JM, García-Plazaola JI (2013) Evidence for the absence of enzymatic reactions in the glassy state. A case study of xanthophyll cycle pigments in the desiccation-tolerant moss *Syntrichia ruralis*. *J Exp Bot* 64:3033–3043.
- Fernández-Marín B, Míguez F, Becerril JM, García-Plazaola JI (2011) Dehydration-mediated activation of the xanthophyll cycle in darkness: is it related to desiccation tolerance? *Planta* 234:579–588.
- Gamon JA, Field CB, Bilger W, Björkman O, Fredeen A, Peñuelas J (1990) Remote sensing of the xanthophyll cycle and chlorophyll fluorescence in sun over leaves and canopies. *Oecologia* 85:1–7.
- Gao B, Zhang D, Li X, Yang H, Zhang Y, Wood AJ (2015) *De novo* transcriptome characterization and gene expression profiling of the desiccation tolerant moss *Bryum argenteum* following rehydration *BMC. Genomics* 16:416.
- Gerotto C, Alboresi A, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T (2012) Coexistence of plant and algal energy dissipation mechanisms in the moss *Physcomitrella patens*. *New Phytol* 196:763–773.
- Giudici GNM, Hájek J, Barták M, Kubešová S (2018) Comparative research of photosynthetic processes in selected poikilohydric organisms from Mediterranean and Central-European alpine habitats. *Czech Polar Reports* 8(2):286–298.

- Green TGA, Sancho LG, Pintado A (2011) Ecophysiology of desiccation/rehydration cycles in mosses and lichens. In: Lüttge U, Beck E, Bartels D (eds) *Plant Desiccation Tolerance*, Ecological Studies 215, Part 2. pp. 89–120. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Griffin-Nolan RJ, Zelehowsky A, Hamilton JG, Melcher PJ (2018) Green light drives photosynthesis in mosses. *J Bryol* 40(4):342–349.
- Guyot G (1990) Optical properties of vegetation canopies. In: Steven MD, Clark JA (eds) *Applications of Remote Sensing in Agriculture*. pp. 19–43. Butterworths, London.
- Hamerlynck EP, Tuba Z, Csintalan Z, Nagy Z, Henebry G, Goodin D (2000) Diurnal variation in photochemical dynamics and surface reflectance of the desiccation-tolerant moss, *Tortula ruralis*. *Plant Ecol* 151:55–63.
- Harris A (2008) Spectral reflectance and photosynthetic properties of *Sphagnum* mosses exposed to progressive drought. *Ecohydrol* 1:35–42.
- Heber U, Bilger W, Shuvalov VA (2006) Thermal energy dissipation in reaction centres and in the antenna of photosystem II protects desiccated poikilohydric mosses against photo-oxidation. *J Exp Bot* 57:2993–3006.
- Heber U (2008) Photoprotection of green plants: a mechanism of ultra-fast thermal energy dissipation in desiccated lichens. *Planta* 228(4):641–650.
- Heber U (2012) Conservation and dissipation of light energy in desiccation-tolerant photoautotrophs, two sides of the same coin. *Photosynth Res* 113:5–13.
- Hu R, Xiao L, Bao F, Li X, He Y (2016) Dehydration-responsive features of *Atrichum undulatum*. *J Plant Res* 129:945–954.
- Ino Y (1990) Field measurement of net photosynthesis of mosses at Langhovde, East Antarctica. *Ecol Res* 5:195–205.
- Jassey VEJ, Signarbieux C (2019) Effects of climate warming on *Sphagnum* photosynthesis in peatlands depend on peat moisture and species-specific anatomical traits. *Glob Change Biol* 25:3859–3870.
- Jupa R, Hájek J, Hazdrová J, Barták M (2012) Interspecific differences in photosynthetic efficiency and spectral reflectance in two *Umbilicaria* species from Svalbard during controlled desiccation. *Czech Polar Reports* 2(1):31–41.
- Kalaji HM, Schansker G, Ladle RJ, Goltsev V, Bosa K, Allakhverdiev SI, Brestic M, Bussotti F, Calatayud A, Dąbrowski P, Elsheery NI, Ferroni L, Guidi L, Hogewoning SW, Jajoo A, Misra AN, Nebauer SG, Pancaldi S, Penella C, Poli D, Pollastrini M, Romanowska-Duda ZB, Rutkowska B, Serôdio J, Suresh K, Szulc W, Tambussi E, Yannicari M, Zivcak M (2014) Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynth Res* 122:121–158.
- Klavina L, Springe G, Nikolajeva V, Martsinkevich I, Nakurte I, Dzabijeva D, Steinberga I (2015) Chemical composition analysis, antimicrobial activity and cytotoxicity screening of moss extract (moss phytochemistry). *Molecules* 20:17221–17243.
- Kudoh S, Kashino Y, Imura S (2003) Ecological studies of aquatic moss pillars in Antarctic lakes. Light response and chilling and heat sensitivity of photosynthesis. *Polar Bioscience* 16:33–42.
- Lappalainen NM, Huttunen S, Suokanerva H (2008) Acclimation of a pleurocarpous moss *Pleurozium schreberi* (Britt.) Mitt. to enhanced ultraviolet radiation *in situ*. *Glob Change Biol* 14:321–333.
- Li J, Li X, Chen C (2014) Degradation and reorganization of thylakoid protein complexes of *Bryum argenteum* in response to dehydration and rehydration. *Bryologist* 117:110–118.

- Lichtenthaler HK, Welburn AR (1983) Determination of Total Carotenoids and Chlorophylls *a* and *b* of Extracts in Different Solvents. *Biochem Soc T* 11:591–592.
- Lovelock CE, Robinson SA (2002) Surface reflectance properties of Antarctic moss and their relationship to plant species, pigment composition and photosynthetic function. *Plant Cell Environ* 25(10):1239–1250.
- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An Overview. *Arch Biochem Biophys* 444:139–158.
- Malenovský Z, Turnbull JD, Lucieer A, Robinson SA (2015) Antarctic moss stress assessment based on chlorophyll content and leaf density retrieved from imaging spectroscopy data. *New Phytol* 208:608–624.
- Marschall M, Borbély P, Pné-Kónya E, Sütö S (2018) Background processes and the components of photoprotection and regeneration under rehydration in desiccation-tolerant and desiccation-sensitive bryophytes. In: *Book for the Plant Biology Europe Conference in Copenhagen*, p. 80.
- May LJ, Parker T, Unger S, Oberbauer SF (2018) Short term changes in moisture content drive strong changes in Normalized Difference Vegetation Index and gross primary productivity in four Arctic moss communities. *Remote Sens Environ* 212:114–120.
- Mayaba N, Minibayeva M, Beckett RP (2002) An oxidative burst of hydrogen peroxide during rehydration following desiccation in the moss *Atrichum androgynum*. *New Phytol* 155:275–283.
- Murray KJ, Tenhunen JD, Nowak RS (1993) Photoinhibition as a Control on Photosynthesis and Production of *Sphagnum* mosses. *Oecologia* 96(2):200–207.
- Nabe H, Funabiki R, Kashino Y, Koike H, Satoh K (2007) Responses to desiccation stress in bryophytes and an important role of dithiothreitol – Insensitive non-photochemical quenching against photoinhibition in dehydrated states. *Plant Cell Physiol* 48(11):1548–1557.
- Nayaka S, Saxena P (2014) Physiological responses and ecological success of lichen *Stereocaulon foliolosum* and moss *Racomitrium subsecundum* growing in same habitat in Himalaya. *J Fundam Appl Life Sci* 4(3):167–179.
- Newsham KK, Hodgson DA, Murray AWA, Peat HJ, Lewis Smith RI (2002) Response of two Antarctic bryophytes to stratospheric ozone depletion. *Glob Change Biol* 8:972–983.
- Niyogi KK, Li X-P, Rosenberg V, Jung H-S (2005) Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *J Exp Bot* 56:375–382.
- Oliver MJ, Mishler BD, Quisenberry JE (1993) Comparative measures of desiccation-tolerance in the *Tortula ruralis* complex. I. Variation in damage control and repair. *Am J Bot* 80:127–136.
- Oliver MJ, Velten J, Wood AJ (2000) Bryophytes as experimental models for the study of environmental stress tolerance: *Tortula ruralis* and desiccation-tolerance in mosses. *Plant Ecology* 151:73–84.
- Oliver MJ, Velten J, Mischler BD (2005) Desiccation tolerance in bryophytes: a reflection of a primitive strategy for plant survival in dehydrating habitats. *Integr Comp Biol* 45:788–799.
- Oliver MJ, Hudgeons J, Dowd SE, Payton PR (2009) A combined subtractive suppression hybridization and expression profiling strategy to identify novel desiccation response transcripts from *Tortula ruralis* gametophytes. *Physiol Plant* 136:437–460.
- Paciolla M, Tommasi F (2003) The ascorbate system in two bryophytes: *Brachythecium velutinum* and *Marchantia polymorpha*. *Biol Plantarum* 47:387–393.
- Pannowitz S, Green TGA, Maysek K, Schlenz M, Seppelt R, Sancho LG, Türk R, Schroeter B (2005) Photosynthetic responses of three common mosses from continental Antarctica. *Antarctic Sci* 17:341–352.

- Peng X, Deng X, Tang X, Tan T, Zhang D, Liu B, Lin H (2019) Involvement of Lhcb6 and Lhcb5 in Photosynthesis Regulation in *Physcomitrella patens* Response to Abiotic Stress. *Int J Mol Sci* 20:3665.
- Pizarro M, Contreras RA, Köhler H, Zúñiga GE (2019) Desiccation tolerance in the Antarctic moss *Sanionia uncinata*. *Biol Res* 52:46.
- Pressel S, Duckett JG (2010) Cytological insights into the desiccation biology of a model system: moss protonemata. *New Phytol* 185:944–963.
- Proctor MCF (1990) The physiological basis of bryophyte production. *Bot J Linn Soc* 104:61–77.
- Proctor MCF, Ligrone R, Duckett JG (2007) Desiccation tolerance in the Moss *Polytrichum formosum*: Physiological and fine-structural changes during desiccation and recovery. *Ann Bot* 99:1243.
- Proctor MFC, Oliver MJ, Wood AJ, Alpert P, Stark LR, Cleavitt NL, Mishler BD (2007) Desiccation-tolerance in bryophytes: A review. *Bryologist* 110:595–621.
- Putzke J, Pereira AB (2001) The Antarctic mosses with special reference to the Shetland Island. Canoas, Lutheran University of Brazil, Editora da Ulbra, 196 p.
- Rastogi A, Antala M, Gąbka M, Rosadzinski S, Stróżecki M, Brestic M, Juszczak R (2020) Impact of warming and reduced precipitation on morphology and chlorophyll concentration in peat mosses (*Sphagnum angustifolium* and *S. fallax*). *Scientific Rep* 10: 8592.
- Rastogi A, Strozecki M, Kalaji H, Łuców D, Lamentowicz M, Juszczak R (2019) Impact of warming and reduced precipitation on photosynthetic and remote sensing properties of peatland vegetation. *Environ Exp Bot* 160: 71-80.
- Robinson SA, King DH, Bramley-Alves J, Waterman MJ, Ashcroft MB, Wasley J, Turnbull JD, Miller RE, Ryan-Colton E, Benny T, Mullany K, Clarke LJ, Barry LA, Hua Q (2018) Rapid change in East Antarctic terrestrial vegetation in response to regional drying. *Nat Clim Change* 8:879–884.
- Robinson SA, Turnbull JD, Lovelock CE (2005) Impact of changes in natural ultraviolet radiation on pigment composition, physiological and morphological characteristics of the Antarctic moss, *Grimmia antarctici*. *Glob Change Biol* 11:476–489.
- Robinson SA, Wasley J, Popp M, Lovelock CE (2000) Desiccation tolerance of three moss species from continental Antarctica. *Aust J Plant Physiol* 27:379–388.
- Roháček K, Barták M (1999) Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* 37:339–363.
- Roháček K (2010) Method for resolution and quantification of components of the non-photochemical quenching (qN). *Photosynth Res* 105:101–113.
- Ronen R, Galun M (1984) Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of Chlorophyll degradation. *Environ Exp Bot* 24:239–245.
- Rouse JW, Haas RH, Schell JA, Deering DW (1974) Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS. In: Freden SC, Mercanti EP, Becker M (eds) *Third Earth Resources Technology Satellite – 1 Symposium. Volume I: Technical Presentations*, NASA SP-351. pp. 309–317. NASA, Washington.
- Russell S (1985) Bryophyte production at Marion Island. In: Siegfried WR, Condy PR, Laws RM (eds) *Antarctic nutrient cycles and food webs*. pp. 200–203. Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- Rütten D, Santarius KA (1992) Age-related differences in frost sensitivity of the photosynthetic apparatus of two *Plagiomnium* species. *Planta* 187(2):224–229.
- Schlenso M, Pannowitz S, Green TGA, Schroeter B (2004) Metabolic recovery of continental antarctic cryptogams after winter. *Polar Biol* 27:399–400.

- Schlensof M, Schroeter B (2001) A new method for the accurate in site monitoring of chlorophyll a fluorescence in lichens and bryophytes. *Lichenologist* 33(5):443–452.
- Schroeter B, Green TGA, Kulle D, Pannewitz S, Schlensof M, Sancho LG (2012) The moss *Bryum argenteum* var. *muticum* Brid. is well adapted to cope with high light in continental Antarctica. *Antarctic Science* 24:281–291.
- Seel WE, Baker NR, Lee JA (1992a) Analysis of the decrease in photosynthesis on desiccation of mosses from xeric and hydric environments. *Physiol Plantarum* 86:451–458.
- Seel WE, Hendry GAF, Lee JA (1992b) The combined effects of desiccation and irradiance on mosses from xeric and hydric habitats. *J Exp Bot* 4:1023–1031.
- Singh J, Singh RP (2014) Adverse Effects of UV-B Radiation on Plants Growing at Schirmacher Oasis, East Antarctica. *Toxicol Int* 21(1):101–106.
- Šinžar-Sekulić J, Sabovljević M, Stevanović B (2005) Comparison of desiccation tolerance among mosses from different habitats. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 57(3):189–192.
- Slavov CH, Reus M, Holzwarth AR (2013) Two different mechanisms cooperate in the desiccation-induced excited state quenching in *Parmelia* lichen. *J Phys Chem B* 117(38):11326–11336.
- Smith RCG, Adams J, Stephens DJ, Hick PT (1995) Forecasting wheat yield in a Mediterranean-type environment from the NOAA satellite. *Aust J Agric Res* 46:113–125.
- Stark LR, Greenwood JL, Brinda JC, Oliver MJ (2013) The desert moss *Pterygoneurum lamellatum* (Pottiaceae) exhibits an inducible ecological strategy of desiccation tolerance: Effects of rate of drying on shoot damage and regeneration. *Am J Bot* 100(8):1522–1531.
- Stella GR (2016) Light stress and photoprotection in green algae, mosses and diatoms. Ph.D. thesis, University of Verona and University Pierre et Marie Curie, 144 p.
- Stoklasa-Wojtasz A, Rzepka A, Rit G (2012) Responses of mosses species on environment stress factors. In: Grzesiak MT, Rzepka A, Hura T, Grzesiak S (eds) *Plant functioning under environmental stress*. The F Górski Institute of Plant Physiology. pp. 69–83. Polish Academy of Science, Cracow, Poland.
- Tatur A, Myrcha A, Fabiszewski J, Niegodźisz J (1997) Formation of abandoned penguin colony ecosystems in maritime Antarctic. *Polar Biol* 17:405–417.
- Trnková K, Barták M (2017) Desiccation-induced changes in photochemical processes of photosynthesis and spectral reflectance in *Nostoc commune* (Cyanobacteria, Nostocales) colonies from polar regions. *Phycol Res* 65(1):44–50.
- Tuba Z, Csintalan Z, Proctor MCF (1996) Photosynthetic responses of a moss, *Tortula ruralis* ssp. *ruralis*, and the lichens *Cladonia convoluta* and *C. furcata* to water deficit and short periods of desiccation, and their ecophysiological significance: A baseline study at present-day concentration. *New Phytol* 133:353–361.
- Valøen K (2019) Stochastic rain events increase NDVI through moss water content: a High-Arctic field experiment. Master's thesis. Norwegian University of Science and Technology, 46 p.
- Van Gaalen KE, Flanagan L, Peddle DR (2007) Photosynthesis, chlorophyll fluorescence and spectral reflectance in Sphagnum moss at varying contents. *Oecologia* 153(1):19–28.
- Wasley J, Robinson SA, Lovelock C, Popp M (2006) Some like it wet - Biological characteristics underpinning tolerance of extreme water stress events in Antarctic bryophytes. *Funct Plant Biol* 33(5):443–455.

- Waterman MJ, Bramley-Alves J, Miller RE, Keller PA, Robinson SA (2018) Photoprotection enhanced by red cell wall pigments in three East Antarctic mosses. *Biol Res* 51:49.
- White AJ, Critchley C (1999) Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynth Res* 59:63–72.
- Wood AJ (2007) The nature and distribution of vegetative desiccation-tolerance in hornworts, liverworts and mosses. *Bryologist* 110:163–177.
- Yamakawa H, Fukushima Y, Itoh S, Heber U (2012) Three different mechanisms of energy dissipation of a desiccation-tolerant moss serve one common purpose: To protect reaction centres against photo-oxidation. *J Exp Bot* 63:3765–3775.
- Zhang X (2016) Effects of drought stress and rehydration on chlorophyll fluorescence characteristics of *Erythrodontium julaceum* (Schwaegr.) par. In areas of puding karst rock desertification. *Bangladesh J Bot* 45(4):911–917.
- Zhang X, Zhao Y, Wang S (2017) Responses of antioxidant defense system of epilithic mosses to drought stress in karst rock desertified areas. *Acta Geochim* 36(2):205–212.
- Zhou X, Huang W, Kong W, Ye H, Dong Y, Casa R (2017) Assessment of leaf carotenoids content with a new carotenoid index: development and validation on experimental and model data. *Int J Appl Earth Obs* 57:24–35.
- Zhou X, Huang W, Zhang J, Kong W, Casa R, Huang Y (2019) A novel combined spectral index for estimating the ratio of carotenoid to chlorophyll content to monitor crop physiological and phenological status. *Int J Appl Earth Obs* 76:128–142.
- Zotz G, Kahler H (2007) A moss “canopy” – Small-scale differences in microclimate and physiological traits in *Tortula ruralis*. *Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants. Flora* 202:661–666.

Figure and Table legends

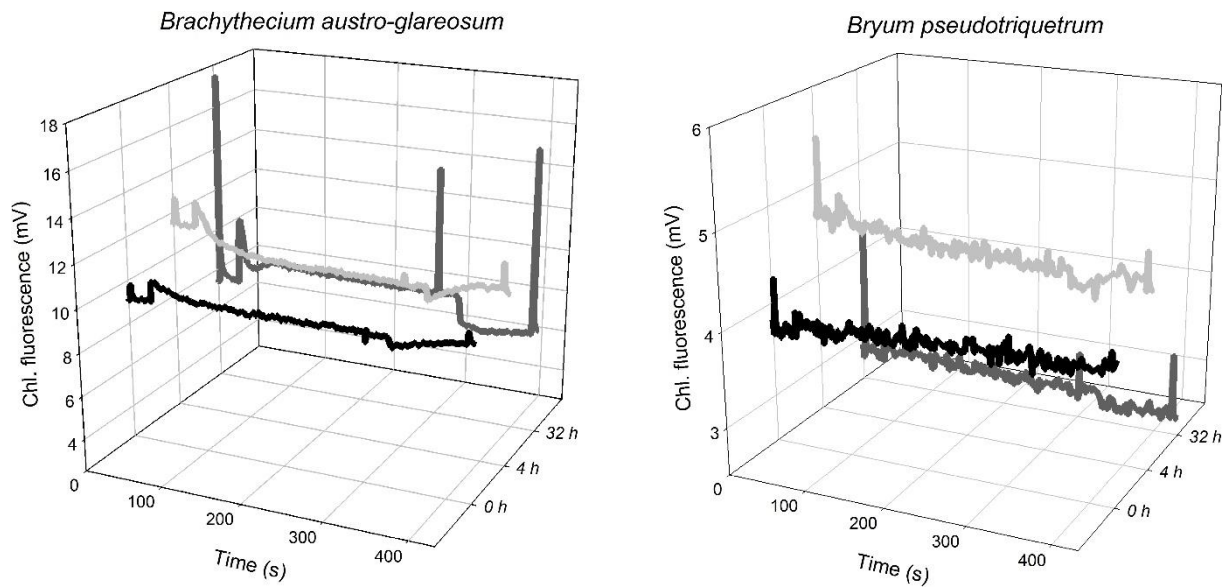


Fig. 1. Slow Kautsky kinetics in *Brachythecium austro-glareosum* (left) and *Bryum pseudotriquetrum* (right) based on rehydration time. The curves were recorded immediately after the start of rehydration (the black line) and after 24 (soft grey) and 32 (deep grey) h of rehydration.

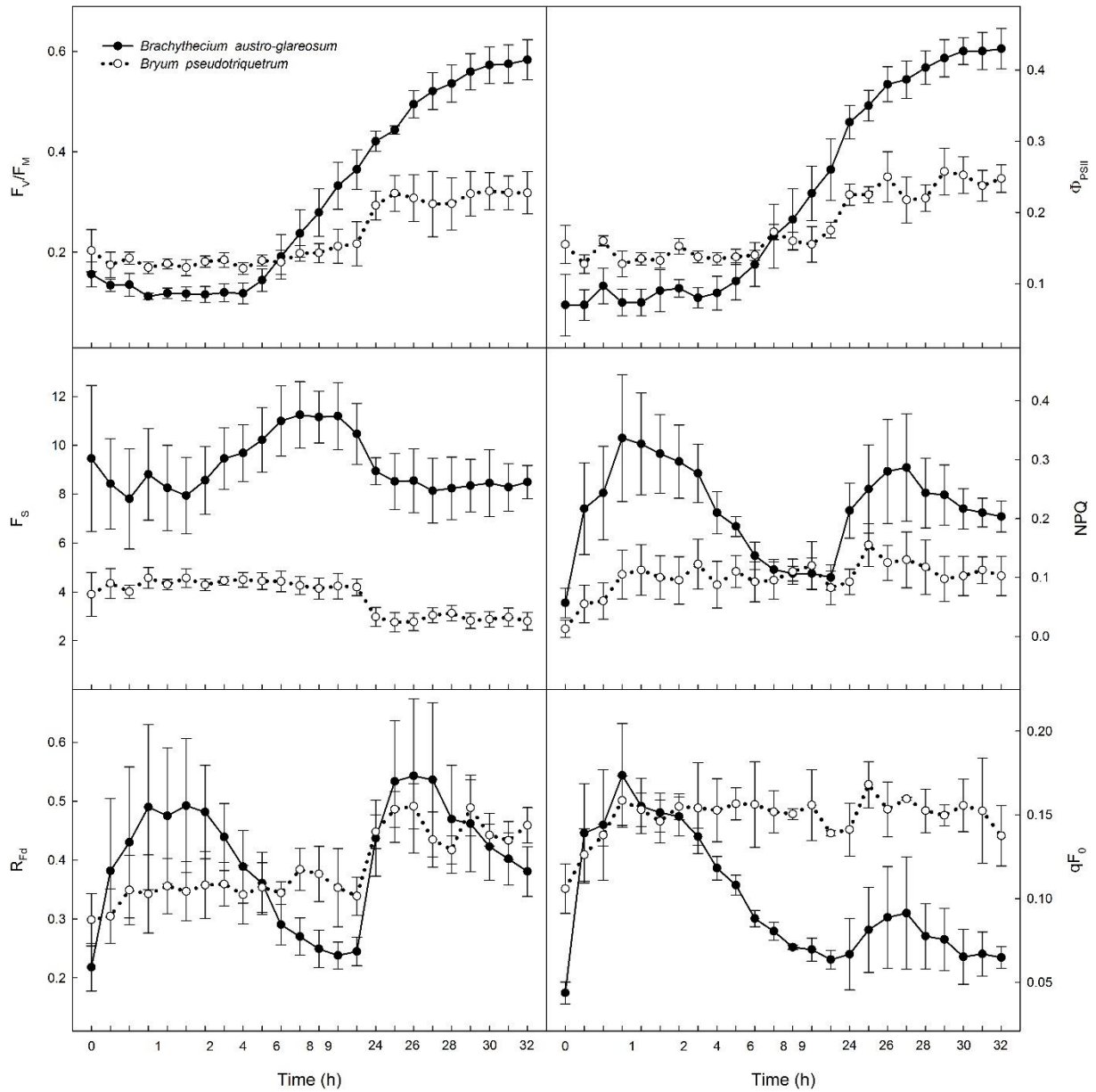


Fig. 2. The time courses of chlorophyll fluorescence parameters recorded during a 32 h rehydration period in *Brachythecium austro-glareosum* (full symbols) and *Bryum pseudotriquetrum* (open symbols). Data points represent the means of five replicates \pm standard error (bars). The symbol keys are as follows: F_v/F_m , potential yield of photochemical photosynthetic processes in PS II; Φ_{PSII} , the effective yield of photochemical photosynthetic processes in PS II; NPQ, the non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence; F_s , steady-state chlorophyll fluorescence; R_{Fd} , a relative decrease of chlorophyll fluorescence (vitality index); qF_0 , quenching of background chlorophyll fluorescence. The species-specific time courses of the parameters show a statistically significant difference ($P = 0.005$), except for R_{Fd} and qF_0 .

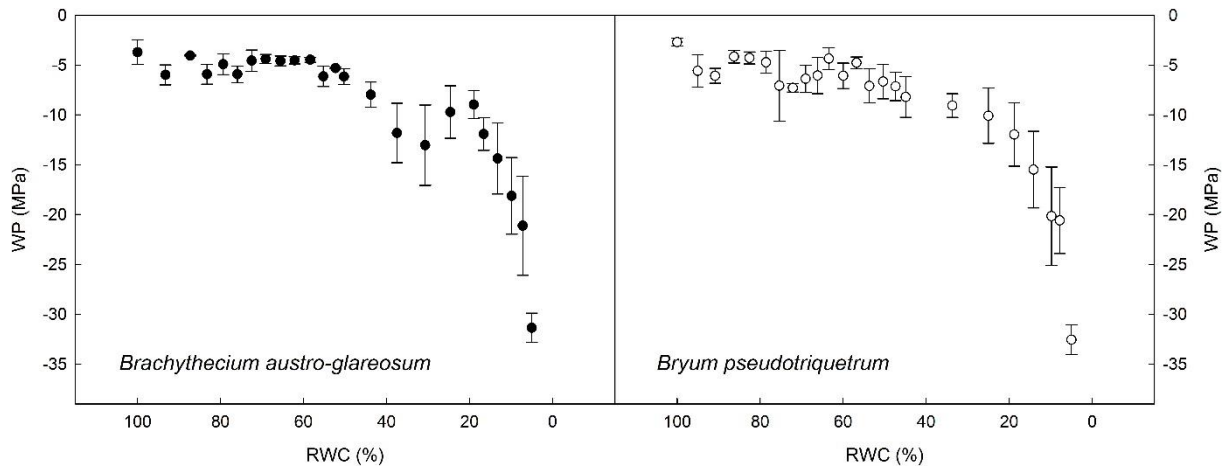


Fig. 3. The relationship of water potential (WP) to relative water content (RWC) in desiccating moss thalli from fully wet (RWC = 100%) to dry (RWC = 0%). The WP courses show no statistical difference ($P = 0.005$).

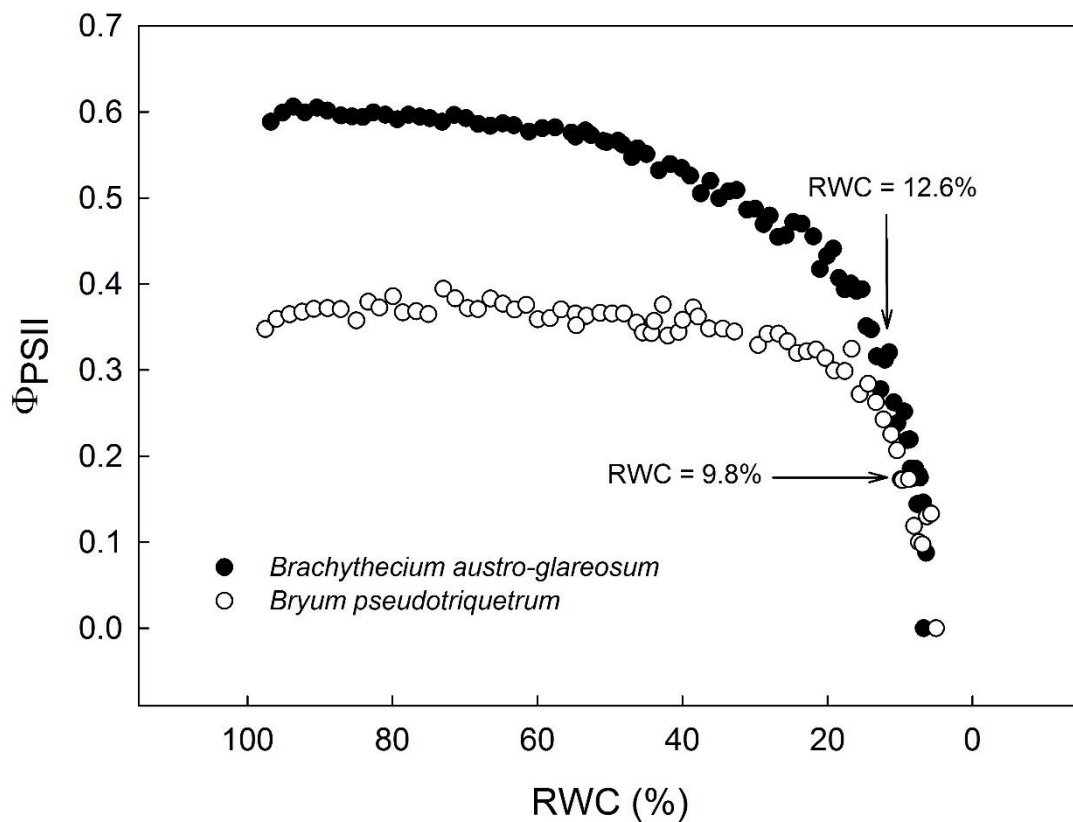


Fig. 4. The relationship between the effective quantum yield of PS II (Φ_{PSII}) and relative water content (RWC) in desiccating moss thalli from a fully wet (RWC = 100%) to dry (RWC = 0%) state. The Φ_{PSII} courses show a statistical difference ($P = 0.005$). The RWCs in which half of the maximum Φ_{PSII} value is reached is indicated by the arrow.

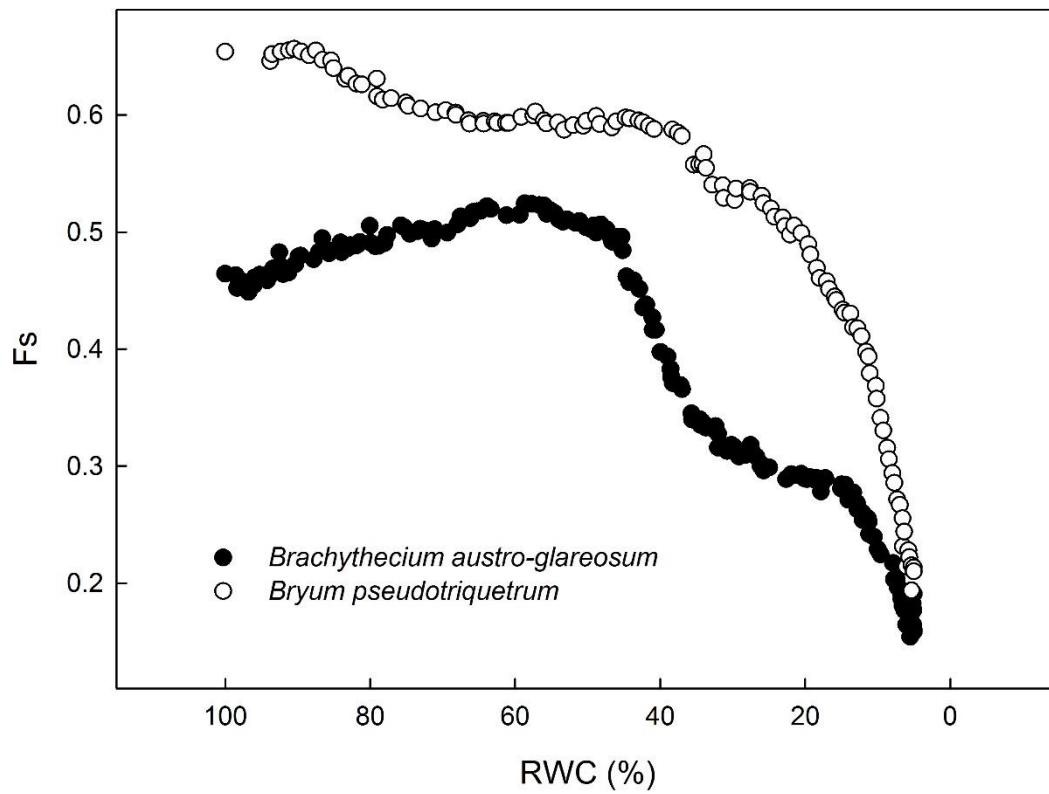


Fig. 5. The relationship of steady state chlorophyll fluorescence (F_s) to relative water content (RWC) in desiccating moss thalli from fully wet (RWC = 100%) to dry (RWC = 0%). The F_s courses show statistical difference ($P = 0.005$).

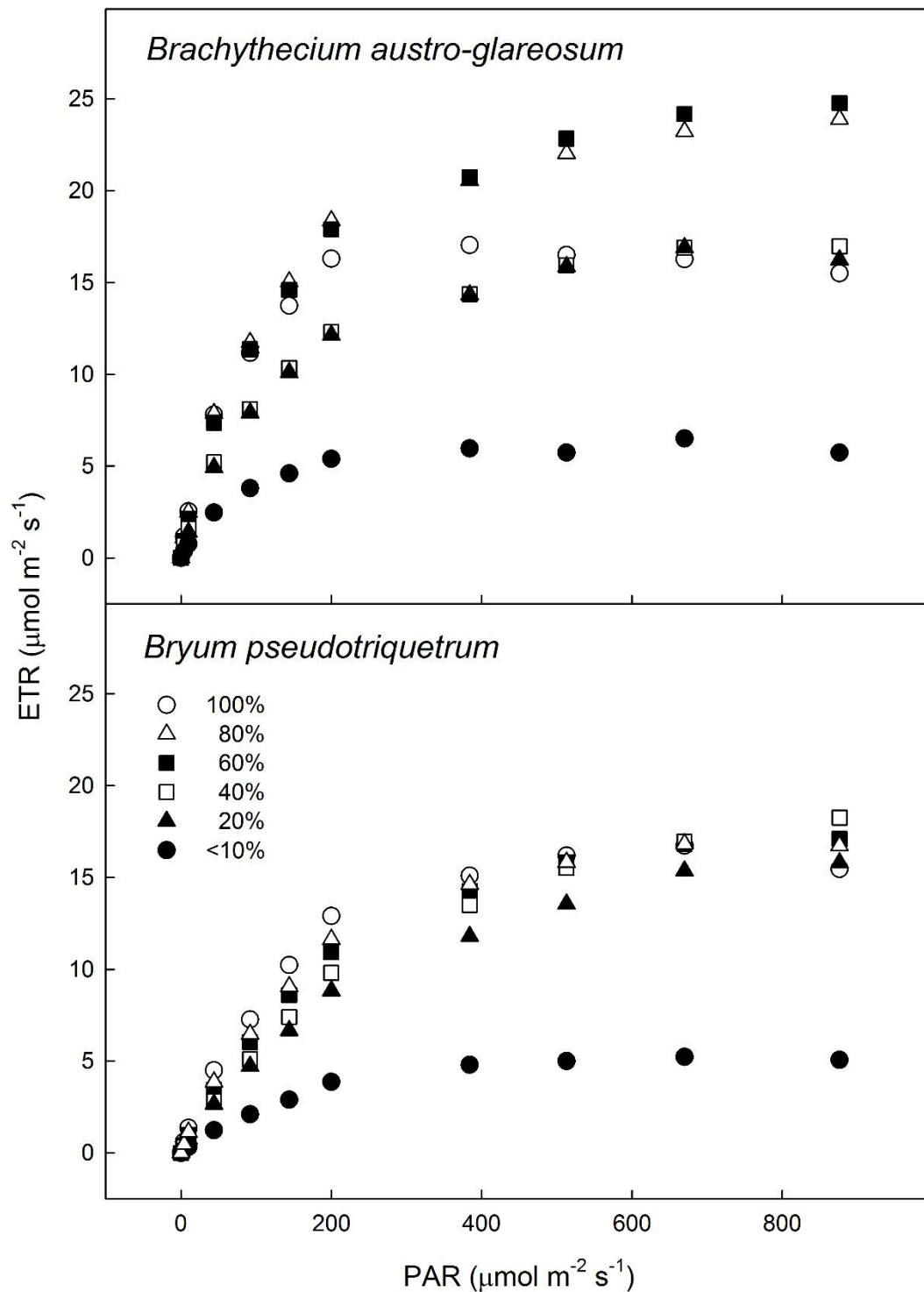


Fig. 6. The rapid light curves of electron transport rate (ETR) recorded for the thalli of *Brachythecium austro-glareosum* (upper panel) and *Bryum pseudotriquetrum* (lower panel) showing strong desiccation-induced limitation of the ETR at a relative water content (RWC) of approximately 20%. Species-specific differences in the ETR values recorded at a particular RWC show statistical significance ($P = 0.005$). Data points are the means of at least three samples and standard deviations were below 10% of the means.

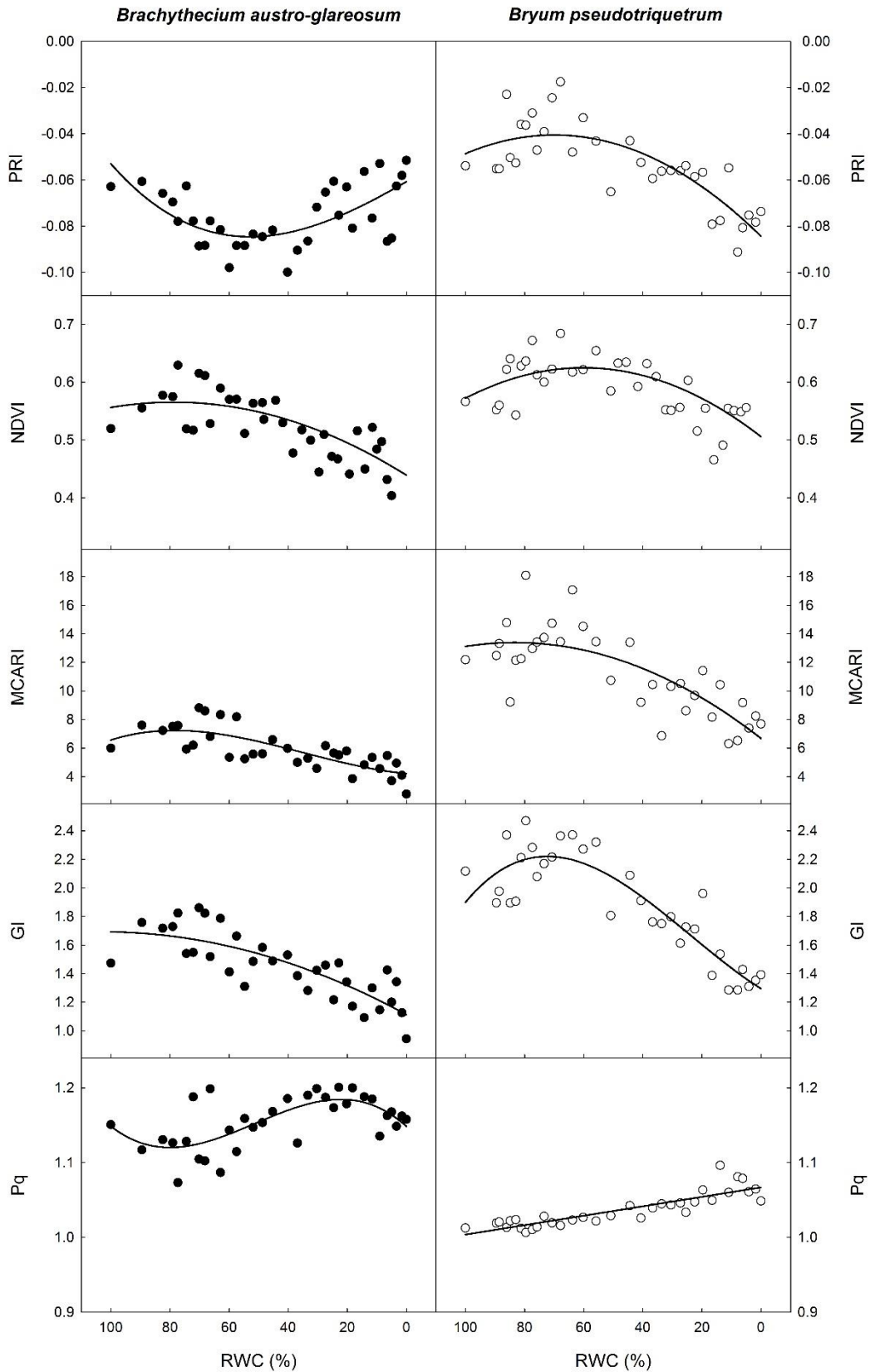


Fig. 7. Spectral reflectance indices in the desiccating thalli of *Brachythecium austro-glareosum* (full symbols) and *Bryum pseudotriquetrum* (open symbols) from a fully wet (RWC = 100%) to dry (RWC = 0 %) state. For all indices, species-specific differences show statistical significance ($P = 0.005$).

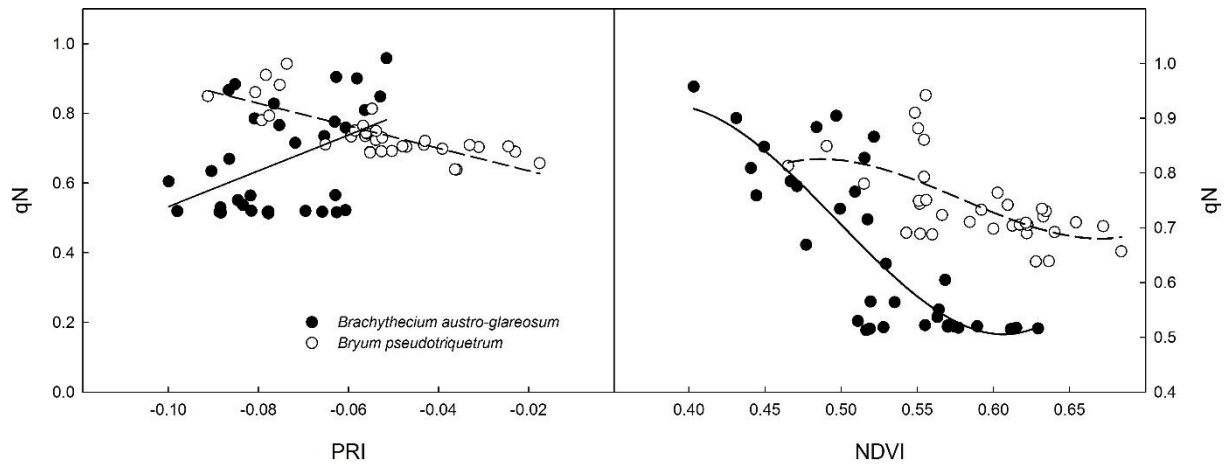


Fig. 8. The relationship of non-photochemical quenching (qN) to spectral reflectance indices (photochemical reflectance index = linear relationship, normalised difference vegetation index = 3rd order polynomial) in the desiccating thalli of *Brachythecium austro-glareosum* (full symbols) and *Bryum pseudotriquetrum* (open symbols).

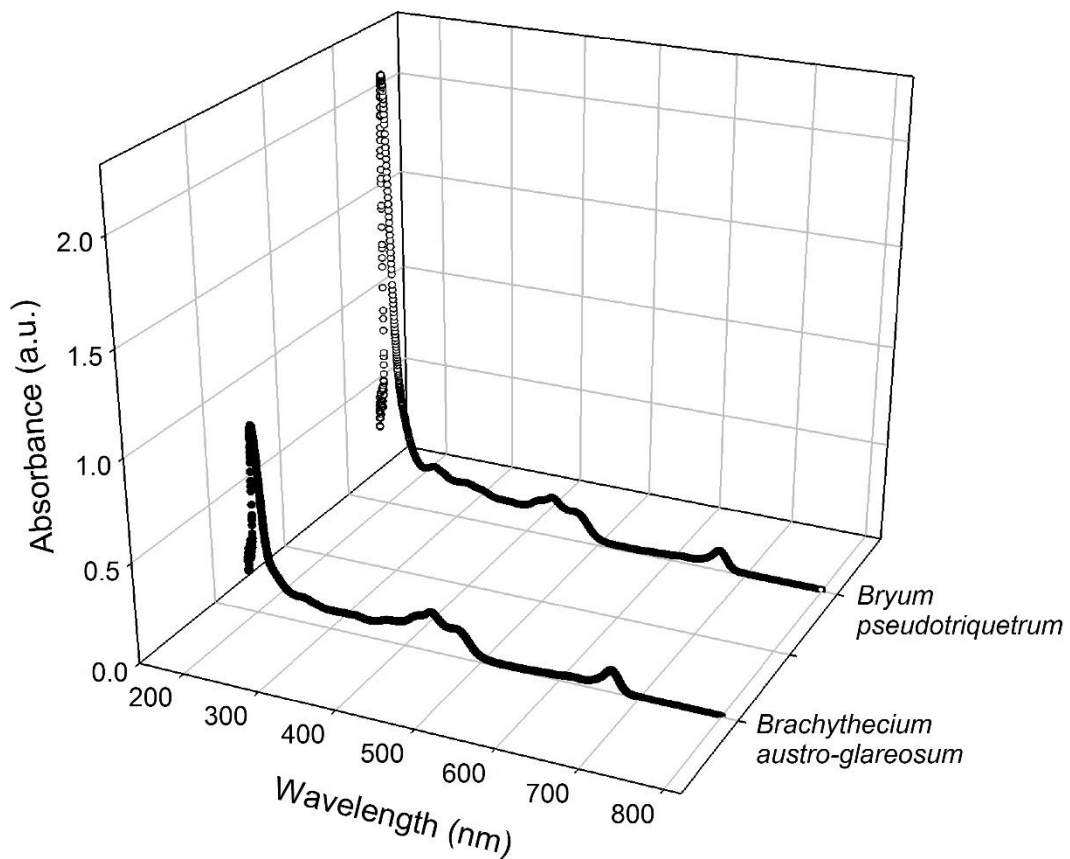


Fig. 9. Spectral absorbance measured at the wavelength range of 190–800 nm. Note the remarkable difference between the moss species in the peak of UV-B absorption (210 nm).

Indices	Equation	Reference
Normalized Difference Vegetation Index (NDVI)	$NDVI = (R_{NIR} - R_{RED}) / (R_{NIR} + R_{RED})$	Rouse et al.1974
Photochemical Reflectance Index (PRI)	$PRI = (R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$	Gamon et al.1992
Modified Chlorophyll Absorption in Reflectance Index (MCARI)	$MCARI = [(R_{700} - R_{670}) - 0.2 * (R_{700} - R_{550})] * (R_{700} / R_{670})$	Daughtry et al. 2000
Greenness Index (GI)	$GI = R_{554} / R_{677}$	Smith et al.1995
Carotenoid index (CARI)	$(R_{720} - R_{521}) / R_{521}$	Zhou et al. 2017
Red-edge chlorophyll index (CI _{red-edge})	$(R_{750} - R_{705}) / R_{705}$	Gitelson et al. 2005
Carotenoid/chlorophyll ratio index (CCRI)	$(CARI / CI_{red-edge})$	Zhou et al. 2019
Phaeophytization index (Pq)	$Pq = R_{435} / R_{415}$	Ronen and Galun 1984

Table 1. Definitions of spectral reflectance indices used in this study with sources of the equations for particular indices.

Content of pigments	<i>Brachythecium austro-glareosum</i>	<i>Bryum pseudotriquetrum</i>
Chl <i>a</i> (mg/g DW)	1.234±0.122	1.322±0.150
Chl <i>b</i> (mg/g DW)	0.610±0.100	0.751±0.074
Car (mg/g DW)	0.408±0.037	0.522±0.058
Chl <i>a</i> + <i>b</i> (mg/g DW)	1.844±0.213	2.073±0.194
Chl <i>a/b</i>	2.054±0.214	1.769±0.202
Car / Chl (<i>a+b</i>)	0.222±0.009	0.252±0.018

Table 2. Contents of constitutive chlorophyll, carotenoids in Antarctic mosses *Bryum pseudotriquetrum* and *Brachythecium austro-glareosum*.

Reflectance indices	<i>Brachythecium austro-glareosum</i>		<i>Bryum pseudotriquetrum</i>	
	Wet	Dry	Wet	Dry
CARI	1.573±0.446	1.111±0.151	1.105±0.070	2.150±0.702
CI _{red-edge}	0.393±0.021	0.372±0.001	0.380±0.001	0.403±0.043
CCRI	3.961±0.968	2.989±0.405	2.908±0.191	5.222±0.106

Table 3. Spectral reflectance indices recorded for the moss species in fully wet (RWC = 100%) and dry state (RWC = 0%).

Publikace 2 (Příloha 3)

Barták M., Hájek J., **Orekhova A.**, Villagra J., Marín C., Palfner G., Casanova-Katny A. (2021) Inhibition of primary photosynthesis in desiccating Antarctic lichens differing in their photobionts, thallus morphology and spectral properties. Special Issue on "Lichen functional traits and Ecosystem Functions". *Microorganisms*, 9: 818. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040818>.



Article

Inhibition of Primary Photosynthesis in Desiccating Antarctic Lichens Differing in Their Photobionts, Thallus Morphology, and Spectral Properties

Miloš Barták¹, Josef Hájek¹, Alla Orekhova¹, Johana Villagra², Catalina Marín³, Götz Palfner³ and Angélica Casanova-Katny^{2,*} 

¹ Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, Building A13/119, 625 00 Brno, Czech Republic; mbartak@sci.muni.cz (M.B.); jhajek@sci.muni.cz (J.H.); a.orekhova@seznam.cz (A.O.)

² Laboratory of Plant Ecophysiology, Faculty of Natural Resources, Campus Luis Rivas del Canto, Catholic University of Temuco, Rudecindo Ortega #03694, 4780000 Temuco, Chile; jovyvillagra@gmail.com

³ Laboratory of Mycology and Mycorrhiza, Faculty of Natural Sciences and Oceanography, Campus Concepción, Concepción University, 4030000 Concepción, Chile; catmarin@udec.cl (C.M.); gpalfner@udec.cl (G.P.)

* Correspondence: mcasanova@uct.cl; Tel.: +56-96-209-7709



Citation: Barták, M.; Hájek, J.; Orekhova, A.; Villagra, J.; Marín, C.; Palfner, G.; Casanova-Katny, A. Inhibition of Primary Photosynthesis in Desiccating Antarctic Lichens Differing in Their Photobionts, Thallus Morphology, and Spectral Properties. *Microorganisms* **2021**, *9*, 818. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040818>

Academic Editors: Paolo Giordani, Juri Nascimbene and Renato Benesperi

Received: 1 February 2021

Accepted: 7 April 2021

Published: 13 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Abstract: Five macrolichens of different thallus morphology from Antarctica (King George Island) were used for this ecophysiological study. The effect of thallus desiccation on primary photosynthetic processes was examined. We investigated the lichens' responses to the relative water content (RWC) in their thalli during the transition from a wet (RWC of 100%) to a dry state (RWC of 0%). The slow Kautsky kinetics of chlorophyll fluorescence (ChlF) that was recorded during controlled dehydration (RWC decreased from 100 to 0%) and supplemented with a quenching analysis revealed a polyphasic species-specific response of variable fluorescence. The changes in ChlF at a steady state (F_s), potential and effective quantum yields of photosystem II (F_v/F_m , Φ_{PSII}), and nonphotochemical quenching (NPQ) reflected a desiccation-induced inhibition of the photosynthetic processes. The dehydration-dependent fall in F_v/F_m and Φ_{PSII} was species-specific, starting at an RWC range of 22–32%. The critical RWC for Φ_{PSII} was below 5%. The changes indicated the involvement of protective mechanisms in the chloroplastic apparatus of lichen photobionts at RWCs of below 20%. In both the wet and dry states, the spectral reflectance curves (SRC) (wavelength 400–800 nm) and indices (NDVI, PRI) of the studied lichen species were measured. Black *Himantornia lugubris* showed no difference in the SRCs between wet and dry state. Other lichens showed a higher reflectance in the dry state compared to the wet state. The lichen morphology and anatomy data, together with the ChlF and spectral reflectance data, are discussed in relation to its potential for ecophysiological studies in Antarctic lichens.

Keywords: maritime antarctica; King George Island; lichen dehydration; chlorophyll fluorescence; stress tolerance



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The lichen biota of the Antarctic continent dominates the polar tundra with more than 350 species distributed throughout the few small ice-free areas [1,2]. Temperature and water are the two principal factors limiting the distribution of living organisms in Antarctica [3]. Both lichens and mosses penetrate further into the discontinuous small ice-free microsites that offer colonizable substrates, reaching almost 86 °S in the case of lichens [4]. Although almost the entire distribution is modeled based on the temperatures that make life feasible, little is known about the role of water in survival on the frozen continent. However, for microenvironments, it has been reported that beyond 72 °S, the most determining factors of diversity are the length of the active period and the available water, which is

closely linked to temperature [5]. Various studies have shown that lichens are resistant to low temperatures and present positive photosynthesis at temperatures close to 0 °C [6]. However, it has also been recorded that the optimum temperature for net photosynthesis for several lichens is between 5–15 °C [7]. Furthermore, it is expected that, as global warming progresses, these organisms will be affected by the increase in temperature [8], which in Antarctica is as high as approximately 3 °C, although this varies throughout the continent. On the other hand, the majority of Antarctic lichens are saxicolous because rocks and stones are the most available substrate on the Antarctic continent; therefore, the water content variations to which they are exposed are greater because the rocks do not retain water. In this context, although their response to temperatures is well known, less is known about the response of Antarctic lichens to a lack of water in the field. Lichens are poikilohydric organisms that obtain water from atmospheric humidity or from rain. In Antarctica, where it rarely rains, water is mostly available in liquid form from the water runoff from snowbanks and glaciers or from snowfall in summer. Therefore, during the study of the in situ response of the crustose lichen *Placopsis antarctica*, it was found that the dominant factor that affected the electron transport rate (ETR) was the speed with which the thallus moistened in comparison to the controls [9]. Hence, from the ecological perspective, it is important to investigate whether Antarctic lichens present differences in their ability to respond to changes in humidity, as well as whether there are differences between species displaying different morphotypes [10,11]. During the Antarctic summer, lichens absorb water from rain, mist, and thawing snow [12]. However, in Continental Antarctica, lichens can also absorb water from snow sublimation [13].

Lichens are desiccation-tolerant organisms that undergo a large number of dehydration/rehydration cycles during their lifetime [5]. When lichens undergo desiccation from a wet to a dry state, they lose their photosynthetic activity and gradually become physiologically and photosynthetically inactive. For severely desiccated thalli, CO₂ exchange is ceased in lichen photobionts until they become hydrated again [7]. Desiccation in lichens correlates with a decline in primary photosynthetic activity, a loss of variable chlorophyll fluorescence (ChlF), and a decrease in their overall fluorescence yield. These changes are accompanied by a decoupling of photosystems I and II in the algal/cyanobacterial photobiont during thallus desiccation. Lichens activate several protective mechanisms during desiccation, which decrease ChlF. The mechanisms quench ChlF and protect the chloroplastic apparatus from over-energization during desiccation. The changes enable photobiont cells and their chloroplasts to keep functioning, even under severe desiccation. The underlying mechanisms have been studied over the last few decades, and several quenching mechanisms have been identified in lichens [14]. Among relevant studies, energy dissipation from desiccating mosses and lichens was described by [15–18]. The mechanism comprises effective quenching centers that appear during desiccation and act as thermal dissipation units.

This study focuses on the effects of lichen desiccation on the shape of slow Kautsky kinetics (KKs) of ChlF measured in dark-adapted samples exposed to continuous light. The KKs show a rise from the O (background ChlF) to the P peak, followed by a polyphasic SMT phase. The OPSMT transient reflects important points on KKs, where O stands for the origin, P for peak, S for a semi-steady-state ChlF level, M for local maximum, and T for a terminal steady-state ChlF level. The OPSMT shapes have been analyzed in detail by Riznichenko et al. (1996) [19], Govindjee (see [20,21]). The authors described the ChlF signal change within the PSMT part of the KKs and attributed it to the photochemical and nonphotochemical processes that take place in a photosynthetic apparatus. Regarding the photochemical processes, the reoxidation of reduced Q_A due to the photosynthetic electron transport chain causes the decrease in the PSMT phase. However, other processes, such as those involved in nonphotochemical quenching, could also be involved (see below). Generally, the SMT phase of the ChlF signal forming the induction curve and the appearance of additional maxima are caused by stimulating the dark reactions of the Calvin-Benson cycle of the CO₂ fixation (see [22]). The SMT part is polyphasic due to several co-acting processes.

Nonphotochemical fluorescence quenching (NPQ) results from these processes as the formation of the transthylakoidal proton gradient [23], phosphorylation of the light-harvesting complex (see [24]), oxidation of the plastoquinone pool, and photoinhibition [25]. The P-S-M transition is denoted to the components of nonphotochemical quenching (qN), i.e., energy-dependent quenching (qE), state transition quenching (qT), and photoinhibitory treatment (qI) [26]. For qE, several underlying mechanisms have been proposed, such as quenching in light-harvesting complexes [27]. For qT, the “spillover” of excitation energy from PSII to PSI has been considered; however, the involvement of excitation spillover during the P-S phase is improbable [28]. For the S-M phase, the involvement of the state transition was reported previously [29]. Although qI’s involvement in the SMT phase is minor, photoinhibition-induced changes and the activation of photoprotective mechanisms must be taken into consideration. Because a proportion of the qN components are species- and treatment-specific, it may be suggested that the entire PSMT chlorophyll fluorescence transient reflects a superimposition of several processes.

Compared to the numerous studies that exploit Ks to analyze stress on PS II functioning, Ks has only been used sporadically in lichens. It was used to characterize their sensitivity to photoinhibition [30] and freezing stress [31]. Nabe et al. (2007) [32] studied the sorbitol effect on the Ks shape in liverwort (*Marchantia polymorpha*) and moss (*Bryum argenteum*). In this study, we focused on the PSMT phase of the Ks shape. We hypothesized that the Ks would be species-specific and sensitive to the desiccation of selected Antarctic lichens. Therefore, we measured the Ks of selected lichen species and analyzed the parameters derived from the O, P, S, M, and T ChlF signals (e.g., the ratios related to peak ChlF [P]), such as P/M, P/T, and others. We hypothesized that they would be related to the relevant water content (RWC) in thalli.

A dehydration-induced decrease in variable chlorophyll fluorescence that results in a decrease in slow ChlF transient has been shown several times for lichens. The decrease in O, P, S, and T ChlF signals is accompanied by the inhibition of primary photosynthetic processes, which is demonstrated by a decrease in potential yield of photochemical processes in photosystem II (F_V/F_M), and effective quantum yield of photosystem II (Φ_{PSII}). Such response has been found in cyano- and chlorolichens (see [33]). However, the decline is species-specific and bi- or triphasic if the supersaturation effect takes place. The latter is true for some cyanolichens and *Nostoc commune* colonies [34]. Therefore, in our study, we expected species-specific responses to the ChlF parameters when evaluating the photosystem II activity of lichen photobiont, such as F_V/F_M , Φ_{PSII} , and steady-state chlorophyll fluorescence (F_s) in gradually desiccating lichen samples. Additionally, we were interested in the RWC at which the first signs of inhibition of the photosynthetic processes in PSII appear and the RWC at which half of the maximum ChlF parameters are found. Emphasis was also given to the critical RWC, i.e., the RWC at which the individual species show a full limitation of the primary photochemical processes of photosynthesis. Furthermore, we expected species-specific involvement of NPQ, which is considered a protective mechanism that is activated during desiccation in lichens [35]. We evaluated species-specific sensitivity of primary photosynthetic processes in several chlorolichens at low desiccation. This study is a follow-up study of a previous one [33], which focused on desiccation-induced limitation of primary photosynthetic processes in lichens monitored by ChlF parameters (Φ_{PSII} and nonphotochemical quenching of absorbed light energy—qN) and changes in spectral reflectance indices during thallus desiccation. In this study, we supplemented the approach by using a more detailed analysis of the shape of slow Kautsky kinetics during desiccation. We hypothesized that Antarctic lichens from King George Island, specifically their primary processes of photosynthesis, will be highly resistant to desiccation.

2. Material and Methods

2.1. Site Description, Lichen Species Collection, and Handling

The lichen material was collected during the Chilean Antarctic Expedition (ECA56) on the Fildes Peninsula (62°12'25" S, 58°58'26" O), King George Island (KGI), South

Shetland Island Archipelago (Figure 1), which is located close to the northern Antarctic Peninsula. For terrestrial vegetation, the greatest diversity, cover and growth rates are contributed by cryptogam species in the northern part of the peninsula up to 72° S, where the factor that best correlates with the exuberance of the polar tundra would be the annual temperature [4]. Therefore, the South Shetland Archipelago in the maritime Antarctic is considered a diversity hotspot. Fildes Peninsula is the second largest ice-free area within the Archipelago, with a mean annual air temperature at sea level of $-2.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ at Bellinghousen Station, and the annual decadal air temperature trend between 1969–2010 being about 0.259 K/decade [36]. The tundra vegetation consists of expanding, well-developed lichen and moss communities. A total of 61 moss species have been documented on King George Island, of which 40 are present on Fildes Peninsula [37], with also about 109 lichen species being distributed along the ice-free areas [38]. The lichen samples were transferred to Professor Julio at Escudero Station from Instituto Antártico Chileno (INACH) in January 2019, and the voucher specimens were stored at the Fungarium of the Universidad de Concepción, CONC-F.

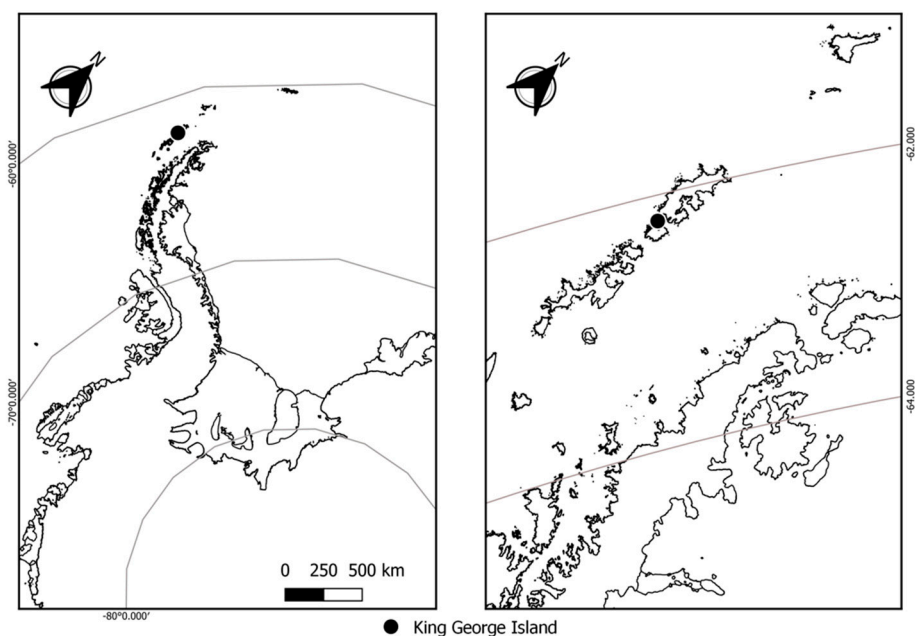


Figure 1. Map of the Antarctic Peninsula showing the northern part of the South Shetlands Archipelago (**left**) and the localization of King George Island (South Shetlands, Antarctica). The point indicates Fildes Peninsula (**right**) according to the data set in <https://doi.org/10.5285/ad7d345a-0650-4f44-b7eb-c48e1999086b> (accessed on 1 February 2021).

2.2. Species Characteristics

For the study, we selected the following five Antarctic lichens (Figures 2 and 3) that differ in their thallus morphology, photobiont, and morphotype: foliose (*Parmelia saxatilis*), crustose (*Placopsis antarctica*), and fruticose species (*Himantormia lugubris*, *Ramalina terebrata*, and *Lecania brialmontii*), as shown in Table 1.

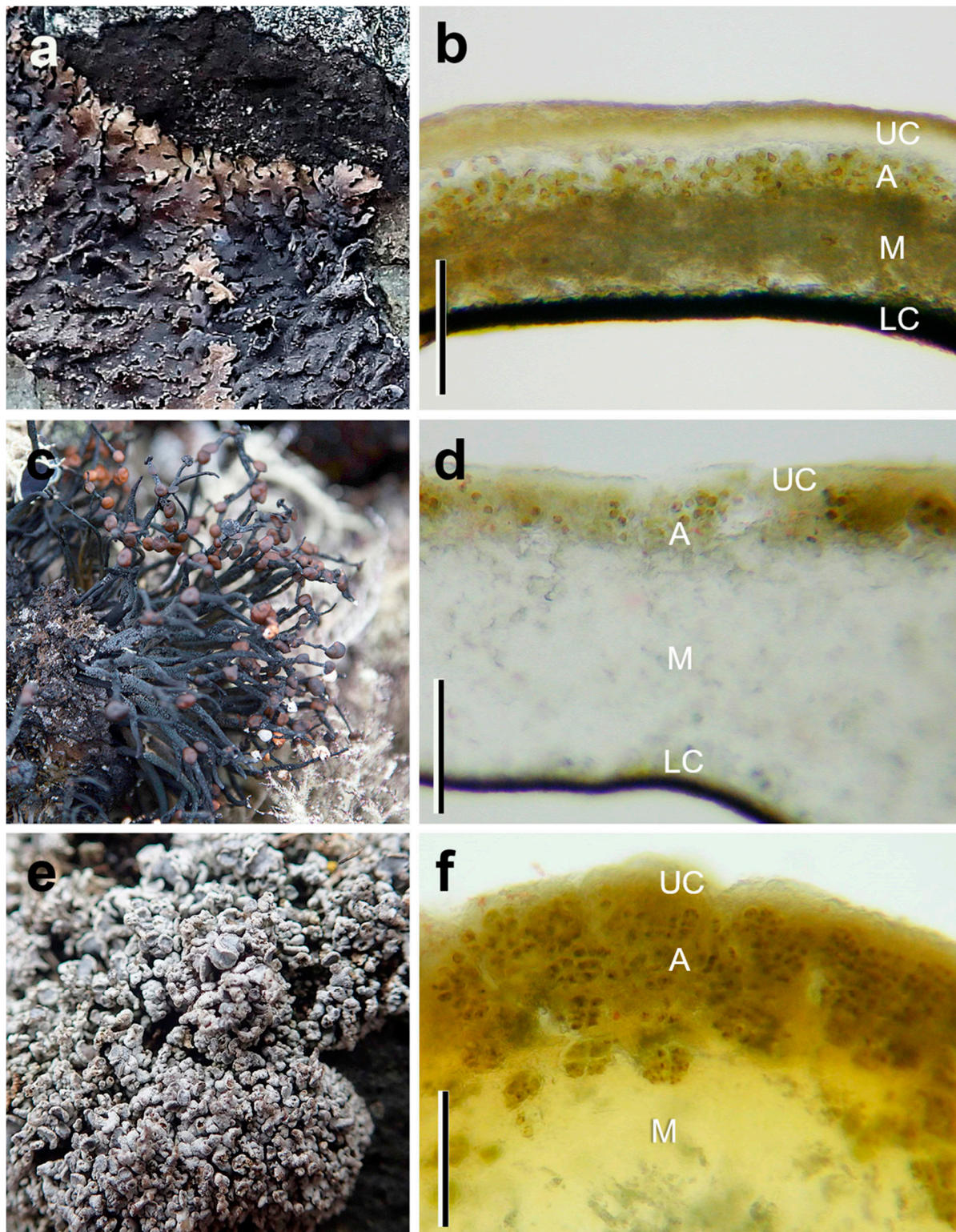


Figure 2. In situ morphology and the anatomical characteristics of Antarctic lichens used in the experiments showing the four thallose layers, upper cortex (UC), green-algae layer (A), medulla (M), and lower cortex (LC). (a,b) the foliose *Parmelia saxatilis*; (c,d) a fruticulose specimen of *Himantormia lugubris*; (e,f): the microfruticulose cushion *Lecania brialmontii* (bar = 100 µm). Photo credit: A. Casanova-Katny.

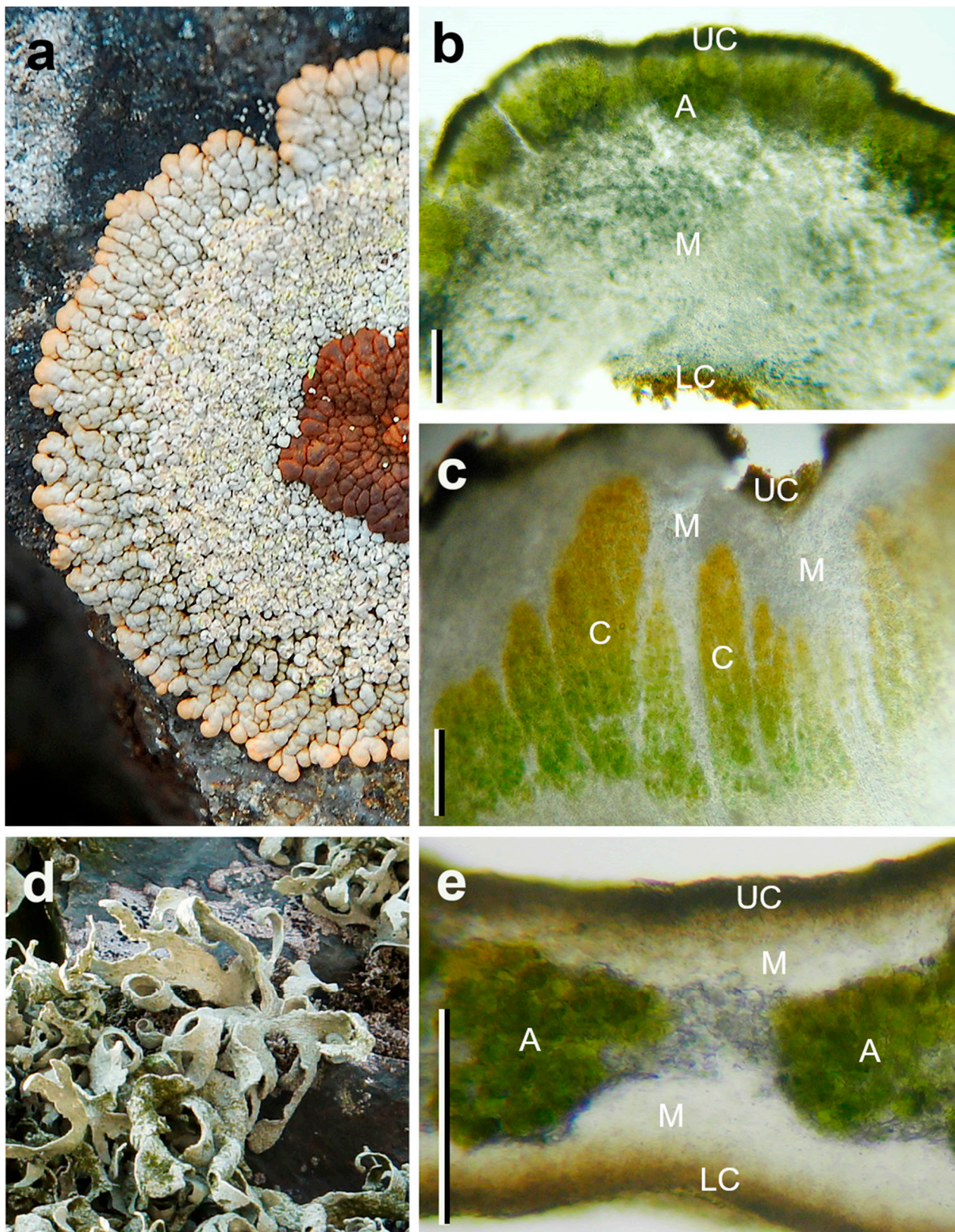


Figure 3. In situ morphology and anatomical characteristics of Antarctic lichens used in the experiments showing the four thalline layers, upper cortex (UC), green-algae layer (A), medulla (M), cephalodium (C), and lower cortex (LC). (a) the crustose *Placopsis antarctica* thallus; (b) green photobiont section, (c) cephalodium section; (d,e) the fruticolose *Ramalina terebrata* (bar = 100 μ m). Photo credit: A. Casanova-Katny and A. Beck (*R. terebrata*).

Table 1. Antarctic lichen species used in the study from Fildes Peninsula, King George Island. The species' details were obtained from field observation and using [1,2,39].

Lichen Family	Lichen Species	Photobiont	Thallus Morphotype	Ecology and Distribution
Parmeliaceae	<i>Parmelia saxatilis</i> (L.) Ach	Trebouxioid	Foliose	Cosmopolitan species with southern limit in Antarctica, on rocks, boulders, stones, and mosses, and on dry to moist rock faces. Apothecia not observed in Antarctica. Endemic in Antarctica. Preferentially saxicolous on acidic rocks and abundant on the southern part of Fildes Peninsula and Ardley Island, where it forms several patches on soil or moss. In nitrophobic communities, growing above 70 m.a.s.l.
	<i>Himantormia lugubris</i> (Hue) I.M. Lamb	Trebouxioid	Fruticose	Endemic in Antarctica. Preferentially saxicolous, grows on rocks and moist and shaded sites, typical for ornithocoprophilous lichen communities.
Ramalinaceae	<i>Lecania brialmontii</i> (Vain.) Zahlbr.	Trebouxioid	Fruticose	Cosmopolitan species with southern limit in Antarctica. Saxicolous, grows on costal cliffs and large boulders, typical for ornithocoprophilous lichen communities. Apothecia not observed in Antarctica.
	<i>Ramalina terebrata</i> Hook. F. & Taylor	Trebouxioid	Fruticose	Endemic in Antarctica. Grows in nitrophobic communities. Cyanobacteria in cephalodia, with species of <i>Nostoc</i> .
Trapeliaceae	<i>Placopsis antarctica</i> , D.J. Galloway, R.I.L. Sm. & Quilhot	<i>Stichococcus antarcticus</i> ; or <i>S. allas</i>	Crustose	

To study the anatomy of the lichen thalli, freehand cross-sections were made using a razor blade; thickness of the upper and lower cortex, medulla, and algae layer were measured in only two species, *Himantormia lugubris* and *Parmelia saxatilis*, due to the restrictions imposed by the quarantine. Lichen samples were put on glass slides before being observed under a Leitz Dialux microscope (Leitz, Wetzlar, Germany) at 100× magnification and documented using a Nikon Coolpix 950 digital camera (Nikon, Tokyo, Japan) attached to the microscope.

2.3. RWC during Dehydration

After collection in the field, the thalli of the lichen species chosen for the experiments were fully hydrated at 15 °C for 24 h in closed Petri dishes until the maximum weight was reached (this was tested by weighing the lichen on a laboratory analytical scale [Brand, Adam Equipment, Oxford, MS, USA]). The fully hydrated thalli were then dried at room temperature (18 °C, 40% RH) in the laboratory at the Escudero Station (Fildes Peninsula). During desiccation, the thalli were regularly (typically in around ten-minute intervals) weighed to evaluate the RWC which was calculated using the following equation: $RWC (\%) = [(Fw - Dw) / (Ww - Dw)] \times 100$, where Fw is the actual fresh weight of a sample, Dw is the weight of the fully dry sample (oven-dried sample at 35 °C for 24 h), and Ww is the weight of the fully hydrated sample. The weighing of the thalli and RWC evaluation lasted until a constant weight of dry thalli was reached.

2.4. Chlorophyll Fluorescence Measurements

The samples were collected and immediately remoistened for 24 h under the natural outside temperature. Before the dehydration measurements, the samples were tested for F_V/F_M after 24 h, 25 h, and 26 h of rehydration. When F_V/F_M reached a maximum and constant value, the sample was considered vigorous and the primary photosynthetic processes fully activated. From the fully wet (RWC = 100%) to dry (RWC = 0–10%) states of the studied species, the ChlF parameters were measured repeatedly, typically in 40-min intervals.

Laboratory measurements using the slow Kautsky kinetics (KKs) method supplemented with saturation pulses in dark- and light-adapted states were used. The chlorophyll fluorescence parameters were recorded using a FluorCam HFC 1000-H (Photon Systems Instruments, Drásov, Czech Republic) and the FluorCam v. 7.0 software. Additionally,

Kautsky kinetics supplemented with a quenching analysis was used. The method starts with a saturation pulse applied in a dark-adapted state (ten minutes) to induce the maximum ChlF (F_M) followed by ten seconds of dark. Then, the samples were exposed to actinic light ($100 \mu\text{mol (photons) m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 300 s, and a polyphasic time course of the ChlF emission was recorded. When a steady-state ChlF was reached (after 300 s), another saturation pulse was applied to induce F_M' levels of ChlF, i.e., the maximum ChlF value in light-adapted material. After switching off the actinic light, background ChlF (F_0') was recorded for 20 s. Standard ChlF parameters (F_V/F_M , Φ_{PSII} , NPQ, F_S) were calculated using FluorCam software. Their dependence on RWC is presented in this study. For a more detailed analysis, the dehydration response curves of the effective quantum yield of the photosynthetic processes in PSII (Φ_{PSII}) and the steady-state chlorophyll fluorescence (F_S) were selected. The critical points were distinguished for the Φ_{PSII} and F_S dehydration response curves, which denoted the RWC at which the ChlF parameter was limited to 0.

The dehydration response curves of Φ_{PSII} , NPQ, and F_S were plotted and analyzed. Species-specific responses in the dehydration-induced decline in photosynthetic parameters were noted, and the RWC at which the functional changes occurred were evaluated.

The records of ChlF transients for particular lichen species and RWC were analyzed. On the slow Kautsky kinetics of ChlF, the levels O, P, S, M, and T were identified, along with the times at which they were reached. This was done using FluorCam software after $100\times$ magnification of the curve (y axis: ChlF as dependent variable), which distinguished the particular ChlF levels, even on seemingly flat curves. Particular species-specific levels (P, S, M, T) were found by the software, as the ChlF signals reached at the times of 2.0 s (for P) 4.8–5.2 s (for S), 16.0–28.6 s (for M), and 300 s (for T) after the continuous light inducing Ks was switched on. The exception was *P. antarctica* (algal part) where S and M ChlF levels were found in 16.2 and 50.0 s. The effects of RWC on the above-specified ChlF levels and ratio parameters (P/S, P/M, S/M, M/T) were then evaluated according to [40].

2.5. Spectral Properties in the Wet and Dry States of Thallus

Reflectance spectra within the range of 380–800 nm were measured using non-imaging spectro-reflectometers, PolyPen RP 400 (UV-VIS, Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic). The measurements were conducted in the wet and dry states of the thallus to evaluate the hydration-dependent changes in spectral reflectance curves and derived from spectral indices (see Table 2). Lichen thalli were placed into a clip in the PolyPen's measuring head, which allowed a constant distance between the detector and the lichen. In the clip, a short darkening period (approx. one minute) was allowed before single measurements of the spectral reflectance were taken. After downloading the files from the spectro-reflectometer, the mean 'wet' and 'dry' spectrums were calculated. The means of particular spectral reflectance indices were evaluated, and the change between the dry and wet states was discussed.

Table 2. List of used spectral reflectance indices with equations and referenced sources.

Spectral Reflectance Indices	Equation	References
Normalized Difference Vegetation Index (NDVI)	$\text{NDVI} = (R_{780} - R_{670}) / (R_{780} + R_{670})$	[41] Rouse et al. (1974)
Photochemical Reflectance Index (PRI)	$\text{PRI} = (R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$	[42] Gamon et al. (1992)

2.6. Statistical Analysis

Unless stated otherwise, the statistical analysis was done by an ANOVA test (RWC effect on ChlF parameters) and Student *t*-test (spectral reflectance curves), with statistically significant differences of $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Anatomy of the Species

A microscopy study revealed species-specific differences in the heteromerous thallus morphology and anatomy of the five different Antarctic lichens. Qualitative differences were found in the four thalline layers, upper cortex, green-algae layer (Trebouxioidei), medulla, and lower cortex. In *P. saxatilis*, the algal layer is very thin and continuous, and the thallus thickness ranges between 152–159 μm (Figure 2a,b). For the fruticulose *Himantormia lugubris*, a very thin algal layer (compared to the thallus thickness) is located beneath the cortex (Figure 2c,d). However, the algal cells do not form an evenly thick layer but small clusters with some substantial spaces (up to 15 μm) between them (not shown). The upper cortex averages 15 μm , and thallus thickness fluctuates between 168–372.0 μm . *Lecania brialmontii* is a microfruticulose lichen that forms a pulvinate cushion. The thallus shows terete ramification below the upper cortex with a continuous algal layer, which can form between 25–30% of the thallus (Figure 2e,f). *Placopsis antarctica* has two types of photobionts—the green algal layer below the upper cortex (Figure 3a,b) and the cephalodia in the center of the thallus with cyanobacteria (Figure 3a,c). For *R. terebrata*, the old thallus parts exhibit an algal layer of varying thickness that is located beneath the cortex (Figure 3d,e). Young tips show an irregular distribution of the algal photobiont within a thallus cross-section. The algae form a series of cell clusters with a patchy distribution.

3.2. Dehydration Response Curves of the Potential and Effective Quantum Yield of PSII

Most species showed no limitations of F_V/F_M (Figure 4) and Φ_{PSII} (Figure 5) in the thalli desiccating from a wet state (RWC: 100%) to a semi-dry state (RWC: approx. 35%). The cephalodium of *P. antarctica* and *L. brialmontii* had a different dehydration response curve with a slight but constant increase in F_V/F_M and Φ_{PSII} when the RWC decreased from 100% to 20% (for F_V/F_M) and 100% to 30% (for Φ_{PSII}), see the inset in Figures 4 and 5. Then, with further desiccation below the RWC of 30%, a significant decline in the F_V/F_M and Φ_{PSII} was found with further thallus desiccation at RWCs below 25%. Species-specific dehydration-dependent fall in F_V/F_M and Φ_{PSII} started at an RWC range of 22–32%. With further desiccation, species-specific differences were more distinguishable. This was particularly true for the $\text{RWC}_{1/2}$ values, in which F_V/F_M and Φ_{PSII} reached their half maximum values. For F_V/F_M , $\text{RWC}_{1/2}$ was found below 15% and declined in the following order: *Ramalina terebrata* (11.80%), *Himantormia lugubris* (9.72%), *Lecania brialmontii* (9.70%), *Parmelia saxatilis* (8.90%), algal part of *Placopsis antarctica* (8.62%), and cephalodium of *P. antarctica* (2.01%). For Φ_{PSII} , although the species order of $\text{RWC}_{1/2}$ differed, it generally had higher $\text{RWC}_{1/2}$ values than F_V/F_M , as follows: algal part of *P. antarctica* (19.4%), *P. saxatilis* (16.7%), *R. terebrata* and cephalodium of *P. antarctica* (11.80%), *L. brialmontii* (11.4%), and *H. lugubris* (10.2%). Generally, low values were found for the critical RWC (RWC_{crit}), at which F_V/F_M and Φ_{PSII} reached zero. In all species, the RWC_{crit} was below 5%. For F_V/F_M , the values reached 0.85% (*P. saxatilis*), 0.25% (*H. lugubris*), 1.20% (*L. brialmontii*), 0.95% (*P. antarctica*—algal part), 0.20% (*P. antarctica*—cephalodium), 1.05% (*R. terebrata*). For Φ_{PSII} , the RWC_{crit} values reached 8.2% (*P. saxatilis*), 3.3% (*H. lugubris*), 4.4% (*L. brialmontii*), 5.0% (*P. antarctica*—algal part), 4.3% (*P. antarctica*—cephalodium), and 2.9% (*R. terebrata*). For the dehydration response curve of *P. antarctica*, a significantly higher Φ_{PSII} was found for the algal part of the thallus than for the cephalodia with the RWC declining from 100 to 15%. In final phase of desiccation (RWC below 10%), however, Φ_{PSII} values are almost identical in algal and cyanobacterial parts of the thallus, contrasting with F_V/F_M , where higher values are found for cephalodia than for the algal part. With the exception of cephalodium of *P. antarctica* (F_V/F_M) and *H. lugubris* (Φ_{PSII}), the values of F_V/F_M and Φ_{PSII} were highly related to steady state ChlF (Fs), see Table 3.

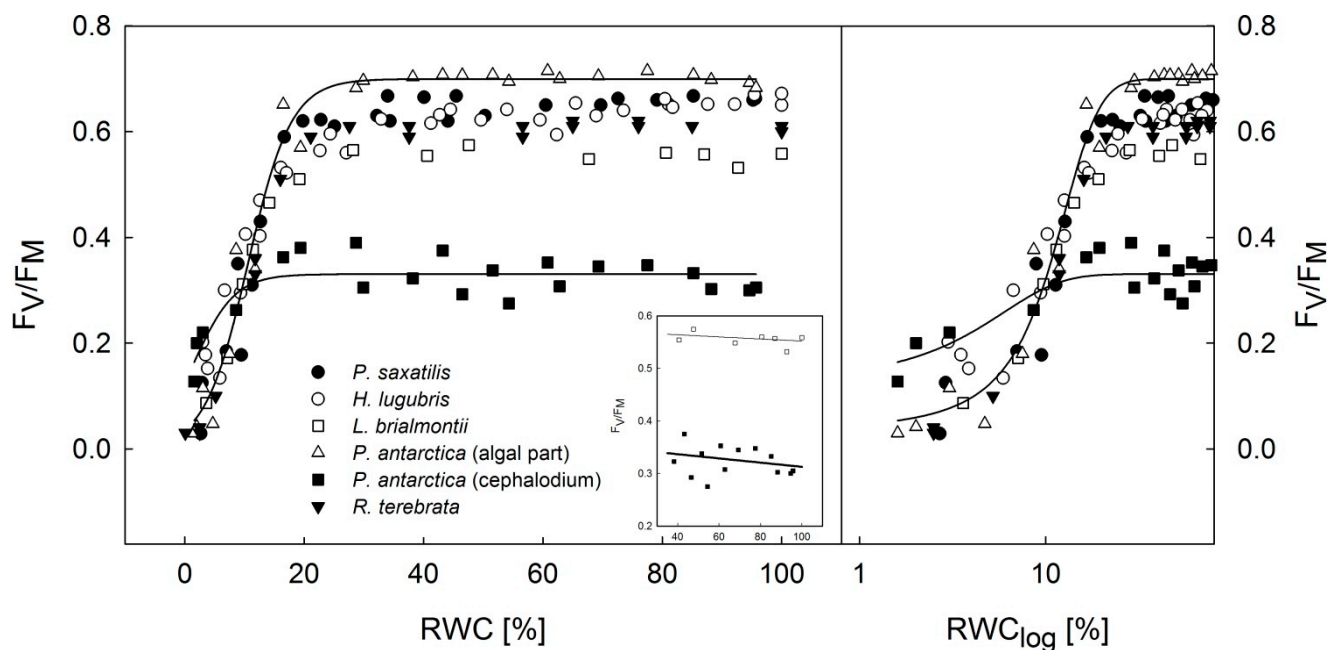


Figure 4. Desiccation response curve of F_V/F_M in experimental lichen species desiccating from a wet (RWC = 100%) to a dry state (RWC = 0%) expressed in the decadic (**left**) and logarithmic RWC (**right**) scales. The fits with distinguishable S-curves at a RWC of below 20% are presented for the algal and cyanobacterial (cephalodium) parts of *Placopsis antarctica*. The inset shows a linear fit through the *H. lugubris* and *P. antarctica* (cephalodium) data points within the RWC range of 30–100%.

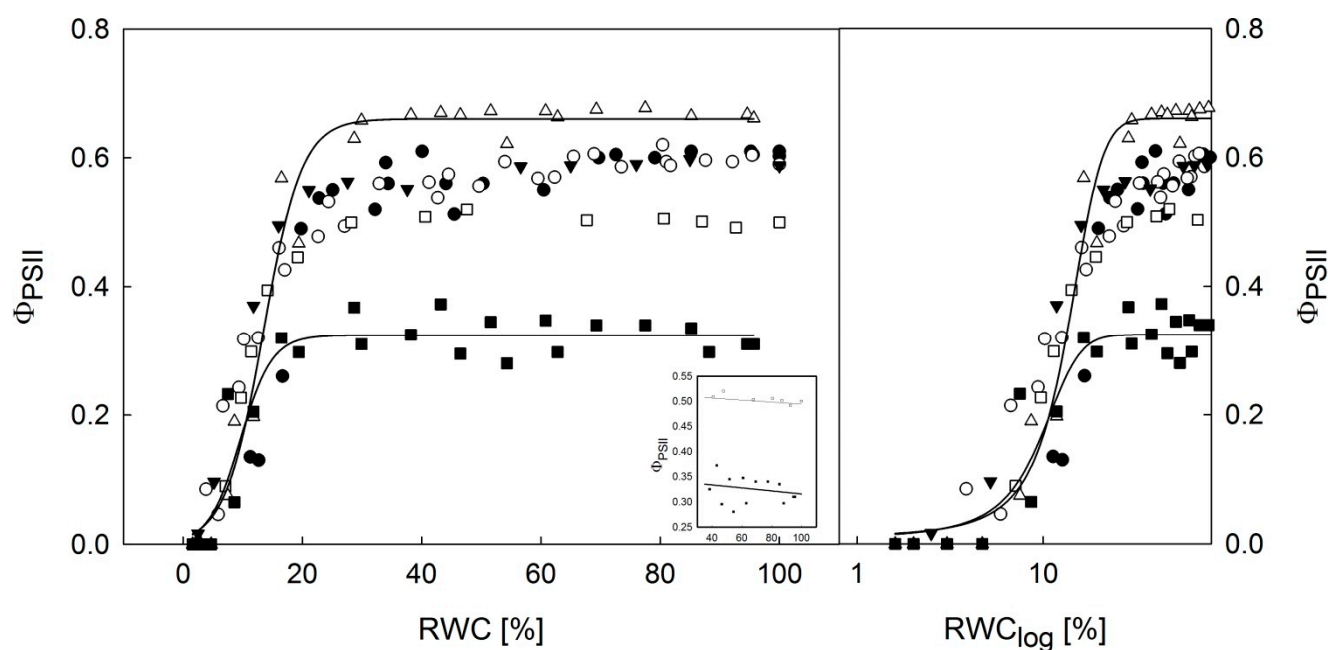


Figure 5. Desiccation response curve of effective quantum yield (Φ_{PSII}) in experimental lichen species desiccating from a wet (RWC = 100%) to a dry state (RWC = 0%) expressed in decadic (**left**) and logarithmic RWC (**right**) scales. The fits with distinguishable S-curves at a RWC of below 20% are presented for the algal and cyanobacterial (cephalodium) parts of *Placopsis antarctica*. The inset shows a linear fit through the *H. lugubris* and *P. antarctica* (cephalodium) datapoints within the RWC range of 30–100%.

Steady-state chlorophyll fluorescence (F_s) declined in a polyphasic manner with ongoing thalli dehydration in all species (Figure 6). It showed a slight decline in the RWC range, as it decreased from 100% to 30%. Then, like F_V/F_M and Φ_{PSII} , F_s started to decline more significantly at a RWC of about 30%. Except for *H. lugubris* and cephalodium of

P. antarctica, Φ_{PSII} correlated with F_s (R^2 over 0.97), which indicates a high potential for the F_s signal to monitor vigor and photosynthetic activity in *P. saxatilis*, *L. brialmontii*, *R. terebrata*, and *P. antarctica* (algal part).

Table 3. Regression coefficient (R^2) for the nonlinear relationships between F_s (steady-state chlorophyll fluorescence and potential (F_V/F_M) and effective quantum yields of PSII (Φ_{PSII}) for lichen species. The regression model was a fourth order polynomial.

Lichen Species	R^2 for F_s Versus	
	F_V/F_M	Φ_{PSII}
<i>Parmelia saxatilis</i>	0.9777	0.9804
<i>Himantormia lugubris</i>	0.5265	0.3106
<i>Lecania brialmontii</i>	0.9768	0.9752
<i>Placopsis antarctica</i> —algal part	0.9966	0.9954
<i>Placopsis antarctica</i> —cephalodium	0.4766	0.8825
<i>Ramalina terebrata</i>	0.9098	0.9211

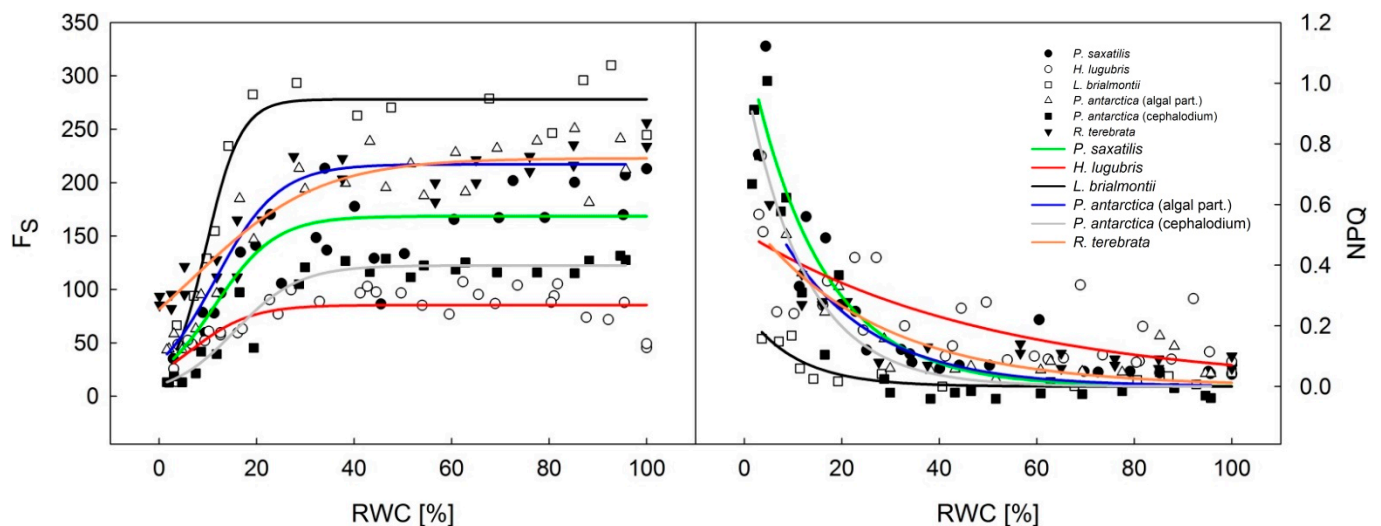


Figure 6. Desiccation response curve of steady-state chlorophyll fluorescence (F_s —(left) panel) and nonphotochemical quenching (NPQ—(right) panel) in Antarctic lichens desiccating from a wet (RWC = 100%) to a dry state (RWC = 0%).

NPQ increased with desiccation, more apparently at the RWCs below 20%. The dehydration curves were of similar shape with the exception of *L. brialmontii* and *H. lugubris*. The two species showed smaller NPQ increase in the RWC declining from 20 to 0% RWC than the other ones.

3.3. Slow Kautsky Kinetics Recorded for the Lichens at Different RWCs during Desiccation from Fully a Wet to a Dry State

The chlorophyll fluorescence signal decreased with thallus desiccation in all species except for *H. lugubris*, in which the ChlF signal showed an increase in RWC, followed by a decrease from 100% to 60%. In *L. brialmontii*, the KKs was almost identical in the RWC range during desiccation from 100% to 20%. However, in all species, a significant ChlF decrease in the KKs was apparent at RWCs below 20%. The desiccation-induced decrease was demonstrated by a “flattening” of the slow KKs and a decrease in the P, S, M, and T ChlF values (Figure 7). Similarly, a decrease was found for the ChlF values that were reached after the application of saturation pulses (F_M data not shown in Figure 7). These changes were attributed to the generally increased nonphotochemical quenching and the changes in the optical properties of lichen thalli during desiccation (for more details see Discussion). Additionally, some species-specific changes were observed in the KKs shape,

specifically for the ChlF fluorescence signals reached at particular O, P, S, M, and T levels (Figure 7, see the upper left and lower left panels): (1) $F_P < F_M$ with the S point becoming less distinguishable with pronounced desiccation (in this case, F_M does not denote to maximum ChlF reached after saturation pulse applied to a dark adapted sample but ChlF level reached at M in Figure 7), (2) time at which the M point was reached (e.g., 36 s in *R. terebrata*, 66 s in *P. saxatilis*). Therefore, desiccation induced some minor changes in the index parameters (P/S, P/M, S/M, M/T). These were small but apparent in all species except for *L. brialmontii* (see Table 4), which showed the KK's "plateau type," which is typical for most cyanobacteria [43]. The other species showed the typical OPSMT shape for chlorolichens.

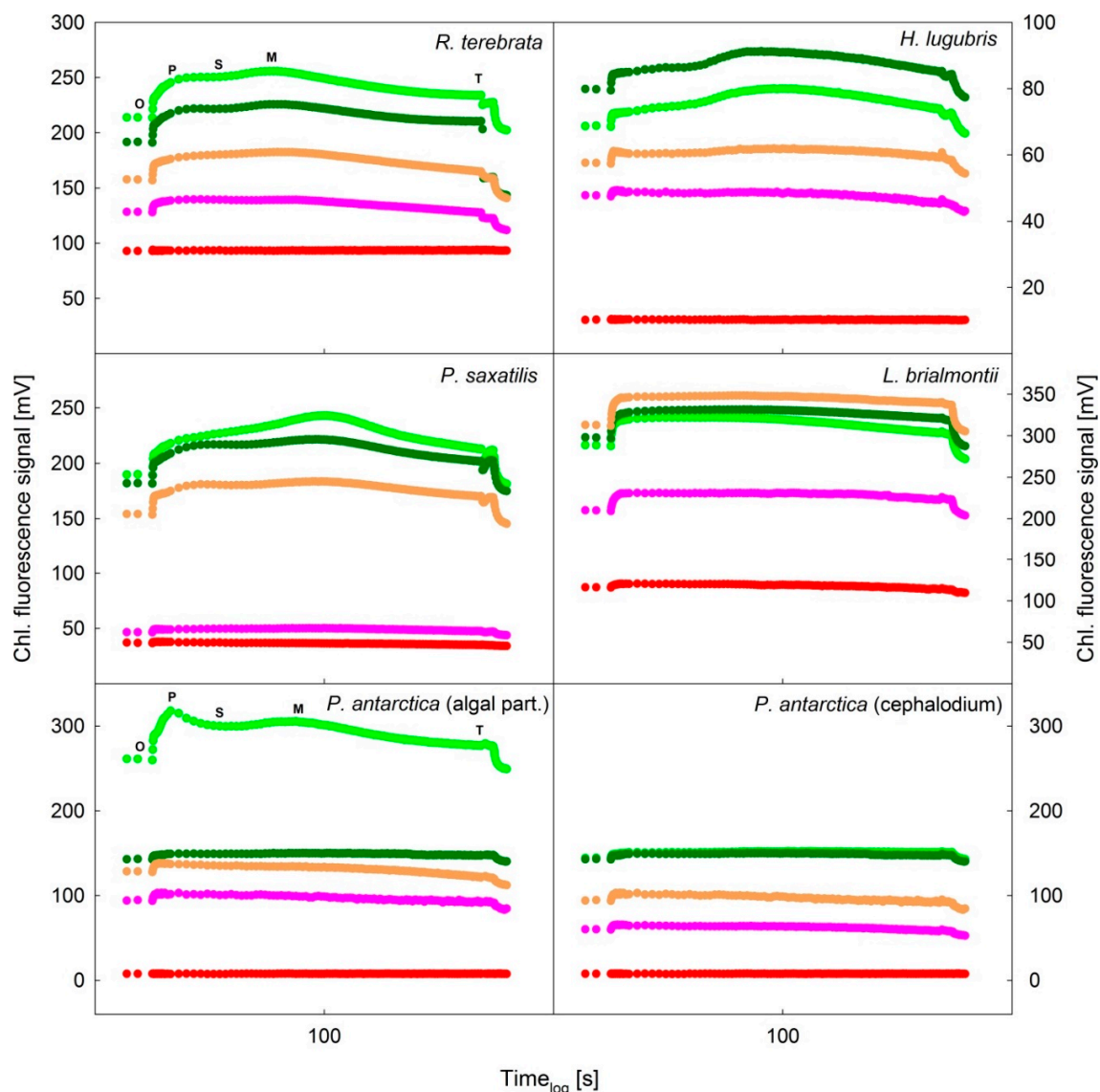


Figure 7. Slow Kautsky kinetics recorded for desiccating lichens at five different RWCs, which varied according to the lichen species. *Ramalina terebrata* (RWC = 100%, 65%, 16%, 5%, 0.1%), *Himantormia lugubris* (RWC = 100%, 65%, 16%, 6%, 3%), *Parmelia saxatilis* (RWC = 100%, 72%, 22%, 9%, 3%), *Lecania brialmontii* (RWC = 100%, 67%, 19%, 9%, 4%), *Placopsis antarctica* (RWC = 100%, 62%, 19%, 5%, 1%), and *P. antarctica* cephalodium (RWC = 100%, 62%, 19%, 5%, 1%). The RWC values are provided in the following different colors: 100% = soft green; 62–72% = deep green; 16–22% = orange; 5–9% = violet; 0.1–4% = red. The time axis (x) is given in a log scale. The O, P, S, M, and T points are indicated for *R. terebrata* and *Placopsis antarctica* (algal part of the thallus). The chlorophyll fluorescence signal is shown with different scales according to the species-specific values.

Table 4. Parameters derived from the O, P, S, M, T curves (means of five replicates per species and particular RWC). The values were distinguished on the slow Kautsky kinetics recorded for the experimental lichen species during their desiccation from a wet (RWC = 100%) to a dry state (RWC below 5%).

Lichen Species	RWC (%)	Parameters					
		P/S	P/M	S/M	M/T	O/P	O/T
<i>Lecania brialmontii</i>	100	0.990	0.991	1.000	1.058	0.905	0.949
	67	0.987	0.984	0.997	1.032	0.910	0.925
	19	0.996	1.006	1.010	1.011	0.902	0.918
	9	1.000	0.998	0.998	1.037	0.907	0.939
	4	1.004	1.003	0.999	1.051	0.962	1.014
<i>Himantormia lugubris</i>	100	0.973	0.911	0.936	1.081	0.942	0.927
	65	0.984	0.930	0.945	1.071	0.937	0.933
	16	1.009	0.982	0.974	1.045	0.942	0.968
	6	1.015	1.006	0.992	1.078	0.966	1.047
	3	1.004	1.007	1.003	1.002	0.995	1.004
<i>P. antarctica</i> algal part	100	1.060	1.042	0.983	1.101	0.822	0.943
	62	1.000	0.993	0.993	1.018	0.957	0.968
	19	1.015	1.022	1.007	1.105	0.931	1.051
	5	1.017	1.012	0.995	1.110	0.910	1.022
	1	1.003	0.999	0.996	1.024	0.987	1.009
<i>P. antarctica</i> cephalodium	100	1.008	0.991	0.983	1.005	0.950	0.947
	62	1.001	0.995	0.995	1.017	0.958	0.969
	19	1.009	1.004	0.996	1.085	0.938	1.022
	5	1.016	1.031	1.015	1.087	0.915	1.025
	1	1.027	1.010	0.984	1.001	0.932	0.943
<i>Ramalina terebrata</i>	100	0.973	0.953	0.979	1.092	0.855	0.890
	65	0.982	0.963	0.981	1.074	0.879	0.909
	16	0.970	0.956	0.986	1.097	0.899	0.944
	5	0.987	0.989	1.002	1.090	0.930	1.002
	0.5	0.999	0.998	0.999	1.000	0.995	0.993
<i>Parmelia saxatilis</i>	100	0.963	0.898	0.932	1.136	0.871	0.888
	72	0.963	0.943	0.979	1.096	0.870	0.899
	22	0.970	0.953	0.983	1.075	0.878	0.900
	9	1.007	0.981	0.974	1.058	0.941	0.976
	3	1.010	1.043	1.033	1.029	0.972	1.043

3.4. Analysis of Reflectance Spectra in Dry and Wet States

The spectral reflectance curves, PRI, and NDVI showed species-specific sensitivity to dehydration (see Table 5, Figure 8). *H. lugubris* did not show any change between the spectrum recorded in dry and wet states, while the *Lecania brialmontii* spectra showed a lowering of reflectance from a dry to a wet state throughout the whole wavelength interval. The reflectance spectrum of dry *L. brialmontii* increased almost linearly between 300 nm to 680 nm. However, a local peak was apparent at 640 nm, followed by a red-edge increase starting at 680 nm. In both the wet and dry states, the red-edge increase was biphasic with a faster increase in the wavelength range of 680–720 nm, followed by a slower increase within the range of 720–780 nm.

NDVI and PRI differed for dry and fully hydrated thalli of the experimental lichen species. However, the response was species-specific. NDVI decreased in the hydrated state for *H. lugubris* and *P. saxatilis* but increased in *L. brialmontii*, *R. terebrata* and *P. antarctica*. However, in wet states, the values of PRI either increased (*H. lugubris*), decreased (*P. saxatilis*, *P. antarctica*), or showed no change (*L. brialmontii*, *R. terebrata*).

Table 5. Means of spectral indices (NDVI, PRI) recorded for dry and wet thalli of the five Antarctic lichen species (means of five replicates per species in wet and dry state). Different upper index letters indicate statistically significant differences at $p \leq 0.05$.

Spectral Index	State of the Thallus	Lichens Species					
		<i>Himantormia lugubris</i>	<i>Lecania brialmontii</i>	<i>Ramalina terebrata</i>	<i>Parmelia saxatilis</i>	<i>Placopsis antarctica</i> (green algae)	<i>Placopsis antarctica</i> cephalodium
NDVI	Dry	0.329 ^a	0.213 ^a	0.212	0.152 ^a	0.033 ^a	0.190 ^a
	Wet	0.23 ^b	0.39 ^b	0.300 ^b	0.060 ^b	0.143 ^b	0.211 ^a
PRI	Dry	−0.059 ^a	−0.038 ^a	−0.058 ^a	−0.061 ^a	0.003 ^a	−0.056 ^a
	Wet	−0.029 ^b	−0.039 ^a	−0.054 ^a	−0.075 ^a	−0.082 ^b	−0.077 ^b

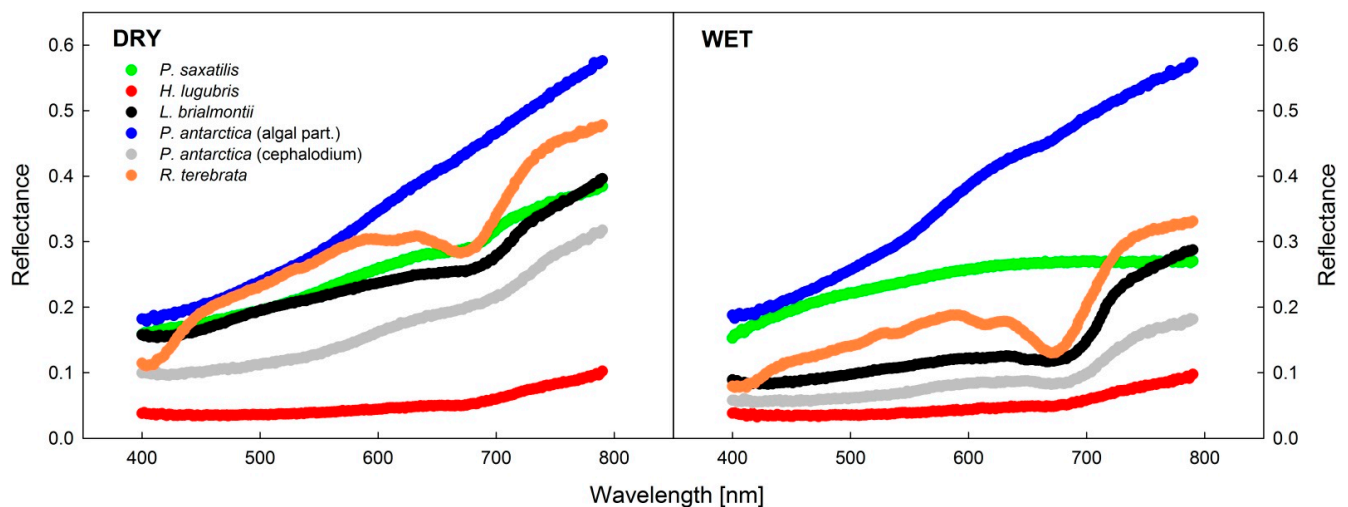


Figure 8. Spectral reflectance curves recorded for experimental lichen species in dry (RWC = 0%) and wet (RWC = 100%) states of the thallus.

4. Discussion

4.1. Chlorophyll Fluorescence Parameters during Desiccation

The results show that Antarctic lichens have a high desiccation tolerance because all species showed a decline in F_V/F_M and Φ_{PSII} at RWCs below 20% to 30%, as has been reported previously for *Cladonia borealis* [44]. Recent studies support the idea that liquid water availability is the main limiting factor for lichen photosynthesis (see [45]). For all experimental species, the values of F_V/F_M and Φ_{PSII} were fairly constant in the thalli, desiccating from 100% to 30% RWC (Figures 4 and 5). Except for *L. brialmontii* and *Nostoc*-containing cephalodium of *P. antarctica* (see the insets in Figures 4 and 5), the F_V/F_M and Φ_{PSII} values showed either no change or a decrease when the RWC declined from 100% to 30%. The slight increase of F_V/F_M and Φ_{PSII} in *L. brialmontii* and cephalodium of *P. antarctica* that was found with desiccation from 100% to 30% of RWC can be attributed to the limited CO_2 diffusion into the thallus in the wet state. This phenomenon is caused by exopolysaccharidic envelopes of cyanobacteria cells, which in the wet state represent a physical barrier for CO_2 transfer. Therefore, photosynthetic processes are limited in fully hydrated thalli and increase with partial dehydration, as shown by *Nostoc commune* colonies [34].

Considering the microsite conditions at King George Island and thallus morphology, the crustose *Placopsis antarctica*, which grows on stones on the ground in a humid environment, passes faster desiccation during the summer season (shown by [9]) than *Lecania brialmontii*, which grows on coastal rocks with water runoff and high humidity. *L. brialmontii* is a microfruticulose lichen with a pulvinate cushion form where water can be retained for a long time. This has been found in similar morphological arrangements in Antarctic cushion mosses [46], where individual specimens lose water faster than the

cushion form. A minor decrease in F_V/F_M and Φ_{PSII} was found in *R. terebrata*, which grows on higher rocks that are exposed to the wind. On the other hand, *H. lugubris* is the species that showed the highest tolerance to drought, as indicated by higher values of Φ_{PSII} data points at RWCs below 10% than for the rest of species (Figure 5) and generally low NPQ values at the same RWC interval (Figure 6). The species grows on stones in drier areas to form extensive communities with other fruticose lichens [47]. The behavior of *H. lugubris* is interesting because the Kks analysis showed that the ChlF signal is most effective at a lower RWC (see below). The maximum value of Φ_{PSII} found for *H. lugubris* was comparable to the value reported by [47] for grey thallus branches.

A significant S-curve decrease of F_V/F_M and Φ_{PSII} at RWCs of below 20–30% was found for the five experimental species (Figures 4 and 5) and has been well documented for a variety of lichens [48,49]. Similarly, an earlier study [50] reported a rapid decline in F_V/F_M in lichens when the RWC decreased below 20%. These changes indicate a severe limitation of PS II in lichen thalli in the final stage of desiccation. F_V/F_M reached 10% of their maximum value at the RWC values below 10%. Such values are comparable to the data reported previously [51] for three lichen species from Norway. This suggests that lichens are capable of performing primary photochemical processes of photosynthesis at low thallus hydration.

During the desiccation of the lichen thallus, excess ROS formation occurs in PS II and other chloroplastic/cellular compartments of a photobiont. Desiccation-induced ROS formation in PS II results in high PS II pressure and, consequently, in photooxidative injury of pigment-protein complexes of PSII. These changes lead to a reduction of photosynthetic efficiency (F_V/F_M and Φ_{PSII} decline, see Figures 4 and 5). High levels of ROS are harmful not only to PS II but also to essential biomolecules, including nucleic acids, proteins, and lipids [52]. Moreover, the lack of water molecules in desiccating lichens combined with sunlight may overexcite the RCs of PS II, regardless of low lighting [53]. These changes are accompanied by an NPQ increase in RWCs below 20% (see Figure 6), which comprises several protective mechanisms that enhance desiccation tolerance. The reason behind the lower NPQ in *L. brialmontii* at the RWC below 20% than in other species is unknown. Such low activation of NPQ, however, suggests yet unidentified photosynthetic peculiarities of the *L. brialmontii* photobiont. NPQ has at least the following three components: (1) pH-dependent energy dissipation in the antenna system of PSII (qE); (2) a state transition between PSII and PSI (qT); and (3) a photo inhibitory quenching (qI) (see [54]). Our ChlF measurements could not determine which of the three components played a major role in the response of the experimental species to thallus dehydration. However, similarly to [44]—Cho et al. (2020), we suggest that qE could contribute to a rapid reduction in PS II excitation pressure. It is known that qE quenching involves converting violaxanthin to zeaxanthin, which is generally associated with desiccation tolerance in lichen [55,56]. Other processes protecting the photosynthetic apparatus during desiccation are the increase in antioxidant content (see [57]), conformational changes of pigment–protein complexes, and thermal dissipation of absorbed light energy [17], dehydration-induced PSII deactivation (see [35]), xanthophyll cycle-independent mechanisms [14], and efficient spillover, i.e., energy transfer from PSII to PSI and consequent quenching due to the formation of a long-lived P700+ state [58]. The PSII to PSI energy transfer is attributed to chlorophyll molecules aggregation in the LHCs of PSII or a new type of quenching in the PSII core antenna [59]. Generally, the protective nonphotochemical dissipation of absorbed light energy happens fast in lichens and other desiccation-tolerant organisms [18,60].

Because nonphotochemical quenching increases with desiccation, the overall ChlF signal decreases. This has been demonstrated for the decline rate of F_0 and F_s during desiccation at RWCs of 30–40% (see Figures 6 and 7). The desiccation-induced decrease in F_0 in lichen is attributed to changes in the optical properties of the upper cortex [61] and increased nonradiative dissipation of absorbed excitation energy from light-harvesting complexes [59,62].

4.2. Kautsky Curve Changes during Desiccation

Our data on the OPSM shape of KKs is in agreement with a previous study [63], which reviewed the main differences between “algal” and “cyanobacterial” curves. Except for *L. brialmontii* and cephalodia of *P. antarctica* (flat KK), the lichen species exhibited distinguished O, P, S, M, and T points in the wet state (RWC = 100 %), with the ChlF level at P point lower than that at M point on the KK. For higher plants and algae, however, higher ChlF levels reached in the P-S than the M-T part of KKs are reported [20,63] similarly to findings for the *P. antarctica* algal part (fully hydrated, Figure 7). In chlorolichens, such KKs having higher ChlF levels in the P-S than the M-T part of KKs have been observed (e.g., [30]—Conti et al. 2014—*Usnea antarctica*). For some other Antarctic lichens, however, lower P-S than M-T ChlF levels are reported [40,64]. The latter study reports also the light effects on the ChlF levels at P and M points, and, consequently ChlF P/M ratio (see Table 4).

When lower values of ChlF are reached in the P-S than in the M-T part of KKs in cyanobacteria, this is attributed to State 2→State 1 transition taking place during the S to M rise (see e.g., [65,66]). For unicellular green algae, it is attributed to the migration of LHClI from PS I to PS II after LHC dephosphorylation (e.g., [67] for *Chlamydomonas reinhardtii*). In chlorolichens and their symbiotic alga *Trebouxia* sp., however, the mechanism has not been experimentally proven.

In *R. terebrata*, *H. lugubris*, *P. saxatilis*, and *P. antarctica* (algal part), the M peak (see Figure 7) tended to decrease with decreasing RWC, which can be attributed to the involvement of state transitions [63]. As shown in an earlier study [68], the M peak tends to decrease with higher light intensity. The study reported a decrease corresponding to the light increase from 40 to 160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in *Umbilicaria antarctica*. The same study reported a higher ChlF at P than at M point for *Dermatocarpon polyphyllizum* (c.f. *P. antarctica* in Figure 7). Moreover, the P/M ratio of ChlF is temperature-dependent because the KKs shape differs at different temperatures when measured in an optimally hydrated state. The time at which the M point occurs is also temperature-dependent; however, the M point is typically found 60–140 s after the actinic light starts to induce the KKs. In our experiment, the M point was found at varying intervals, ranging from 30 s to 60 s. Except for *L. brialmontii*, the experimental species exhibited similar responses (trends) in O, P, S, M, T, and ratios (Table 4) with thallus desiccation. In general, numeric values of the ratios P/S, P/M, S/M and M/T increased with desiccation, which is consistent with [60] reporting an increase in the parameters with severity of temperature stress and flattening of the KKs curve. Therefore, the differences between ChlF values at the P, S, M, T decreases, and numeric value of the above-specified ratios increases. In some species, however, the parameters did not show any change with desiccation, which can be explained by generally small differences between P, S, M, and T ChlF levels in “flat” KKs recorded during desiccation (e.g., *R. terebrata*, *P. antarctica*—algal part). This contrasts with an earlier study [40] reporting a wide range of numeric values of P/S and P/M in wet Antarctic lichen exposed to a decreasing thallus temperature. In *L. brialmontii*, where the ratios (Table 4) were close to 1, the phenomenon can be explained by flat KKs with small differences between the P, S, M, and T points, which were hardly distinguishable. A flat KKs is more typical for cyanolichens [9] than chlorolichens. However, chlorococcoid photobiont has been reported for *Lecania* species [69]. Therefore, we recommend that follow-up studies should conduct a detailed analysis of the KKs shape and quenching mechanisms.

The KKs provide more details about the species-specific responses because the fruticose *Himantormia lugubris* in maritime Antarctica grows in a different microenvironment than the crustose *Placopsis antarctica*. While both species grow on rocks and stones, *P. antarctica* presents a higher ChlF signal than *H. lugubris* at 100% RWC (Figure 7), which suggests that *P. antarctica* is photosynthetically more active at water saturation than the latter. In this context, it is important to mention that *H. lugubris* is a species that is rather tolerant to drought and does not tolerate water saturation like other Antarctic lichens which show carbon assimilation decrease with water saturation [13]. On the other side, *P. antarctica* is a pioneer species on glacier retreat areas, which are prone to high humidity.

Another species that is not as active at high RWC is *L. brialmontii*, as its fluorescence signal in the KKS study shows that ChlF changes insignificantly from 19–100%, with its activity being slightly lower at 100% (Figure 7).

4.3. Lichen Spectral Properties

Species-specific spectral curves could be correlated with the color of thalli. No change in the spectral reflectance spectrum in wet and dry thalli of *H. lugubris* can be attributed to the generally black thallus that reflects similarly in wet as well as dry conditions. A similar pattern was found for the blackish cyanolichen *Leptogium puberulum* (reflectance below 0.1) [33,70].

For *L. brialmontii*, the wet-state spectral reflectance curve had lower reflectance values than the dry one. However, for both, a biphasic increase in the red-edge region was found as follows: there was a higher rate within the ranges of 680 nm to 710 nm and 710 nm to 800 nm, respectively. The presence of a red-edge increase in spectral reflectance is a characteristic of chlorolichens that has been reported and documented for many species that exhibit a large variety of thallus colors (see [71,72]). In general, hydrated chlorolichen samples, except for the black *H. lugubris*, showed lower reflectance values than in the dry state. This is mainly true for the spectral range of 400–670 nm, where the difference between the wet and dry spectra is most remarkable (Figure 8), as shown earlier by [64] for Antarctic lichen *Dermatocarpon polyphyllizum*. Hydration-induced reflectance changes in the visible region are due to the high absorption by photosynthetic pigments, while high reflectance in the near-infrared region is due to high scattering from the internal tissues of the lichens [73,74].

The shape of the spectral reflectance curve of *R. terebrata* is typical for lichens with green thalli, with several local maxima in the wavelength range of 520–660 nm followed by the red-edge increase. Similar features of the respective curves were found for the thalli of two Antarctic species which are green when moist but not in dry state: *Physconia muscigena* [33], and *Dermatocarpon polyphyllizum* [75]. The spectral range of 520–660 nm is affected mainly by the composition and number of photosynthetic pigments which are sensed as the above-mentioned maxima in wet thalli but not in dry thalli which appear grey (*P. muscigena*, *D. polyphyllizum*) due to the chromatic change in the dehydrated upper cortex. The role of the upper cortex optical properties can be seen in the spectral curves of the algae-containing part of *Placopsis antarctica* which, due to generally white color in both dry and wet states, shows almost identical spectral curves (see Figure 8) and does not have any local maxima in the 520–660 nm band.

Our data suggest that apart from species-specific effects, NDVI and PRI indices differ in dry and wet lichens. An increase in NDVI in dry vs. wet thalli in black *H. lugubris* can be compared to a similar response in the following polar lichens that have a black thallus in a wet state: *Umbilicaria hirsuta* [76], *U. cylindrica*, and *U. decussata* ([77]). However, other representatives of Umbilicariaceae that have a deep green color in wet state show a decrease of NDVI with thallus desiccation, as well as lower NDVI values in dry than in wet condition (*U. arctica*, *U. hyperborea*: see [49]).

Our result shows that reflectance curves and/or NDVI offer great potential for remote sensing studies, at least for the detection of Antarctic lichen, according to differential physiological conditions. In many lichen species, NDVI differs in wet and dry states. Typically, lower NDVI values are found in a wet than a dry state [33]. Therefore, NDVI values would be used as proxies of hydration status of thalli and physiological activity of lichens. With technological progress and more frequent use of unmanned aerial vehicles for follow-up studies in Antarctic terrestrial ecosystems, an improvement in the application of NDVI in lichen ecophysiological studies might be expected.

5. Conclusions

- Dehydration response curves of potential yield of PSII (F_V/F_M) revealed that primary photosynthetic processes of PSII remained active in *P. antarctica* cephalodia, even

after severe desiccation (RWC below 10%) compared to the chlorolichens that exhibit a high degree of F_V/F_M limitation. This might be explained by the effect of the exopolysaccharidic envelope of symbiotic *Nostoc commune* that helps the cephalodium to maintain higher RWC than average values for the whole thallus including the algal part of the thallus.

- For effective yield of PSII (Φ_{PSII}), the dehydration response curves indicated that *H. lugubris* showed somewhat higher Φ_{PSII} values at the RWC < 10% than the rest of the investigated species. Together with gradual activation of nonphotochemical quenching (NPQ) during thallus desiccation, this suggests an advantage for the species in terms of efficient primary photosynthetic processes during the final phase of desiccation. This might be a useful mechanism because in the field, the species desiccates rapidly due to the black thallus color. Generally, lichens with dark thalli absorb more light energy and therefore warm up and desiccate more rapidly than species with brighter-colored thalli.
- All species showed a decrease in the ChlF signal with ongoing desiccation and general flattening of the slow Kautsky kinetics curve. As a result of this phenomenon the index parameters derived from the ChlF levels P, S, M, S, such as P/S, P/M S/M generally increased, but the response and indicative value of such parameters for ecophysiological studies must be verified in follow-up studies.
- Spectral reflectance curves recorded in wet and dry states of thalli showed more evident differences in green than black or blackish lichens, with typically lower reflectance in the wet than in the dry state.
- In addition to being used to separate rock-dwelling lichens from those growing on bare soil, species-specific spectral signatures, spectral reflectance methods, and NDVI in particular have the potential to determine lichen physiological activity and water content [78].

Author Contributions: M.B.: data measurements, chlorophyll fluorescence data processing and manuscript writing; A.C.-K.: Antarctic Expeditions leader, manuscript writing; J.H.: data processing, graphs creation and editing; A.O.: data processing, literature survey; C.M.: lichens morphoanalysis; J.V.: thallus morphology analysis and manuscript writing; G.P.: Thallus documentation, microscopical photography. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Chilean Antarctic Institute, grant number INACH RT2716 (Chile), National Fund for Scientific and Technological Development, grant number ANID-FONDECYT 1181745 (Chile), Czech Ministry of Education, Youth, and Sports, grant numbers CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001708 and LM2015078, and Masaryk University Brno, Czech Republic grant number MUNI/G/1540/2019.

Institutional Review Board Statement: Field Antarctic research was based on the permit for traveling to Antarctica 1021/2018 and the sampling permit No. 1022/2018 given by INACH (Chile).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors acknowledge the projects: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001708 (ECOPO-LARIS, Czech Republic), LM2015078 (CzechPolar II, Czech Republic), and MUNI/G/1540/2019 (Masaryk University, Brno).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ChlF—chlorophyll fluorescence; F_s —steady state chlorophyll fluorescence; F_V/F_M —potential yield of photochemical processes in photosystem II; Φ_{PSII} —effective quantum yield of photosystem II; HA—*Himantormia lugubris*; Kks—Kautsky kinetics of chlorophyll fluorescence; LB—*Lecania brialmontii*; NDVI—normalized difference vegetation index; NPQ—nonphotochemical quenching; OPMST—shape of slow Kautsky kinetics with remarkable points O (origin) to T (steady state); PA—*Placopsis antarctica*; PAR—photosynthetically-active radiation; PS II—photosystem II; PRI—photochemical

reflectance index; PS—*Parmelia saxatilis*; SRC—spectral reflectance curve; RA—*Ramalina terebrata*; RC—reaction centre; RWC—relative water content; $RWC_{1/2}$ —relative water content at which a chlorophyll fluorescence parameter reaches half of its maximum value; RWC_{crit} —relative water content at which the chlorophyll fluorescence parameter reaches zero.

References

1. Øvstedal, D.; Lewis-Smith, R. *Lichens of Antarctica and South Georgia, A Guide to their Identification and Ecology*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2001; p. 411.
2. Olech, M. *Lichens of King George Island, Antarctica*; Drukarnia Uniwersytetu Jagiellńskiego: Kraków, Poland, 2004; p. 391.
3. Kennedy, A.D. Water as a limiting factor in the Antarctic Terrestrial environment: A biogeographical synthesis. *Artic Alp. Res.* **1993**, *25*, 308–315. [[CrossRef](#)]
4. Green, T.; Sancho, L.; Pintado, A.; Schroeter, B. Functional and spatial pressures on terrestrial vegetation in Antarctica forced by global warming. *Polar Biol.* **2011**, *34*, 1643–1656. [[CrossRef](#)]
5. Green, T.G.A.; Sancho, L.G.; Pintado, A. Ecophysiology of desiccation/rehydration cycles in mosses and lichens. In *Plant Desiccation Tolerance*; Luttge, U., Beck, E., Bartels, D., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2011; Volume 215, pp. 89–120.
6. Schroeter, B.; Scheidegger, C. Water relations in lichens at subzero temperatures: Structural changes and carbon dioxide exchange in the lichen *Umbilicaria aprina* from continental Antarctica. *New Phytol.* **1995**, *131*, 275–285. [[CrossRef](#)]
7. Green, T.G.A.; Schroeter, B.; Sancho, L.G. Plant life in Antarctica. In *Handbook of Functional Plant Ecology*; Pugnaire, F.I., Valladares, F., Eds.; Marcel Dekker Inc.: New York, NY, USA, 2007.
8. Sancho, L.; Pintado, A.; Green, A. Antarctic studies show lichens to be excellent biomonitors of climate change. *Diversity* **2019**, *11*, 42. [[CrossRef](#)]
9. Casanova-Katny, A.; Barták, M.; Gutierrez, C. Open top chamber microclimate may limit photosynthetic processes in Antarctic lichen: Case study from King George Island, Antarctica. *Czech. Polar Rep.* **2019**, *9*, 61–77. [[CrossRef](#)]
10. Colesie, C.; Williams, L.; Büdel, B. Water relations in the soil crust lichen *Psora decipiens* are optimized via anatomical variability. *Lichenologist* **2017**, *49*, 483–492. [[CrossRef](#)]
11. Inoue, T.; Kudoh, S.; Uchida, M.; Tanabe, Y.; Inoue, M.; Kanda, H. Factors affecting water availability for high Arctic lichens. *Polar Biol.* **2017**, *40*, 853–862. [[CrossRef](#)]
12. Kappen, L. Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. *Antarct. Sci.* **2000**, *12*, 314–324. [[CrossRef](#)]
13. Colesie, C.; Green, T.G.A.; Raggio, J.; Büdel, B. Summer activity patterns of Antarctic and high alpine lichen-dominated biological soil crusts—Similar but different? *Arct. Antarct. Alp. Res.* **2016**, *48*, 449–460. [[CrossRef](#)]
14. Veerman, J.; Vasilev, S.; Paton, G.D.; Ramanauskas, J.; Bruce, D. Photoprotection in the lichen *Parmelia sulcata*: The origins of desiccation-induced fluorescence quenching. *Plant. Physiol.* **2007**, *145*, 997–1005. [[CrossRef](#)]
15. Heber, U.; Bilger, W.; Shuvalov, V.A. Thermal energy dissipation in reaction centers of photosystem II protects desiccated poikilohydric mosses against photooxidation. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 2993–3006. [[CrossRef](#)]
16. Heber, U.; Azarkovich, M.; Shuvalov, V.A. Activation of mechanisms of photoprotection by desiccation and by light: Poikilohydric photoautotrophs. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 2745–2759. [[CrossRef](#)]
17. Heber, U. Photoprotection of green plants: A mechanism of ultra-fast thermal energy dissipation in desiccated lichens. *Planta* **2008**, *228*, 641–650. [[CrossRef](#)]
18. Heber, U.; Bilger, W.; Turk, R.; Lange, O.L. Photoprotection of reaction centres in photosynthetic organisms: Mechanisms of thermal energy dissipation in desiccated thalli of the lichen *Lobaria pulmonaria*. *New Phytol.* **2010**, *185*, 459–470. [[CrossRef](#)]
19. Riznichenko, G.; Lebedeva, G.; Pogosyan, S.; Sivchenko, M.; Rubin, A. Fluorescence induction curves registered from individual microalgae cenobiums in the process of population growth. *Photosynth. Res.* **1996**, *49*, 151–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Papageorgiou, G.C.; Govindjee. Photosystem II fluorescence slow changes—Scaling from the past. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2011**, *104*, 258–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Stirbet, A.; Riznichenko, G.Y.; Rubin, A.B.; Govind, J. Modeling chlorophyll *a* fluorescence transient: Relation to photosynthesis. *Biochemistry* **2014**, *79*, 291–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Seaton, G.G.; Walker, D.D. Chlorophyll fluorescence as a measure of photosynthetic carbon assimilation. *Proc. R. Soc.* **1990**, *242*, 29–35.
23. Noctor, G.; Horton, P. Uncouple titration of energy-dependent chlorophyll fluorescence quenching and photosystem II photochemical yield in intact pea chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1016*, 228–234. [[CrossRef](#)]
24. Allen, J.F. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1098*, 275–335. [[CrossRef](#)]
25. Krause, H.G. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol. Plant.* **1988**. [[CrossRef](#)]
26. Kodru, S.; Malavath, T.; Devadasu, E.; Nellaepalli, S.; Stirbet, A.; Subramanyam, R.; Govind, J. The slow S to M rise of chlorophyll *a* fluorescence reflects transition from state 2 to state 1 in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* **2015**, *125*, 219–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Ruban, A.V.; Young, A.J.; Horton, P. Induction of nonphotochemical energy dissipation and absorbance changes in leaves (Evidence for changes in the state of the light-harvesting system of photosystem II in vivo). *Plant. Physiol.* **1993**, *102*, 741–750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Tikkanen, M.; Grieco, M.; Nurmi, P.; Rantala, M.; Suorsa, M.; Aro, E.-M. Regulation of the photosynthetic apparatus under fluctuating growth light. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. Biol. Sci.* **2012**, *367*, 3486–3493. [[CrossRef](#)]
29. Stirbet, A.; Govindjee. The slow phase of chlorophyll *a* fluorescence induction in silico: Origin of S-M fluorescence rise. *Photosynth. Res.* **2016**, *130*, 193–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Conti, S.; Hazdrová, J.; Hájek, J.; Očenášová, P.; Barták, M.; Skácelová, K.; Adamo, P. Comparative analysis of heterogeneity of primary photosynthetic processes within fruticose lichen thalli: Preliminary study of interspecific differences. *Czech. Polar Rep.* **2014**, *4*, 149–157. [[CrossRef](#)]
31. Mishra, A.; Hájek, J.; Tuháčková, T.; Barták, M.; Mishra, K.B. Features of chlorophyll fluorescence transients can be used to investigate low temperature induced effects on photosystem II of algal lichens from polar regions. *Czech. Polar Rep.* **2015**, *5*, 99–111. [[CrossRef](#)]
32. Nabe, H.; Funabiki, R.; Kashino, Y.; Koike, H.; Satoh, K. Responses to desiccation stress in Bryophytes and an important role of dithiothreitol-insensitive non-photochemical quenching against photoinhibition in dehydrated states. *Plant. Cell Physiol.* **2007**, *48*, 1548–1557. [[CrossRef](#)]
33. Barták, M.; Hájek, J.; Morkusová, J.; Skácelová, K.; Košuthová, A. Dehydration-induced changes in spectral reflectance indices and chlorophyll fluorescence of Antarctic lichens with different thallus color, and intrathalline photobiont. *Acta Physiol. Plant.* **2018**, *40*, 177–187.
34. Trnková, K.; Barták, M. Desiccation-induced changes in photochemical processes of photosynthesis and spectral reflectance in *Nostoc commune* (Cyanobacteria, Nostocales) colonies from Antarctica. *Phycol. Res.* **2017**, *65*, 44–50. [[CrossRef](#)]
35. Kosugi, M.; Miyake, A.; Kasino, Y.; Shibata, Y.; Satoh, K.; Itoh, S. Lichens assist the drought-induced fluorescence quenching of their photobiont green algae through arabitol. In *Photosynthesis Research for Food, Fuel and the Future. Advanced Topics in Science and Technology in China*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; pp. 514–520.
36. Rückamp, M.; Braun, M.; Suckro, S.; Blindow, N. Observed glacial changes on the King George Island ice cap, Antarctica, in the last decade. *Glob. Planet. Chang.* **2011**, *79*, 99–109. [[CrossRef](#)]
37. Ochyra, R.; Smith, R.I.L.; Bednarek-Ochyra, H. *The Illustrated Moss Flora of Antarctica*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2008; p. 704.
38. Andreyev, M.P. The lichens in the vicinity of Bellingshausen Station, King George Island. *Polar Geogr. Geol.* **1989**, *13*, 42–45. [[CrossRef](#)]
39. Beck, A.; Bechteler, J.; Casanova-Katny, A.; Dzhilyanova, I. The pioneer lichen *Placopsis* in maritime Antarctica: Genetic diversity of their mycobionts and green algal symbionts, and their correlation with deglaciation time. *Symbiosis* **2019**, *79*, 1–24. [[CrossRef](#)]
40. Marečková, M.; Barták, M. Effects of short-term low temperature stress on chlorophyll fluorescence transients in Antarctic lichen species. *Czech. Polar Rep.* **2016**, *6*, 56–65. [[CrossRef](#)]
41. Rouse, J.W.; Haas, R.H.; Schell, J.A.; Deering, D.W. Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS. In Proceedings of the Third Earth Resources Technology Satellite-1 Symposium. Volume I: Technical Presentations, NASA SP-351, NASA, Washington, DC, USA, 10–14 December 1973; pp. 309–317.
42. Gamon, J.A.; Peñuelas, J.; Fiels, C.B. A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Remote Sens. Environ.* **1992**, *41*, 35–44. [[CrossRef](#)]
43. Dufková, K.; Barták, M.; Morkusová, J.; Elster, J.; Hájek, J. Screening of growth phases of Antarctic algae and cyanobacteria cultivated on agar plates by chlorophyll fluorescence imaging. *Czech. Polar Rep.* **2019**, *9*, 170–181. [[CrossRef](#)]
44. Cho, S.M.; Lee, H.; Hong, S.G.; Lee, J. Study of ecophysiological responses of the antarctic fruticose lichen *Cladonia borealis* using the PAM fluorescence system under natural and laboratory conditions. *Plants* **2020**, *9*, 85. [[CrossRef](#)]
45. Uchida, M.; Nakatsubo, T.; Kanda, H.; Koizumi, H. Estimation of the annual primary production of the lichen *Cetrariella delisei* in a glacier foreland in the high Arctic, Ny-Ålesund, Svalbard. *Polar Res.* **2006**, *25*, 39–49.
46. Zúñiga-González, P.; Zúñiga-González, G.E.; Pizzaro, M.; Casanova-Katny, A. Soluble carbohydrate content variation in *Sanionia uncinata* and *Polytrichastrum alpinum*, two Antarctic mosses with contrasting desiccation capacities. *Biol. Res.* **2016**, *49*, 1–9. [[CrossRef](#)]
47. Sancho, L.; De los Ríos, A.; Pintado, A.; Colesie, C.; Raggio, J.; Ascaso, C.; Green, A. *Himantormia lugubris*, an Antarctic endemic on the edge of the lichen symbiosis. *Symbiosis* **2020**, *82*, 49–58. [[CrossRef](#)]
48. Barták, M. Lichen Photosynthesis. Scaling from the cellular to the organism level. In *The Structural Basis of Biological Energy Generation. Advances in Photosynthesis and Respiration*; Hohmann-Marriott, M.F., Ed.; Advances in Photosynthesis and Respiration; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2014; Volume 39, pp. 379–400. [[CrossRef](#)]
49. Barták, M.; Trnková, K.; Hansen, E.S.; Hazdrová, J.; Skácelová, K.; Hájek, J.; Forbelská, M. Effect of dehydration on spectral reflectance and photosynthetic efficiency in *Umbilicaria arctica* and *U. hyperborea*. *Biol. Plant.* **2015**, *59*, 357–365. [[CrossRef](#)]
50. Nayaka, S.; Saxena, P. Physiological responses and ecological success of lichen *Stereocaulon foliolosum* and moss *Racomitrium subsecundum* growing in same habitat in Himalaya. *Indian J. Fundam. Appl. Life Sci.* **2014**, *4*, 167–179.
51. Hovind, A.B.A.; Phinney, N.H.; Gauslaa, Y. Functional trade-off of hydration strategies in old forest epiphytic cephalolichens. *Fungal Biol.* **2020**, *124*, 903–913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Kranner, I.; Beckett, R.; Hochman, A.; Nash, T.H. Desiccation-tolerance in lichens: A review. *Bryologist* **2008**, *111*, 576–593. [[CrossRef](#)]
53. Heber, U.; Lange, O.L.; Shuvalov, V.A. Conservation and dissipation of light energy as complementary processes: Homoiohydric and poikilohydric autotrophs. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 1211–1223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Krause, G.H.; Jahns, P. Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: Characterization and function. In *Chlorophyll a Fluorescence*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2004; Volume 19, pp. 463–495.
55. Zorn, M.; Pfeifhofer, H.W.; Grill, D.; Kranner, I. Responses of plastid pigments to desiccation and rehydration in the desert lichen *Ramalina maciformis*. *Symbiosis* **2001**, *31*, 201–212.
56. MacKenzie, T.D.; MacDonald, T.M.; Dubois, L.A.; Campbell, D.A. Seasonal changes in temperature and light drive acclimation of photosynthetic physiology and macromolecular content in *Lobaria pulmonaria*. *Planta* **2001**, *214*, 57–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Kranner, I.; Zorn, M.; Turk, B.; Wornik, S.; Beckett, R.P.; Batič, F. Biochemical traits of lichens differing in relative desiccation tolerance. *New Phytol.* **2003**, *160*, 167–176. [[CrossRef](#)]
58. Slavnov, C.; Reus, M.; Holzwarth, A.R. Two different mechanisms cooperate in the desiccation-induced excited state quenching in *Parmelia* lichen. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 11326–11336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Komura, M.; Yamagishi, A.; Shibata, Y.; Iwasaki, I.; Itoh, S. Mechanism of strong quenching of photosystem II chlorophyll fluorescence under drought stress in a lichen, *Physciella melanchlra*, studied by subpicosecond fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1797*, 331–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Heber, U. Conservation and dissipation of light energy in desiccation-tolerant photoautotrophs, two sides of the same coin. *Photosynth. Res.* **2012**, *113*, 5–13. [[CrossRef](#)]
61. Gauslaa, Y.; Solhaug, K.A. Fungal melanins as a sun screen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria*. *Oecologia* **2001**, *126*, 462–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Wieners, P.C.; Mudimu, O.; Bilger, W. Desiccation-induced non-radiative dissipation in isolated green lichen algae. *Photosynth. Res.* **2012**, *113*, 239–247. [[CrossRef](#)]
63. Papageorgiou, G.C.; Tsimilli-Michael, M.; Stamatakis, K. The fast and slow kinetics of chlorophyll *a* fluorescence induction in plants, algae and cyanobacteria: A viewpoint. *Photosynth. Res.* **2007**, *94*, 275–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Mishra, K.B.; Vitek, P.; Barták, M. A correlative approach, combining chlorophyll *a* fluorescence, reflectance, and Raman spectroscopy, for monitoring hydration induced changes in Antarctic lichen *Dermatocarpon polyphyllizum*. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, *208*, 13–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Tsimilli-Michael, M.; Stamatakis, K.; Papageorgiou, G.C. Dark-to-light transition in *Synechococcus* sp. PCC 7942 cells studied by fluorescence kinetics assesses plastoquinone redox poise in the dark and photosystem II fluorescence component and dynamics during state 2 to state 1 transition. *Photosynth. Res.* **2009**, *99*, 243–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Kaňa, R.; Kotabová, E.; Komárek, O.; Šedivá, B.; Papageorgiou, G.C.; Govindjee; Prášil, O. The slow S to M fluorescence rise in cyanobacteria is due to a state 2 to state 1 transition. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1817*, 1237–1247. [[CrossRef](#)]
67. Finazzi, G.; Barbagallo, R.P.; Bergo, E.; Barbato, R.; Forti, G. Photoinhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* in State 1 and State 2. Damages to the photosynthetic apparatus under linear and cyclic electron flow. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22251–22257. [[CrossRef](#)]
68. Mishra, K.B.; Vitek, P.; Mishra, A.; Hájek, J.; Barták, M. Chlorophyll *a* fluorescence and Raman spectroscopy can monitor activation/deactivation of photosynthesis and carotenoids in Antarctic lichens. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *239*, 118458. [[CrossRef](#)]
69. Ekman, S. The corticolous and lignicolous species of *Bacidia* and *Bacidina* in North America. *Opera Bot.* **1996**, *127*, 1–139.
70. Barták, M.; Hájek, J.; Amarillo, A.M.; Hazdrová, J.; Carreras, H. Changes in spectral reflectance of selected Antarctic and South American lichens caused by dehydration and artificially-induced absence of secondary compounds. *Czech. Polar Rep.* **2016**, *6*, 221–230. [[CrossRef](#)]
71. Bechtel, R.; Rivard, B.; Sánchez-Azofeifa, A. Spectral properties of foliose and crustose lichens based on laboratory experiments. *Remote Sens. Environ.* **2002**, *82*, 389–396. [[CrossRef](#)]
72. Van Der Veen, C.J.; Csatho, B.M. Spectral characteristics of Greenland Lichens. *Géogr. Phys. Quat.* **2005**, *59*, 63–73. [[CrossRef](#)]
73. Kiang, N.Y.; Siefert, J.; Govindjee; Blankenship, R.E. Spectral signatures of photosynthesis. I. Review of earth organisms. *Astrobiology* **2007**, *7*, 222–251. [[CrossRef](#)]
74. Kiang, N.Y.; Segura, A.; Tinetti, G.; Govindjee; Blankenship, R.E.; Cohen, M.; Siefert, J.; Crisp, D.; Meadows, V.S. Spectral signatures of photosynthesis. II. Coevolution with other stars and the atmosphere on extrasolar worlds. *Astrobiology* **2007**, *7*, 252–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Barták, M.; Mishra, K.B.; Marečková, M. Spectral reflectance indices sense desiccation induced changes in the thalli of Antarctic lichen *Dermatocarpon polyphyllizum*. *Czech. Polar Rep.* **2018**, *8*, 249–259. [[CrossRef](#)]
76. Gloser, J.; Gloser, V. Changes in spectral reflectance of a foliar lichen *Umbilicaria hirsuta* during desiccation. *Biol. Plant.* **2007**, *51*, 395–398. [[CrossRef](#)]
77. Jupa, R.; Hájek, J.; Hazdrová, J.; Barták, M. Interspecific differences in photosynthetic efficiency and spectral reflectance in two *Umbilicaria* species from Svalbard during controlled desiccation. *Czech. Polar Rep.* **2012**, *2*, 31–41. [[CrossRef](#)]
78. Granlund, L.; Keski-Saari, S.; Kumpula, T.; Oksanen, E.; Keinanan, M. Imaging lichen water content with visible to mid-wave infrared (400–5500 nm) spectroscopy. *Remote Sens. Environ.* **2018**, *216*, 301–310. [[CrossRef](#)]

Publikace 3 (Příloha 4)

Orekhova A., Marečková M., Hazdrová J., Barták M. (2018a) The effect of upper cortex absence on spectral reflectance indices in Antarctic lichens during thallus dehydration. *Czech Polar Reports*, 8(1): 107-118. doi:10.5817/CPR2018-1-8.

The effect of upper cortex absence on spectral reflectance indices in Antarctic lichens during thallus dehydration

Alla Orekhova, Michaela Marečková, Jana Hazdrová, Miloš Barták*

Laboratory of Photosynthetic Processes, Section of Plant Physiology and Anatomy, Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

Abstract

In maritime Antarctica, lichens and mosses represent dominant autotrophs forming community structure of vegetation oases. In our study, we selected 4 most common lichen species (*Xanthoria elegans*, *Rhizoplaca melanophthalma*, *Leptogium puberulum*, *Physconia muscigena*) and monospecific colony of *Nostoc commune* typical for James Ross Island (Antarctica) for detailed physiological experiments. We investigated their spectral characteristics in response to hydration status of their thalli. In samples desiccating from fully wet (RWC, relative water content of 100%) to dry state (RWC = 0), photochemical reflectance index (PRI), and normalized difference vegetation index (NDVI) were evaluated for control thalli and those with removed upper cortex. In this way, the effect of presence/absence of the upper cortex on PRI, NDVI was studied. PRI showed either no change or species-specific an increase/decrease with dehydration. Removal of the upper cortex caused both PRI decrease (*N. commune*, *P. muscigena*) and increase (*R. melanophthalma*, *L. puberulum*). Removal of the upper cortex led to increase in NDVI in all species, typically within the RWC range of 20-100%. Species-specific differences of hydration-response curves of PRI and NDVI are discussed as well as the role of the absence of the upper cortex in the evaluation of spectral characteristics in desiccating lichens.

Key words: PRI, NDVI, cyanolichens, chlorolichens, *Nostoc commune*

DOI: 10.5817/CPR2018-1-8

Received April 4, 2018, accepted July 26, 2018.

*Corresponding author: M. Barták <mbartak@sci.muni.cz>

Acknowledgements: The authors are grateful to the CzechPolar2 project (LM2015078), its infrastructure that enabled sample collection and handling. Experimental part of work has been done in the EEL laboratory (Masaryk University, Brno) and supported by the ECOPOLARIS project (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001708).

Introduction

Since the late 80-ies, spectral reflectance curves of lichens (Ager et Milton 1987) have been used in remote sensing to determine lichen-covered and lichen-free rock surfaces. Recently, the attempts are made to distinguish substrate from a lichen cover (*e.g.* Zhang et al. 2005) and identify individual lichen species from a complex spectrum taken by satellite cameras (Morison et al. 2014). Application of spectral reflectance methods in physiological studies in lichens is, however, much less frequent in comparison to the studies dealing with remote sensing and mapping of lichens in forest-free lands. Within last three decades, several physiological studies have focused on spectral characteristics of lichens addressing different aspects of lichen biology such as species-specificity (*e.g.* Van der Veen et Csatho 2005), thallus dehydration (Jupa et al. 2012, Barták et al. 2015a), effects of heavy metals on lichen reflectance spectra (Regan et al. 2016), and manipulated amount of secondary metabolites in the upper cortex (Barták et al. 2016).

Appart of spectral reflectance curves, spectral reflectance indices are used in lichens recently. Normalized difference vegetation index (NDVI), and the photochemical reflectance index (PRI) are the most frequently exploited in lichen biology recently in remote sensing (Marcinkowska-Ochtyra et al. 2018), field studies (*e.g.* Petzold et Goward 1988, Van der Veen et Csatho 2005, Kleefeld et al. 2018), and laboratory experiments (*e.g.* Bechtel et al. 2002, Neta et al. 2010). Generally, the estimation of daily, seasonal, and interseasonal changes of NDVI and PRI in lichen vegetation has a great potential for ecophysiological studies in subpolar and polar regions because such approach may combine field and satellite data. Moreover, laboratory PRI and NDVI data measured at different physical conditions (temperature and hydration in particular) might be used for explanation of PRI, NDVI variability in natural li-

chen-dominated ecosystems. In field research, however, NDVI and PRI would be interpreted carefully because the changes might be driven by a variety of local factors, such as durability of snow cover, precipitation pattern, microrelief-dependent differences in desiccation of lichens, *etc.*

In higher plants, NDVI reaches the highest value for green leaves, *i.e.* those with an optimal amount of chlorophyll. Any decrease in chlorophyll content is demonstrated as a decrease in NDVI. Therefore, NDVI is widely used as indicator of stresses that affect chlorophyll contents in plant tissues negatively. In lichens, NDVI was shown to decrease with thallus dehydration. However, the decrease is species-specific (Neta et al. 2010). NDVI is an indicator of negative effects of heavy metals (*e.g.* Garty et al. 2000). The photochemical reflectance index (PRI) is considered an indicator of the early stress in photosynthetic apparatus, photochemical processes in particular (Gamon et al. 1997). It is because of PRI calculation exploits the wavelengths that are related to photosynthetic pigments. The reflectance at the wavelength of 531 nm evaluates the amount of xanthophyll cycle pigments which are closely linked to radiation use efficiency and protective mechanism. The reflectance at 531 nm is associated with the de-epoxidation of violaxanthin to zeaxanthin via antheraxanthin (Gamon et al. 1990). The 570 nm reflectance is, however, unaffected by xanthophyll cycle pigments. It is, therefore, used as reference value in PRI calculation.

PRI has been exploited for different scales studies in higher plants ranging from a single leaf level to remote sensing of large areas covered by vegetation. For lichen-dominated tundra ecosystems, PRI measurements are used in complex studies focusing interannual changes of spectral characteristics, *e.g.* in North America and Eurasia Arctic transects, specifically at Isachsen Island and Krenkel Island (*see*

Walker et al. 2011). In laboratory studies with lichens, PRI has been used recently in the experiments evaluating PRI changes with progressive thallus dehydration (e.g. Singh et al. 2013, Barták et al. 2018). Since optical properties of the upper cortex change during lichen desiccation, they may affect the amount of photosynthetically active radiation reaching photobiont layer, as well as reflectance signal attributed to photosynthetic pigments. Therefore, the main objective of the present study was to as-

sess the effect of presence/absence of the upper cortex layer on PRI and NDVI in response to gradual dehydration. We hypothesized that species-specific sensitivity would exist in lichen species with different color and photobiont (alga, cyanobacterium). In this study, we measured spectral reflectance indices to describe the effect of absence of upper cortex (scraped) spectral characteristics of particular experimental species in response to dehydration.

Material and Methods

Collection of samples

Lichens (*Xanthoria elegans*, *Leptogium puberulum*, *Physconia muscigena*, and *Rhizoplaca melanophthalma*), and colonies of *Nostoc commune* were collected at the northern part of James Ross Island (Ulu peninsula), Antarctica. Collection site was the Long-Term Research Plot (LTRP, 63°48'03" S, 57°52'50" W) located close to the coast in between the confluxes of the Bohemian and Algal streams. The area was described by Barták et al. (2015b). The LTRP is dominated by *Bryum pseudo-*

triquetrum that forms carpets, a longitudinal axis of which follows the line of thawing water pathway from a temporary snowfield located hillside 50 m away from the area. The LTRP is composed of two sub-areas, both of them rich in mosses, lichens, and microbial mats formed by *Nostoc* sp. colonies, algae (prevalently *Zygnema* sp.) Outside of moss carpets, a stony surface is covered patchily by several lichen species, such as e.g. *Rhizoplaca melanophthalma*, *Xanthoria elegans*.

Species characteristics

Overview of the characteristics for individual experimental species used in this study was compiled from several web sources listed in References ([1, 2] - Other sources).

Xanthoria elegans – epilithic foliose lichen, forming the right, yellow-orange to reddish-orange rosettes 2-4 cm in diameter or larger colonies, tightly adnate, lobate. Lobes are up to 6-7 mm long and 0.5-1 mm wide. Lower surface covered with short rhizoids, light brown or whitish color. Medulla is white, reticulate, with short to elongate hyphae. Apothecia are numerous, sedentary, up to 1-2 mm in diameter,

orange, usually with a concave or flat disc, with a solid, sometimes curved lamellar edge. Photobiont is alga *Trebouxia*. Spores are bipolar, two-cells, thickened septum with a well-visible canal. It is characterized by the predominance of parietin, which in the form of crystals covers the upper cortex layer. Presence of parietin acid, emodin and teloschistin is reported as well. The species is widespread in mountainous and Arctic areas.

Rhizoplaca melanophthalma (Ram.) Leuckert & Poelt – thallus lobate, forming rosettes 1-3 cm in diameter. It is attached to the substrate only by the central part.

The lobes are up to 0.3 mm wide, light yellowish, yellowish-green, to grayish-green, often shiny. Apothecia are 1-3 mm in diameter, numerous. The disc from light yellow and pale brown to black, concave, with age becomes flat. Thallus edge is thick, the same color as the disk, one-piece. Secondary metabolites in the upper cortex are with usnic acid only; in medulla - with no substances or various fatty acids (pertusaric/constipatic acid complex), or with psoromic and/or occasionally lecanoric acid chemosyndromes and occasionally other unidentified substances. *R. melanophthalma* inhabits siliceous rocky substrates rich in nitrogen compounds. Cosmopolitan, in mountainous and Arctic areas.

Leptogium puberulum – thallus is usually foliose, but also crustose to squamulose to dwarf fruticose, usually lobate. The cortical layer is developed on both sides. The thallus is usually lead-gray, dark-olive, brownish to almost black, dull or shiny, smooth or often strongly wrinkled, sometimes with isidia, phyllidia or lobules but soredia and pseudocyphellae absent. Photobiont – cyanobacteria *Nostoc*. Lower surface has the same color as the upper surface but usually lighter, smooth or wrinkled, sometimes with a dense white tomentum of cylindrical or spherical hairs or otherwise with scattered tufts of rhizines or hapters. Apothecia are located over the entire surface or along the edges of the lobes. Spores are cross-multicellular, fusiform to ellipsoid or ovoid. Secondary metabolites were not detected. Widely distributed from the tropics to the polar regions.

Thallus characteristics

Fully hydrated samples of experimental lichen species and *Nostoc commune* were cut into thin slices, then placed in a water droplet and observed under a digital light microscope (Keyence, WHX-900, Japan). Digital photographs were taken at the mag-

Physconia muscigena (Ach.) Poelt – a foliose lichen, usually irregular and often coalescent and entangled with other thalli, to 5-12 cm wide, cushion-like, loosely attached to substrate, without soredia. The lobes are up to 2 mm wide, generally linear, discrete, at the edges are usually raised up. The upper surface of the gray-brown to dark brown, covered with plaque. Medulla is white. The lower surface is light brown on the periphery, brown-black in the central part. The rhizoids are black, hairy. Secondary metabolites are often absent, but sometimes producing secalonic acid A (accessory pigment) and/or variolaric acid (accessory). *P. muscigena* grows on soil among mosses, on mossy stones and rocks. It is found in both hemispheres from the Arctic to the temperate regions in the mountains.

Nostoc commune is a representative of unbranched filamentous cyanoprokaryota having heterocyst. It forms macroscopic colonies, first in the form of spheres of yellow or olive color, then forms a dense sprawling strata, which grows into large, up to several tens of centimeters colonies. Frequently found in terrestrial and semi-aquatic Antarctic habitats, on various substrates, mainly in conditions of excessive moisture. Generally, the ability of *N. commune* to fix atmospheric nitrogen and, to resist desiccation may explain its dominance in many terrestrial habitats in Antarctica. It thrives well in wet Antarctic ecosystems, such as margins of freshwater terrestrial lakes, temporal ponds, streams and seepages, rich in melt water.

nification of 2000. Thicknesses of a lichen cross section (TT), and upper cortex thickness (UCT) were measured, using the 10 µm and ImageJ 1.48 software (National Institute of Health, Bethesda, USA).

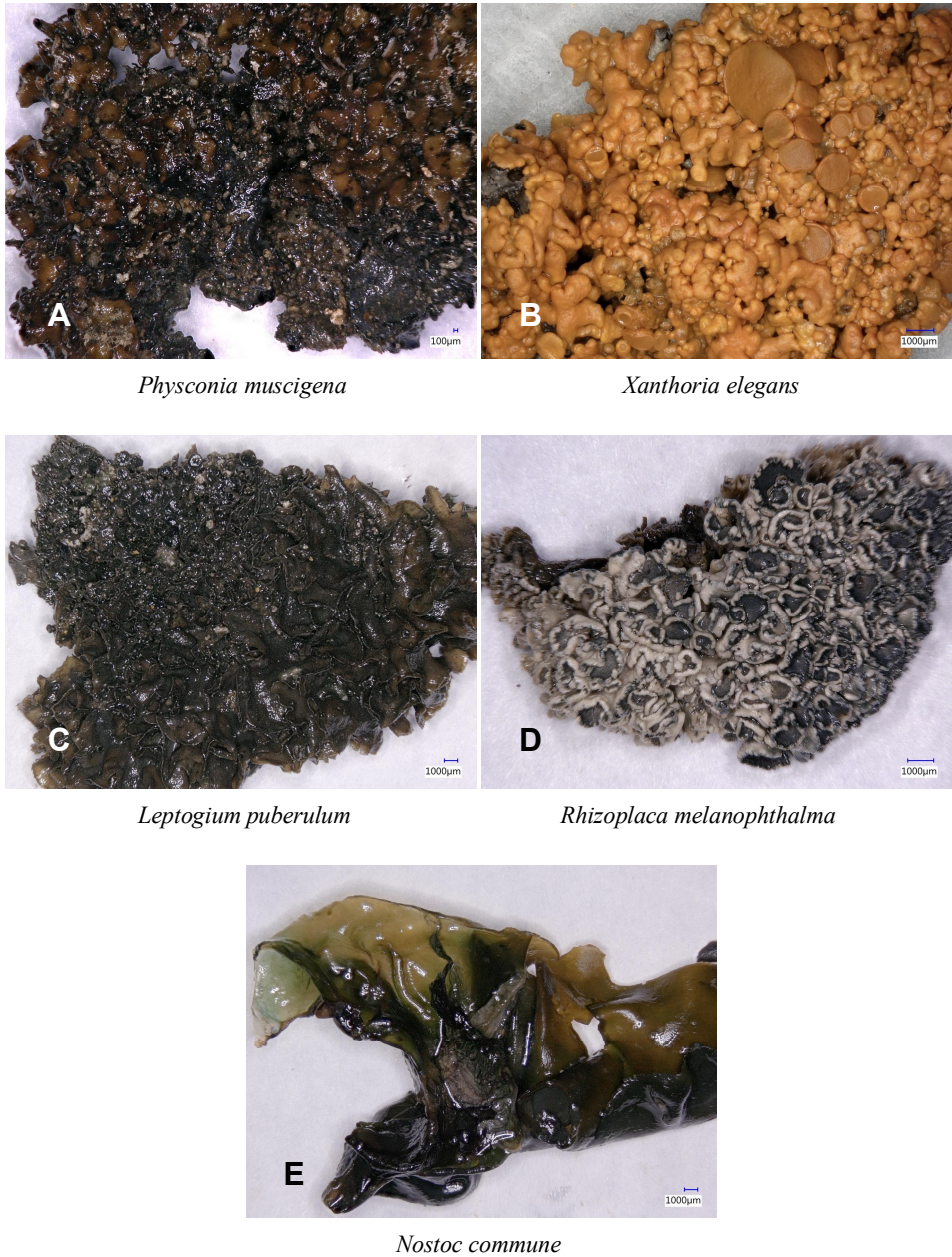


Fig. 1. Photographs of thalli of 4 experimental lichen species and a cyanobacterial colony collected at the James Ross Island (Antarctica) and used in this study: A - *Physconia muscigena*, B - *Xanthoria elegans*, C - *Leptogium puberulum*, D - *Rhizoplaca melanophthalma*, E - colony of *Nostoc commune*. The photographs were taken by a digital optical microscope Keyence WHX-900 (Japan).

Means of at least 120 measurements of TT and UCT were calculated for each species. For experiments, control thalli and those with removed upper cortex were used. In

individual species, the upper cortex was removed manually by a steel blade under an optical microscope (Olympus BX, Japan).

Relative water content measurements during desiccation

The thalli segments were placed on a wet disc of paper on the bottom of Petri dishes and hydrated. Fully-hydrated segments (*i.e.* those exhibiting maximum individual weight after 24 h - tested on laboratory scales) were let to dry at room temperature (18°C, 40% RH). During desiccation, relative water content (RWC) was evaluated gravimetrically before each measurement of spectral indices: NDVI,

PRI – *see* below. During desiccation, individual samples were weighed on an analytical scales (Mettler, Germany) and RWC calculated according to the equation: $RWC (\%) = [(Fm - Dm) / (Wm - Dm)] * 100$, where Fm is the actual fresh mass (weight) of a sample, Dm is the mass of the fully dry sample (oven-dried sample at 35°C for 24 h), and Wm is the mass of the fully wet sample.

Measurements of spectral reflectance indices

NDVI (normalized difference vegetation index) and PRI (photochemical reflectance index) were measured repeatedly during gradual desiccation from fully wet (RWC = 100%) to dry (RWC = 0%) state. For NDVI measurements, a PlantPen NDVI 300 reflectometer (Photon System Instruments, Czech Republic) was used. For PRI meas-

urements, a PlantPen PRI 200 reflectometer (Photon System Instruments, Czech Republic) was used. Both instruments use particular spectral reflectances (abbreviated R) for calculation of the indices using the following equations:
 $NDVI = (R740 - R660) / (R740 + R660)$,
 $PRI = (R570 - R531) / (R570 + R531)$.

Results and Discussion

Thallus thickness (TT) and the upper cortex thickness (UCT) of the experimental species is summarized in Fig. 2 and Ta-

ble 1. The differences are attributed to species-specific peculiarities of morphology and growth strategy of particular species.

Species	Thalus thickness (TT)		Upper cortex thickness (UCT)	
	average	SD	average	SD
<i>Xanthoria elegans</i>	344.10	±52.30	83.69	±22.93
<i>Rhizoplaca melanophthalma</i>	305.16	±77.63	53.00	±8.68
<i>Physconia muscigena</i>	112.23	±12.78	26.16	±5.93
<i>Leptogium puberulum</i>	323.58	±22.62	79.93	±4.69
	Thickness			
<i>Nostoc commune</i>	39.63	±8.65	-	-

Table 1. Biometrical characteristic of the cross sections of the studied species.

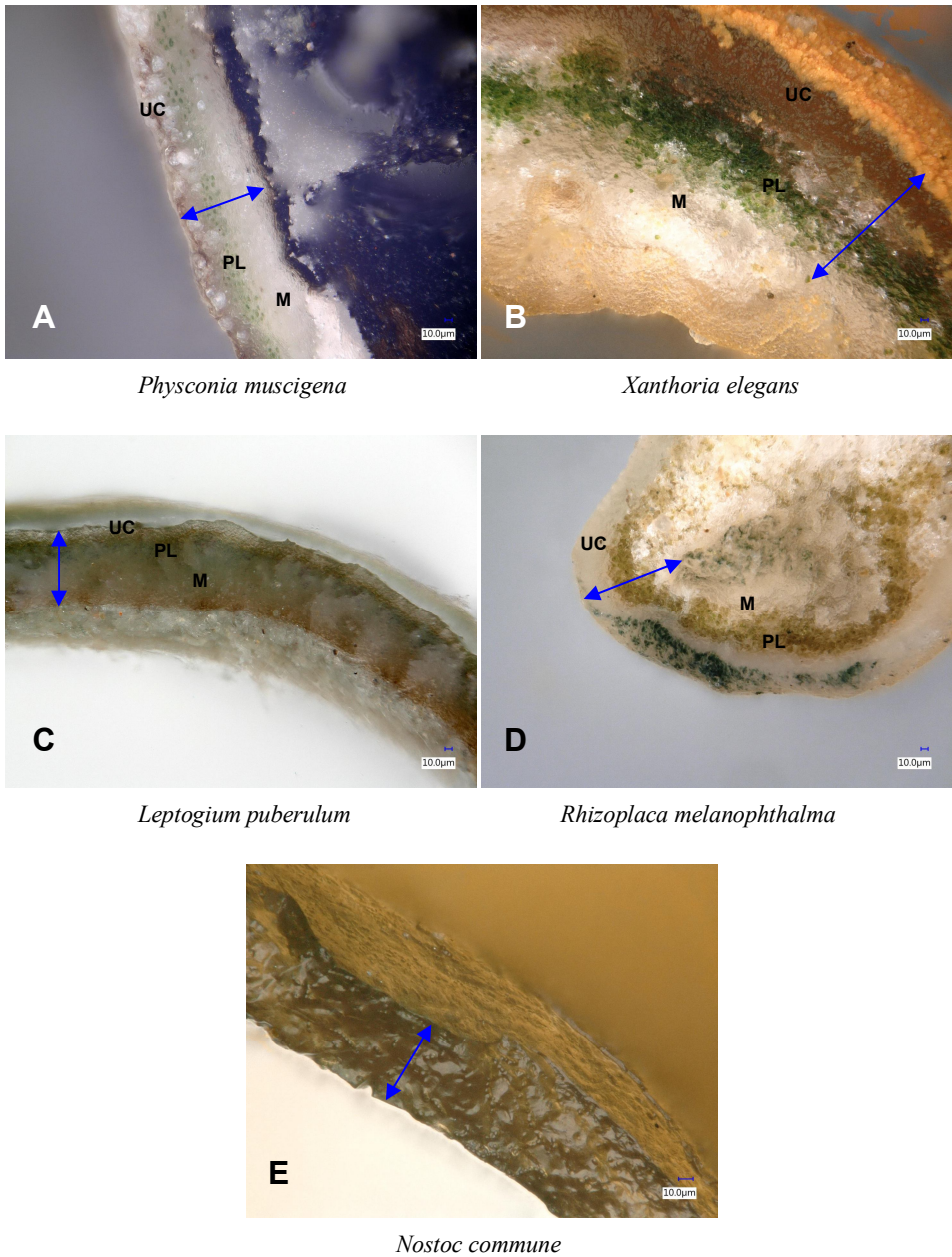


Fig. 2. Thalli cross sections of A - *Physconia muscigena*, B - *Xanthoria elegans*, C - *Leptogium puberulum*, D - *Rhizoplaca melanophthalma*, E - colony of *Nostoc commune* with the indication of thallus thickness (TT - blue line, the arrows indicate the distance between the upper and lower thallus surface). Key to the abbreviations: UC - upper cortex layer, PL - photobiont layer, M - medulla. The photographs were taken by a digital optical microscope Keyence WHX-900 (Japan).

Except of *R. melanophthalma*, removal of the upper cortex led to an increase in NDVI values throughout the whole RWC range (see Fig. 3) in all experimental species. Such response might be attributed to missing absorption in the lichen samples without the upper cortex (*i.e.* scraped out). It is well established that many biomolecules with screening effects of particular wavelengths of solar radiation are located in upper cortex of lichens (Meesen *et al.* 2013). The upper cortex protects the photosynthetic cells of algal/cyanobacterial photobiont located below the upper cortex, slowing evaporation of water from a thallus and filtering harmful or excessive radiation with the assistance of pigments and secondary substances. Amount of secondary metabolites allocated in the upper cortex is species-specific (see *e.g.* Rankovic 2015) and depends on environmental factors, mainly on the availability of light at particular location. It has been shown that the upper cortex thickness increased in lichens highly exposed to sunlight, and even an epinecral layer is formed as protection to high sun exposition in some cases (Büdel 1990, Gaya 2009). Similarly, an increase in the amount of lichen metabolites in the upper cortex have been reported as a part of UV radiation screening system (Beckett *et al.* 2008). High intensity light incident on lichen thallus might induce the synthesis of melanic compounds and other colored metabolites with antioxidative properties. Thickness of the upper cortex and the amount of secondary metabolites located in there may vary even within a single species, and populations grown under different radiation regimen, respectively (Atala *et al.* 2015). Recently, the distribution of secondary metabolites in the upper cortex might be measured by non-invasive methods such as *e.g.* LDI-MSI (Mass Spectrometry Imaging) – Le Pogam *et al.* (2016).

Absence of the upper cortex leads to

changes of optical properties of lichen thallus. In our study, we evaluated spectral reflectance indices in several species during desiccation and estimated the effect of presence/absence of the upper cortex.

Compared to control, PRI did not show any general response in the samples without the upper cortex (Fig. 4). It showed either no change (*X. elegans*), a decrease in the RWC range of 20-100% (*P. muscigena*, *N. commune*), and an increase in *R. melanophthalma* in the RWC range of 10-100%. Since PRI is well related to (1) non-photochemical quenching of access light energy absorbed by photosynthetic pigments in chloroplasts, and (2) the amount of xanthophyll cycle pigments, de-epoxidation of violaxanthin to zeaxanthin via antheraxanthin, in particular, we may conclude that these characteristics are altered in majority of the experimental species after the upper cortex removal.

PRI values measured in control samples corresponded well to the experimental evidence gained for the same species during dehydration from fully wet (RWC = 100%) to dry state (RWC = 0%). In general, the differences found in NDVI and PRI for control samples recorded in wet (RWC = 100%) and dry (RWC = 0%) are comparable to your earlier study (Barták *et al.* 2016). In recent study, absence of the upper cortex led to an increase in NDVI and both increase/ decrease in PRI (see Figs. 3 and 4). The reason for such different response seems not be easily identified. It might be associated with species-specific structure and optical properties of the upper cortex. However, quantitative data on these properties of the experimental species are rather fragmentary. Therefore, there is a need of follow up studies on the optical/spectral properties of the upper cortex of the three species. We may hypothesize, that the absence of the upper cortex may contribute to changed response of the lichen species to dehydration.

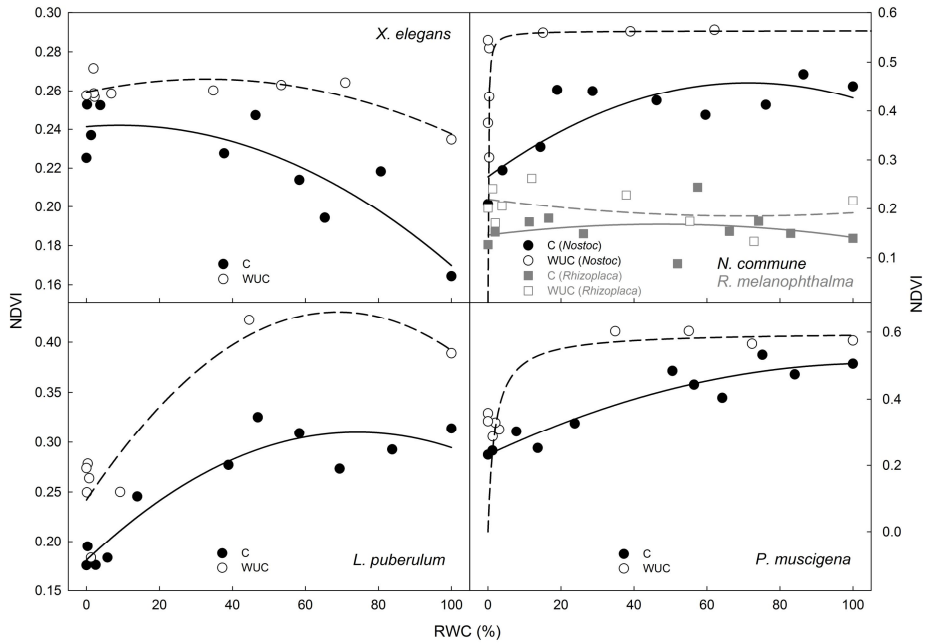


Fig. 3. Normalized difference vegetation index (NDVI) as dependent on the relative water content (RWC) in 5 experimental species. Data points are means of three replicates.

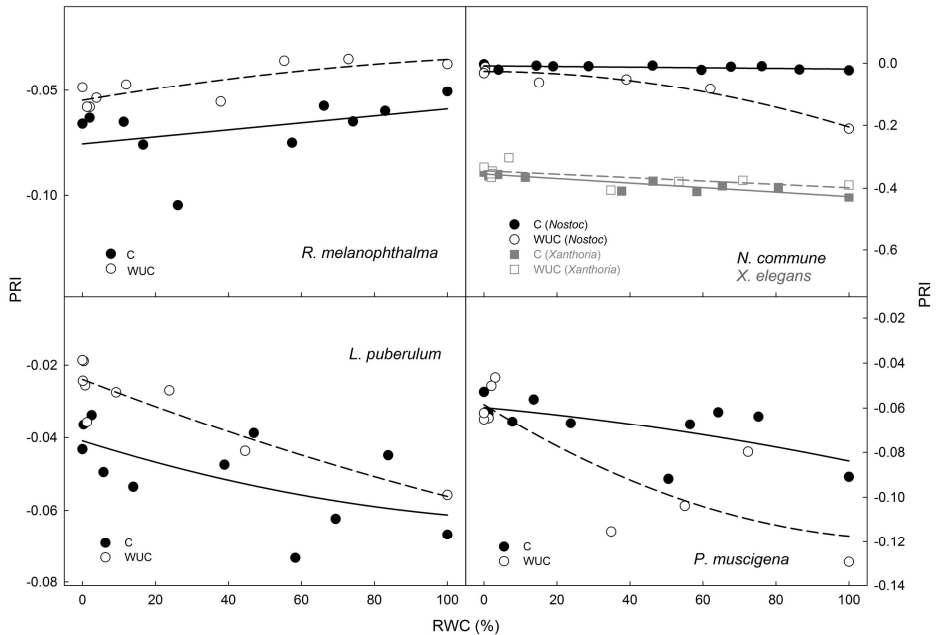


Fig. 4. Photochemical reflectance index (PRI) as dependent on the relative water content (RWC) in 5 experimental species. Data points are means of three replicates.

In *N. commune*, similar response can be expected since Deng *et al.* (2008) reports different ecophysiological properties of the upper layer of *N. sphaeroides* colonies. On the other hand, *N. commune* represents different optical systems than the lichen thalli examined in our study. It is due to the gelatinous matrix of polysaccharides and many

other organic substances in which cells are allocated. Whole system forms a complex sheet-like 3-D structures (Sand-Jensen 2014). Similarly, in *L. puberulum*, optical co-effect of exopolysaccharidic envelopes of individual *N. commune* cells (a photobiont in *L. puberulum*) might be expected.

Concluding remarks

In our study study, we report the changes in NDVI, PRI related to presence/absence of the upper cortex in particular lichens. Removal of the upper cortex led to an increase in NDVI values within the whole range of RWC in desiccating thalli (RWC from 100 to 0 %). Shapes of the NDVI to RWC relationships for particular species (control) and particular NDVI values were comparable to a previous study (Barták *et al.* 2018). The same is true for PRI courses. For *X. elegans*, however,

slightly higher values (about 0.40) were found than in the previous study (about 0.36). In *L. puberulum*, a rapid decrease in PRI was reported by (Barták *et al.* 2018) in the thallus desiccating from 10 to 0% RWC which was not found in our study (*see* Fig. 4). This could be attributed to a high degree of intraspecific variability of ecophysiological characteristics of *L. puberulum* in response to environmental factors.

References

- AGER, C. M., MILTON, N. M. (1987): Spectral reflectance of lichens and their effects on the reflectance of rock substrates. *Geophysics*, 52: 898-906.
- ATALA, C., SCHNEIDER, C., BRAVO, G., QUILODRÁN, M. and VARGAS, R. (2015): Anatomical, physiological and chemical differences between populations of *Pseudocyphellaria flavicans* (Hook. f. & Taylor) Vain. from Chile. *Gayana Botanica*, 72: 21-26.
- BARTÁK, M., TRNKOVÁ, K., HANSEN, E. S., HAZDROVÁ, J., SKÁCELOVÁ, K., HÁJEK, J. and FORBELSKÁ, M. (2015a): Effect of dehydration on spectral reflectance and photosynthetic efficiency in *Umbilicaria arctica* and *U. hyperborea*. *Biologia Plantarum*, 59 (2): 357–65.
- BARTÁK, M., VÁCZI, P., STACHOŇ, Z. and KUBEŠOVÁ, S. (2015b): Vegetation mapping of moss-dominated areas of northern part of James Ross Island (Antarctica) and a suggestion of protective measures. *Czech Polar Reports*, 5 (1): 75-87.
- BARTÁK, M., HÁJEK, J., AMARILLO, A. C., HAZDROVÁ, J. and CARRERAS, H. (2016): Changes in spectral reflectance of selected Antarctic and South American lichens caused by dehydration and artificially-induced absence of secondary compounds. *Czech Polar Reports*, 6(2): 221-230.
- BARTÁK, M., HÁJEK, J., MORKUSOVÁ, J., SKÁCELOVÁ, K. and KOŠUTHOVÁ, A. (2018): Dehydration-induced changes in spectral reflectance indices and chlorophyll fluorescence of Antarctic lichens with different thallus color, and intrathalline photobiont. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40: 177. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2751-3>.
- BECHTEL, R., RIVARD, B. and SANCHEZ-AZOFEIFA, A. (2002): Spectral properties of foliose and crustose lichens based on laboratory experiments. *Remote Sensing of Environment*, 82: 389-396.

- BECKETT, R. P., KRANNER, I. and MINIBAYEVA, F.V. (2008) : Stress physiology and the symbiosis. In: T. H. Nash III (ed.): *Lichen Biology*, Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 134-151.
- BÜDEL, B. (1990): Anatomical adaptations to the semiarid/arid environment in the lichen genus *Peltula*. *Bibliotheca Lichenologica*, 8: 47-61.
- DENG, Z., HU, Q., LU, F., LIU, G. and HU, Z. (2008): Colony development and physiological characterization of the edible blue-green alga, *Nostoc sphaeroides* (Nostocaceae, Cyanophyta). *Progress in Natural Science*, 18: 1475-1483.
- GAYA, E. (2009): Taxonomical Revision of the *Caloplaca saxicola* Group (Teloschistaceae, Lichen-forming Ascomycota). *Bibliotheca Lichenologica*, 101: 1-191.
- GAMON, J.A., FIELD, C.B., BILGER, W., BJÖRKMAN, O., FREDEN, A. and PEÑUELAS, J. (1990): Remote sensing of the xanthophyll cycle and chlorophyll fluorescence in sunflower leaves and canopies. *Oecologia*, 85: 1-7.
- GAMON, J. A., SERRANO, L. and SURFUS, J. S. (1997): The photochemical reflectance index: An optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types and nutrient levels. *Oecologia*, 112: 492-501.
- GARTY, J., WEISSMAN, L., TAMIR, O., BEER, S., COHEN, Y., KARNIELI, A. and ORLOVSKY, L.: (2000): Comparison of five physiological parameters to assess the vitality of the lichen *Ramalina lacera* exposed to air pollution. *Physiologia Plantarum*, 109: 410-418.
- JUPA, R., HÁJEK, J., HAZDROVÁ, J. and BARTÁK, M. (2012): Interspecific differences in photosynthetic efficiency and spectral reflectance in two *Umbilicaria* species from Svalbard during controlled desiccation. *Czech Polar Reports*, 2 (1): 31-41.
- KLEEFELD, A., GYPSER, S., HERPPICH, W. B., BADER, G. and VESTE, M. (2018): Identification of spatial pattern of photosynthesis hotspots in moss- and lichen-dominated biological soil crusts by combining chlorophyll fluorescence imaging and multispectral BNDVI images. *Pedobiologia*, 68: 1-11.
- LE POGAM, P., LEGOUIN, B., GEAIRON, A., ROGNIAUX, H., LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F., OBERMAYER, W., BOUSTIE, J. and LE LAMER, A.-C. (2016): Spatial mapping of lichen specialized metabolites using LDI-MSI: chemical ecology issues for *Ophioparma ventosa*. *Scientific Reports*, 6, Article number: 37807 (2016).
- MARCINKOWSKA-OCHTYRA, A., ZAGAJEWSKI, B., RACZKO, E., OCHTYRA, A. and JAROCIŃSKA, A. (2018): Classification of High-Mountain Vegetation Communities within a Diverse Giant Mountains Ecosystem Using Airborne APEX Hyperspectral Imagery. *Remote Sensing*, 10 (4): 570 (21p).
- MEEBEN, J., SÁNCHEZ, F. J., BRANDT, A., BALZER, E. M., DE LA TORRE, R., SANCHO, L. G., DE VERA, J. P. and OTT, S. (2013): Extremotolerance and Resistance of Lichens: Comparative Studies on Five Species Used in Astrobiological Research I. Morphological and Anatomical Characteristics. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 43 (3): 283-303.
- MORISON, M., CLOUTIS, E. and MANN, P. (2014): Spectral unmixing of multiple lichen species and underlying substrate. *International Journal of Remote Sensing*, 35 (2): 478-492.
- NETA, T., CHENG, Q., BELLO, R. L. and HU, B. (2010): Lichens and mosses moisture content assessment through high - spectral resolution remote sensing technology: a case study of the Hudson Bay Lowlands, Canada. *Hydrological Processes*, 24: 1617-1628.
- PETZOLD, D. E., GOWARD, S. N. (1988): Reflectance spectra of subarctic lichens. *Remote Sensing of Environment*, 24: 481-492.
- RANKOVIC, B. (2015): *Lichen Secondary Metabolites Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential*. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London. 179 p.
- REGAN, S., MATWICHUK, L., CLOUTIS, E., GOLTZ, D. and MANN, P. (2016): Potential signatures of heavy metal complexes in lichen reflectance spectra. *International Journal of Remote Sensing*, 37 (11): 2621-2640.
- SAND-JENSEN, K. (2014): Ecophysiology of gelatinous *Nostoc* colonies: unprecedented slow growth and survival in resource-poor and harsh environments. *Annals of Botany*, 114: 17-33.

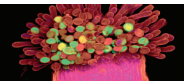
- SINGH, R., RANJAN, S., NAYAKA, S., PATHRE, U. V. and SHIRKE, P. A. (2013): Functional characteristics of a fruticose type of lichen, *Stereocaulon foliosum* Nyl. in response to light and water stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35 (5): 1605-1615.
- VAN DER VEEN, C. J., CSATHO, B. M. (2005): Spectral Characteristics of Greenland Lichens. *Géographie physique et Quaternaire*, 59 (1): 63-73.
- WALKER, D. A., CARLSON, S., FROST, J. J., MATYSHAK, G. V., LEIBMAN, M. E., OREKHOV, P., KHOMUTOV, A., KHITUN, O., ZHURBENKO, M., AFONINA, O. and BARBOUR, E. M. (2011): 2010 Expedition to Krenkel station, Hayes Island, Franz Josef Land, Russia. Alaska Geobotany Center, Institute of Arctic Biology, University of Alaska Fairbanks, 63 p.
- ZHANG, J., RIVARD, B. and SÁNCHEZ-AZOFEIFA, A. (2005): Spectral unmixing of normalized reflectance data for the deconvolution of lichen and rock mixtures. *Remote Sensing of Environment*, 95 (1): 57-66.

Other sources/ Web sources:

- [1] Consortium of North American Lichen Herbaria web page (<http://lichenportal.org/portal/>)
- [2] The lichen herbarium, University of Oslo (<http://nhm2.uio.no/lav/web/index.html>)

Publikace 4 (Příloha 5)

Orekhova A., Barták M., Casanova-Katny A., Hájek J. (2021b) Resistance of Antarctic moss *Sanionia uncinata* to photoinhibition: chlorophyll fluorescence analysis of samples from the western and eastern coasts of the Antarctic Peninsula. *Plant Biology*, 23: 653-663. doi: 10.1111/plb.13270.



RESEARCH PAPER

Resistance of Antarctic moss *Sanionia uncinata* to photoinhibition: chlorophyll fluorescence analysis of samples from the western and eastern coasts of the Antarctic Peninsula

A. Orekhova¹ , M. Barták¹ , A. Casanova-Katny²  & J. Hájek¹ 

¹ Department of Experimental Biology, Division of Plant Physiology and Anatomy, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

² Laboratory of Plant Ecophysiology, Faculty of Natural Resources, Catholic University Temuco, Campus Luis Rivas del Canto, Temuco, Chile

Keywords

Antarctica; chlorophyll fluorescence; moss; photoinhibitory treatment; spectral reflectance.

Correspondence

J. Hájek, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic.
E-mail: jhajek@sci.muni.cz

Editor

J. Sparks

Received: 31 October 2020; Accepted:
5 April 2021

doi:10.1111/plb.13270

ABSTRACT

- Interspecific differences in sensitivity of the Antarctic moss *Sanionia uncinata* from King George Island (KGI) and James Ross Island (JRI) to photoinhibitory treatment were studied in laboratory conditions using chlorophyll fluorescence techniques.
- Slow (Kautsky) and fast (OJIP) kinetics were used for the measurements. Samples were exposed to a short-term (60 min) photoinhibitory treatment (PIT, 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR).
- The photoinhibitory treatment (PIT) led to photoinhibition which was indicated by the decrease in F_V/F_M and Φ_{PSII} in KGI but not in JRI samples. However, this decrease was small and full recovery was reached 90 min after PIT termination. Non-photochemical quenching (NPQ) was activated during the PIT, and rapidly relaxed during recovery. Early stages of photoinhibition showed a drop in F_V/F_M and Φ_{PSII} to minimum values within the first 10 s of the PIT, with their subsequent increase apparent within fast (0–5 min PIT) and slow (5–50 min PIT) phases of adjustment. The PIT caused a decrease in the performance index (Pi_{Abs}), photosynthetic electron transport per reaction centre (RC) (ET_0/RC). The PIT induced an increase in thermal dissipation per RC (DI_0/RC), effectivity of thermal dissipation (Phi_{D_0}), absorption per RC (ABS/RC) and trapping rate per RC (TR_0/RC).
- In conclusion, PIT led to only slight photoinhibition followed by fast recovery in *S. uncinata* from KGI and JRI, since F_V/F_M and Φ_{PSII} returned to pre-photoinhibitory conditions. Therefore, *S. uncinata* might be considered resistant to photoinhibition even in the wet state. The KGI samples showed higher resistance to photoinhibition than the JRI samples.

INTRODUCTION

Photoinhibition of photosynthesis occurs when the light intensity exceeds the capacity/activity of the photosynthetic electron transport chain in the chloroplast apparatus. Such a situation leads to inactivation and damage of the photosynthetic apparatus, photosystem II (PSII) in particular. Indeed, high light causes formation of triplet chlorophyll ($^3\text{Chl}^*$) molecules that react with oxygen and produce singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and other reactive oxygen species (ROS). The ROS interact with components of the reaction centres (RC) of PSII (RC PSII). The interaction leads to damage to the D1 protein and antenna system, which leads to photooxidative destruction of PSII and severe photoinhibition.

During evolution, plants have developed several photoprotective mechanisms against photoinhibition, such as light avoidance through leaf and chloroplast movements, cyclic electron transport around photosystem I (PSI) and photorespiration (Takahashi & Badger 2011). Another mechanism is related to carotenoids that scavenge ROS and are involved in thermal dissipation of absorbed light energy (part of nonphotochemical quenching – NPQ). In mosses, NPQ quenching has been found

to be dependent on desiccation and photoinhibition (Heber *et al.* 2006). Three different components of NPQ are reported (reviewed in *e.g.* Yamakawa *et al.* 2012): (1) a mechanism based on protonation of a thylakoid protein (active in hydrated mosses); (2) exciton migration towards the light-harvesting complexes, where fast thermal dissipation takes place; and (3) reversible photo-accumulation of a radical that acts as a quencher of excitation energy in RC of PSII. Photoinhibition-induced formation of zeaxanthin and consequent energy quenching is another photoprotective mechanism involved in NPQ in mosses (Pinnola *et al.* 2013; Glime 2017).

Mosses from sunny habitats are usually highly light-tolerant (Murray *et al.* 1993). This is because they have a special structure in their molecular photosynthetic apparatus that combines features of vascular plants and those of green algae. Mosses possess two proteins involved in NPQ triggering, *i.e.* ‘plant-type’ light-harvesting complex protein (PsbS) and ‘algal-type’ light-harvesting complex stress-related protein (LHCSR). In mosses, LHCSR and PsbS can migrate between PSII and PSI in order to quench excitation energy (Furukawa *et al.* 2019). Recent studies (*e.g.* Stella 2016; Dikaos *et al.* 2019) confirmed the role of LHCSR proteins in thermal dissipation in

photoinhibited mosses. Other studies, however, suggest that LHCSR proteins may also be active in energy quenching (qE) (Alboresi *et al.* 2010; Gerotto *et al.* 2012).

Mosses from sunny habitats are considered photoinhibition-tolerant/-resistant. Some photoinhibition-sensitive species, however, have been identified (*e.g.* *Pleurozium schreberi* from shade habitats – Hájek *et al.* 2009). The majority of studies focused on photoinhibition in mosses deal with photoprotective mechanisms activated in desiccating mosses (*e.g.* Csintalan *et al.* 1999; Nabe *et al.* 2007), since non-photochemical quenching (qN) mechanisms are also activated by desiccation. Moreover, desiccation represents a serious limitation to moss photosynthesis and biomass production in coastal Antarctica because of environmental warming (Robinson *et al.* 2018). A number of studies, however, have focused on the sensitivity of mosses to photoinhibition in the optimally wet state. These are rather limited and fragmentary (*e.g.* Giudici 2019). A recent field study of moss photosynthesis (Perera-Castro *et al.* 2020) emphasizes the co-effects of light and moss cushion temperature on primary (chlorophyll fluorescence data) and secondary photosynthetic (gas exchange data) processes. Using this approach, these authors evaluated temperature optima for photosynthesis of six Antarctic mosses from King George Island (including *Sanionia uncinata*). They reported a high temperature-induced increase in NPQ. However, they did not consider photoinhibition. Therefore, we focused our attention on time courses of chlorophyll fluorescence (ChlF) parameters (F_V/F_M , Φ_{PSII} , qN and NPQ) during controlled photoinhibition and consequent recovery in wet *S. uncinata*, an Antarctic moss growing in open sunny habitats (Putzke & Pereira 2020). We hypothesized that the resistance of the species to photoinhibition would be high. Therefore, we expected activation of photoprotective mechanisms during controlled photoinhibitory treatment and their fast relaxation to pre-photoinhibitory values during the recovery period (typically within tens of minutes). We also expected different extents of resistance to photoinhibition in the moss samples collected from different sites in maritime Antarctica, *i.e.* King George Island – KGL, James Ross Island – JRI. The capacity of the photoprotective mechanisms, as well as their involvement, might be different in the samples from these two sites because of the differences in seasonal amount of radiation available at each site and local geomorphology, which may protect mosses from direct radiation. Ecophysiological properties of *S. uncinata* have been studied in the field and laboratory; however, current knowledge is still not satisfactory. Photosynthetic processes of the species have been studied in response to light (Uchida *et al.* 2002), UV-B radiation (Lud *et al.* 2003), sugar content (Zúñiga-González *et al.* 2016), desiccation (Pizarro *et al.* 2019) and freezing (Cannone *et al.* 2017). To the best of our knowledge, our study is the first to include analysis of primary photosynthetic processes of the species when undergoing photoinhibition in a hydrated state.

MATERIAL AND METHODS

Species characteristics

Sanionia uncinata is widespread in Arctic polar latitudes and is one of the dominant species in Antarctica (Hedenäs 1989, 2003; Smith 1996; Virtanen *et al.* 1997). The moss forms large carpets

in ice-free zones and is frequently associated with other mosses and lichens (Torres-Mellado *et al.* 2011). *Sanionia uncinata* can tolerate severe dehydration (Pizarro *et al.* 2019), and, thanks to the content of UV-screening compounds and specific secondary metabolites (Newsham *et al.* 2002; Fernandes *et al.* 2015, 2017), it is well adapted to exposure to high UV light (Lud *et al.* 2002).

Sampling sites

Samples of *S. uncinata* were collected from James Ross Island and King George Island (Antarctica). Collection sites were located in (1) Solorina Valley (63°53'01" S, 57°46'48" W) JRI and (2) Collins Bay (62°10'10.4" S, 58°51'13.4" W) KGL. Solorina Valley is formed by sedimentary rocks and the Solorina Valley stream. The locality is rich in moss and lichen vegetation. Within the last three decades, biodiversity studies have been performed here, focused on freshwater diatoms (Kopalová *et al.* 2013), terrestrial algae (Skácelová & Barták 2014), cyanobacteria and lichens (Lewis Smith & Øvstedal 1994) and mosses (BAS moss database - see Antarctic Plant Database in other sources). The microclimate has the following temperature characteristics (measured 2 m above the ground): –33.1 °C (annual minimum), 9.3 °C (annual maximum) and –9.8 °C annual mean (data from Elster *et al.* 2016). Air temperature and humidity measured above moss cushions by sensors linked to a MiniCube VV/VX datalogger (EMS, Brno, CZ) reached: –2.2 °C (austral summer season, September to February), 91% relative air humidity. The second sampling site, Collins Bay is a richly developed Antarctic oasis in the area of the Fildes Peninsula, characterized by oceanic climate conditions, with milder temperatures in contrast to east side of the Antarctic Peninsula. Collins Bay is a green point dominated by mosses and the vascular plant *Deschampsia antarctica*, which has shown a rapid increase in plant population size and number in response to global warming (Torres-Mellado *et al.* 2011). Microclimate characteristics of the site (moss cushion surface) were measured with a HOBO datalogger (OnSet Computers, USA) for 2018–2019; mean annual temperature was –1.0 °C and relative air humidity reached 98.2%.

Evaluation of constitutive pigments

After collection and transfer to a laboratory, the content of photosynthetic pigments was evaluated. The chlorophyll (Chl) *a*, *b* and total carotenoid (Car) concentrations were determined spectrophotometrically (Specord 205; Analytik, Jena, Germany) using the equations of Lichtenthaler & Welburn (1983). Absorbance was measured at 649 and 665 nm and used to determine Chl content and at 470 nm for Car content. Additionally, spectral absorbance curves (190–800 nm) were used for calculation of constitutive amount of UV-B absorbing compounds (according to Newsham 2003). Concentrations of plant UV-B screening compounds were calculated as the area under the absorbance curve in the UV-B spectrum ($AUC_{280-315}$) mg^{-1} dry weight (DW). For the above purposes, the leaves from thallus apices (top 3 mm) were taken for extraction.

Spectral reflectance measurements

Reflectance spectra of *S. uncinata* (range 400–800 nm) were measured using a PolyPen RP 400 UV VIS spectrophotometer

(Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic). Moss samples were measured in the dry and wet state (DRY/WET in the following text). From spectral reflectance data, the photochemical reflectance index (PRI), Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) and several indices (MCARI, MCARI1, SRPI and NPCI, see Table 1 for definitions and equations) were calculated.

Chlorophyll fluorescence measurements

For quantification of photoinhibition effect on PSII, ChlF parameters were measured using an HFC-010 fluorometer (Photon System Instruments, Drásov, Czech Republic) with a customized modification of slow Kautsky kinetics supplemented with quenching analysis. Before the ChlF measurements, dry samples were allowed to rehydrate for 48 h between two sheets of wet filter paper in Petri dishes under dim light at 5 °C. After rehydration, the mosses samples were pre-darkened for 5 min and subjected to measurements of ChlF. The required pre-darkening period had been previously established. A period of 5 min was found to be sufficient, since maximum values of F_V/F_M and Φ_{PSII} (for parameters see below) were reached and did not change with prolongation of the pre-darkening period. For measurements of chlorophyll fluorescence parameters as dependent on photoinhibitory treatment, the method of slow Kautsky kinetics supplemented with quenching analysis was used. This method is described elsewhere (e.g. Barták *et al.* 2004) and consists of measurements of ChlF curves induced by actinic light supplemented with saturating pulses during the period when the actinic light is on (F_M') or off (F_M''), respectively. Using the FluorCam 7 software, maximum photochemical efficiency of PSII (F_V/F_M), effective quantum yield (Φ_{PSII}), minimum fluorescence yield of a dark-adapted sample (F_0) and non-photochemical quenching (NPQ) were calculated. These ChlF parameters were measured and evaluated before, immediately after the photoinhibitory treatment (PIT) (see below) and during recovery (repeatedly at 30-min intervals).

Rapid chlorophyll fluorescence transient

Rapid induction curves of fluorescence of ChlF (OJIP curves) were measured using a FL-100 FluorPen fluorometer (Photon Systems Instruments, Drásov, Czech Republic). Before the measurement, dry samples were allowed to rehydrate for 48 h. After rehydration, the samples were pre-darkened for 5 min before each measurement. To evaluate photoinhibition effects on PSII, the following ChlF parameters were derived from the OJIP data (Strasser *et al.* 2000): (1) F_M/F_0 , (2) Φ_{P_0} , (3) ABS/RC , (4) Φ_{D_0} , (5) Pi_{Abs} , (6) TR_0/RC , (7) ET_0/RC and (8) DI_0/RC ; for definitions and explanation, see Table 1.

Photoinhibitory treatment

Moss samples in the hydrated state were exposed to a high light treatment to induce photoinhibition. The light was provided by a light panel (SL 3500; Photon Systems Instruments, Czech Republic) formed by arrays of high-performance white super-bright LEDs. During the photoinhibitory treatment, moss samples were placed on a Petri dish and irradiated from above, *i.e.* in natural arrangement seen in the field. Short-term high light stress was achieved by exposure of the moss samples to irradiance of $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ for 60 min. During the exposure, the Petri dishes containing mosses were kept on ice to reach a constant low temperature of the thallus (5 °C, checked with a thermocouple).

Early stages of photoinhibition during the treatment

When photoinhibitory treatment ($2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) started, the chlorophyll fluorescence parameters to evaluate the early stage of photoinhibition on the moss sample were measured with a PAM 2000 fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) using the repeated saturation pulse method. Effective quantum yield (Φ_{PSII}), steady-state chlorophyll fluorescence (F_S) and non-photochemical quenching (qN) were measured during this treatment. The first measurements of Φ_{PSII} , F_S and qN were taken after 10 s, then at 30-s intervals for 2 h of the

Table 1. Definitions of spectral reflectance indices and OJIP-derived parameters used in this study, with sources of the equations for particular indices.

Indices	Equation	Reference
Normalized Difference Vegetation Index (NDVI)	$NDVI = (R_{NIR} - R_{RED}) / (R_{NIR} + R_{RED})$	Rouse <i>et al.</i> (1974)
Photochemical Reflectance Index (PRI)	$PRI = (R_{531} - R_{570}) / (R_{531} + R_{570})$	Gamon <i>et al.</i> (1992)
Modified Chlorophyll Absorption in Reflectance Index (MCARI)	$MCARI = [(R_{700} - R_{670}) - 0.2 \times (R_{700} - R_{550})] \times (R_{700}/R_{670})$	Daughtry <i>et al.</i> (2000)
Modified Chlorophyll Absorption in Reflectance Index 1 (MCARI1)	$MCARI1 = 1.2 \times [2.5 \times (R_{790} - R_{670}) - 1.3 \times (R_{790} - R_{550})]$	Haboudane <i>et al.</i> (2004)
Simple Ratio Pigment Index (SRPI)	$SRPI = R_{430}/R_{680}$	Peñuelas <i>et al.</i> (1995)
Greenness Index (G)	$G = R_{554}/R_{677}$	Smith <i>et al.</i> (1995)
Normalized Pigment Chlorophyll Index (NPCI)	$NPCI = (R_{680} - R_{430}) / (R_{680} + R_{430})$	Peñuelas <i>et al.</i> (1994)
Ratio of maximum to minimum fluorescence (F_M/F_0)	F_M/F_0	van Kooten & Snell (1990)
Maximum quantum yield for primary photochemistry (Φ_{P_0})	$\Phi_{P_0} = TR_0/ABS = [1 - (F_0/F_M)]$	Strasser <i>et al.</i> (2004)
Quantum yield of energy dissipation (Φ_{D_0})	$\Phi_{D_0} = 1 - \Phi_{P_0} = F_0/F_M$	Strasser <i>et al.</i> (2004)
Potential for energy conservation from exciton to reduction of intersystem electron acceptors (Pi_{Abs})	$Pi_{Abs} = (RC/ABS)[\Phi_{P_0}/(1 - \Phi_{P_0})] [\Psi_{Si_0}/(1 - \Psi_{Si_0})]$	Strasser <i>et al.</i> (2004)
ABS/RC absorbed energy per reaction centre	$ABS/RC = M_0(1/V_j)(1/\Phi_{P_0})$	Strasser <i>et al.</i> (2004)
Trapped energy flux per RC (Ψ_{Si_0}) (TR_0/RC)	$TR_0/RC = M_0(1/V_j)$	Strasser <i>et al.</i> (2004)
Electron transport flux per RC (ET_0/RC)	$ET_0/RC = M_0(1/V_j)\Psi_{Si_0}$	Strasser <i>et al.</i> (2004)
Dissipated energy flux per RC (DI_0/RC)	$DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$	Strasser <i>et al.</i> (2004)

photoinhibitory treatment. Finally, Φ_{PSII} , F_S and q_N were plotted against time and the time courses analysed.

Statistical analysis

If not stated otherwise, the differences for particular parameters between sample locations (KGI, JRI) and treatments (WET, DRY) were evaluated using Student *t*-test and a pair test the equal variance, considering $P < 0.05$.

RESULTS

Evaluation of constitutive amount of pigments

The Chl *a* and Chl *b* contents were higher in the KGI than in JRI samples, however the difference was not statistically significant (Table 2). The total chlorophyll (Chl *a* + *b*) content was significantly higher in *S. uncinata* from KGI than in JRI samples (by 18.4%). Total chlorophyll content in our samples corresponded to previous data (Barcikowski & Loro 1999) from *S. uncinata* collected near to the Polish Antarctic Station Arcowski (for more details, see Discussion). The Chl *a/b* ratio was 1.20 times higher in *S. uncinata* from JRI than from KGI. Carotenoid content (Car) as well as the Car/Chl(*a* + *b*) ratio were not statistically different in the KGI and JRI samples. Our data, however, suggest a low amount of constitutive UV-screening compounds in both KGI and JRI samples; however, these

Table 2. Constitutive content of chlorophylls and carotenoids in *Sanionia uncinata* from King George (KGI) and James Ross Island (JRI).

pigment content, mg·g ⁻¹ DW	KGI	JRI
Chl <i>a</i>	0.885 ± 0.070 ^a	0.809 ± 0.068 ^a
Chl <i>b</i>	0.857 ± 0.105 ^a	0.658 ± 0.112 ^a
Chl <i>a</i> + <i>b</i>	1.742 ± 0.155 ^a	1.467 ± 0.178 ^b
<i>a/b</i>	1.039 ± 0.099 ^a	1.248 ± 0.108 ^a
Car	0.291 ± 0.035 ^a	0.271 ± 0.013 ^a
Car/Chl (<i>a</i> + <i>b</i>)	0.167 ± 0.017 ^a	0.186 ± 0.016 ^a
AUC _(280–315) g ⁻¹ DW	0.625 ± 0.089 ^a	0.465 ± 0.088 ^b

Data are mean of five replicates ± SD. The upper letters indicate statistically significant differences for individual parameters between samples from King George Island (KGI) and James Ross Island (JRI).

Table 3. Spectral reflectance indices in *Sanionia uncinata* evaluated for wet and dry (WET/DRY) states.

indices	KGI		JRI	
	DRY	WET	DRY	WET
NDVI	0.58 ± 0.03 ^a	0.57 ± 0.05 ^a	0.59 ± 0.04 ^a	0.64 ± 0.03 ^a
MCARI1	0.46 ± 0.08 ^a	0.31 ± 0.06 ^b	0.46 ± 0.05 ^a	0.39 ± 0.04 ^b
G	1.37 ± 0.18 ^a	1.52 ± 0.15 ^a	1.68 ± 0.24 ^a	1.98 ± 0.25 ^a
MCARI	0.17 ± 0.03 ^a	0.23 ± 0.06 ^a	0.20 ± 0.03 ^a	0.27 ± 0.04 ^b
SPRI	0.47 ± 0.05 ^a	0.53 ± 0.09 ^a	0.54 ± 0.05 ^a	0.58 ± 0.06 ^a
PRI	-0.15 ± 0.03 ^a	-0.13 ± 0.01 ^b	-0.10 ± 0.04 ^a	-0.06 ± 0.02 ^a
NPCI	0.37 ± 0.04 ^a	0.31 ± 0.08 ^a	0.30 ± 0.04 ^a	0.27 ± 0.05 ^a

Data are mean of 12 replicates ± SD. The upper letters indicate statistically significant differences for individual indices measured for dry (DRY) and wet (WET) states.

differed between the KGI and JRI samples: AUC_{280–315} was 1.36 times higher for KGI than for JRI samples.

Spectral reflectance indices

Among the evaluated spectral reflectance indices (see Table 3), MCARI1 and MCARI were the most sensitive because they showed the highest differences between DRY and WET states. We also observed dehydration-induced changes in the PRI (a decrease in dry state) and Normalized pigment chlorophyll index (NPCI, an increase in dry state). The NDVI only showed insignificant differences between the DRY and WET state in *S. uncinata*.

Spectral reflectance curves (Fig. 1) were more or less linear within the range 370–500 nm, followed by a slight increase, which was the same in both wet and dry samples. Local peaks were apparent at 550 and 640–650 nm. A red-edge increase in spectral reflectance was found at wavelengths above 680 nm. Both in KGI and JRI samples, hydrated moss samples had lower reflectance values than in the dry state.

Responses to photoinhibition

Kautsky kinetics and related parameters

The ChlF parameters sensitively reflected photoinhibition-induced changes occurring in the structure and function of PSII (Fig. 2). They also responded to consequent recovery very sensitively. In *S. uncinata* from KGI, values of F_V/F_M and Φ_{PSII} showed photoinhibition-induced decrease and fast recovery (see upper panels in Fig. 2); this recovery was completed 90 min after the photoinhibitory treatment. For samples from JRI, however, F_V/F_M and Φ_{PSII} did not show such responses, which may indicate higher resistance to photoinhibition than in KGI samples. However, F_V/F_M and Φ_{PSII} values before photoinhibition were higher in *S. uncinata* from KGI than in *S. uncinata* from JRI. Thus, it might be concluded that *S. uncinata* is highly resistant to photoinhibition in the fully hydrated state (for more details, see Discussion).

Minimum fluorescence after dark adaptation (F_0) increased within 60 min after the PIT in *S. uncinata* from KGI, followed by a decrease during the recovery time. In *S. uncinata* from JRI, F_0 did not change during the experiment. The NPQ peak initially rose immediately after high light treatment in *S. uncinata* from KGI, which was followed by a decline to pre-

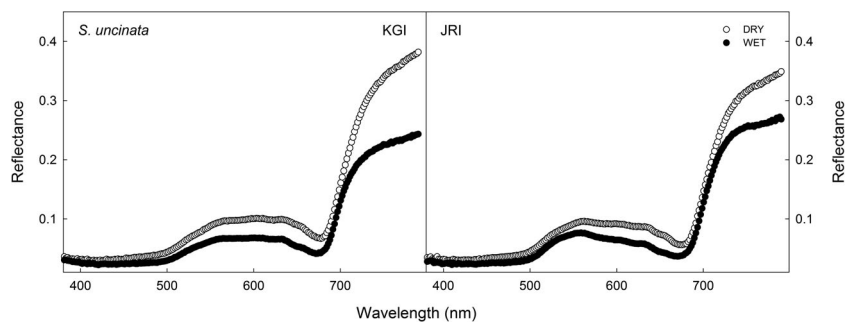


Fig. 1. Spectral reflectance curves (mean of 12 replicates) measured in the wavelength range 400–800 nm in dry and wet *Sanionia uncinata*. KGI – King George Island, JRI – James Ross Island.

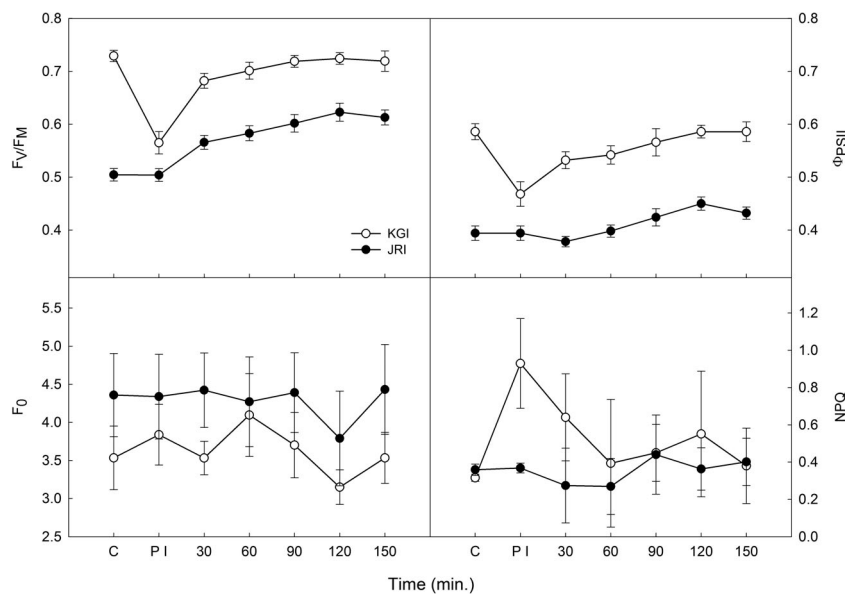


Fig. 2. Time courses of chlorophyll fluorescence parameters recorded during 150-min recovery period after photoinhibition ($2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR for 1 h) in *Sanionia uncinata*. Data points represent means of five replicates \pm SD. The KGI and JRI data are statistically significantly different (*t*-test, $P < 0.05$). F_v/F_m , potential yield of photochemical photosynthetic processes in PSII; Φ_{PSII} , effective yield of photochemical photosynthetic processes in PSII; NPQ, non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence; KGI, King George Island; JRI, James Ross Island.

photoinhibitory values after a 60-min recovery; after which NPQ showed a slight increase and decrease, finally reaching steady-state levels (after 150 min recovery). In contrast, in *S. uncinata* from JRI, NPQ remained almost unchanged after the photoinhibitory treatment and showed continuous slight decline in the time of recovery.

Effects on OJIP-derived parameters

Photoinhibitory treatment (PIT) led to changes in the OJIP curve shape, particularly relative increase in the J and I points on the OJIP curves (Fig. 3). After a 150-min recovery, however, the ChlF levels at the J and I points showed partial recovery to pre-photoinhibitory values. The PIT led to decreases of many ChlF parameters derived from OJIPs (see Fig. 4), such as the Performance index (Pi_Abs), ET_0/RC – photosynthetic electron transport per RC. Negative changes resulted in an increase in DI_0/RC – thermal dissipation per RC, Φ_{D_0} – effectivity of thermal dissipation, ABS/RC – absorption per RC and TR_0/RC – trapping rate per RC. All parameters showed partial recovery,

however Pi_Abs and ET_0/RC remained inhibited even after a 150-min recovery.

Early stages of photoinhibition

Within the first 10 s of the PIT, Φ_{PSII} dropped from the pre-photoinhibitory value (KGI: 0.62, JRI: 0.58) to minimum of about 0.1 (Fig. 5). With the duration of PIT, Φ_{PSII} increased in the KGI samples in a curvilinear manner for the first 4 min and then remained more or less constant, with a slight decrease towards the end of the PIT interval. The JRI samples, however, showed only a limited increase to about 0.16, which remained unchanged during the PIT time. The rate of Φ_{PSII} increase from the early minimum recorded within the first 5 min of the PIT differed between the KGI and JRI samples (see inset in Fig. 5 and slopes); KGI samples had a higher rate (0.190) of Φ_{PSII} increase than JRI samples (0.075). Such dynamic changes found within the first 5 min of PIT were accompanied by an increase in qN, which was activated faster and to a higher

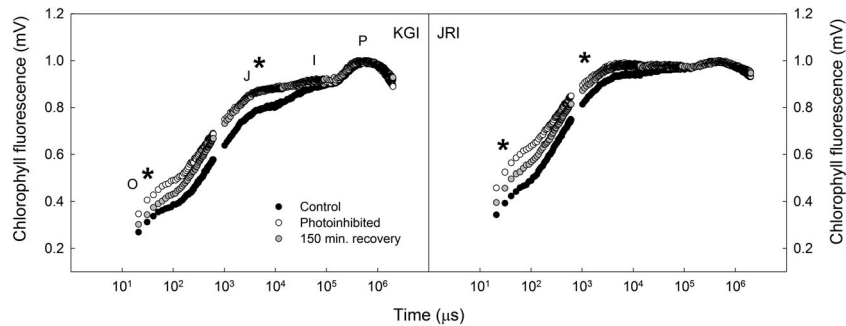


Fig. 3. Fast chlorophyll fluorescence transients (OJIPs, mean of five replicates) measured before, immediately and during recovery after photoinhibition (normalized data to maximum fluorescence reached at F_p point). KGI, King George Island; JRI, James Ross Island. The most sensitive parameters to photoinhibition are indicated by '**'. *

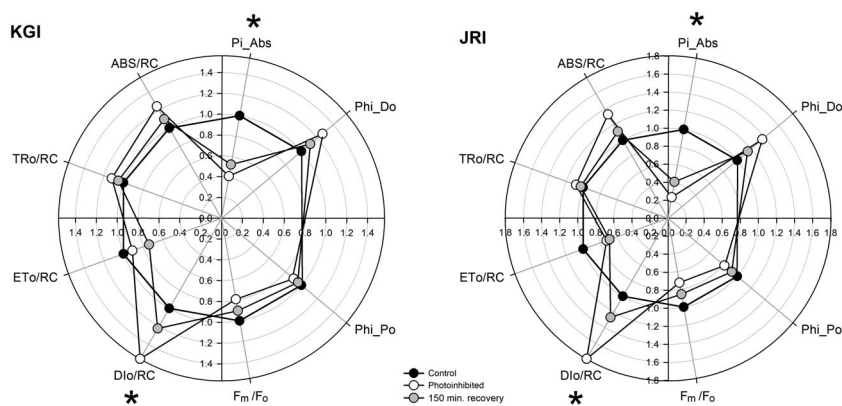


Fig. 4. Radial plot of fast chlorophyll fluorescence-derived parameters measured before, immediately after photoinhibitory treatment and after 150-min recovery. The parameters (mean of five replicates) are (1) Pi_Abs , potential for energy conservation from exciton to reduction of intersystem electron acceptors; (2) Φ_{Do} , quantum yield of energy dissipation; (3) Φ_{Po} , probability that a trapped exciton is used for electron transport beyond Q_A ; (4) F_m/F_o , ratio of maximum to minimum chlorophyll fluorescence after dark adaptation; (5) Di_0/RC , flux of dissipated excitation energy; (6) ET_0/RC , electron transport rate per RC; (7) TR_0/RC , trapped energy flux per RC; and (8) ABS/RC , number of active PSII per reaction centre. KGI, King George Island; JRI, James Ross Island. KGI and JRI data are statistically significantly different (t -test, $P < 0.05$).

extent in the KGI than the JRI samples. Similarly, F_S decreased in the KGI samples faster than in JRI samples during the PIT.

DISCUSSION

Photosynthetic pigments

Quantification of chlorophyll provides important information about the effects of the environment on mosses, in particular the effects of the prevailing light intensities. Mosses from shade habitats have a higher total chlorophyll content than those from open sites (Marschall & Proctor 2004; Soriano *et al.* 2019). Our data on $Chl(a+b)$ are, however, slightly below the range reported by Barcikowski & Loro (1999): 3.4–6.2 $mg \cdot g^{-1}$ DW for maximum chlorophyll content found in species within a growing season. However, the minimum Chl content reported by the same authors is comparable to our data (1.8 and 1.4 $mg \cdot g^{-1}$ DW). In general, total chlorophyll content in mosses shows large interspecific differences related to the prevailing light environment: Marschall & Proctor (2004) reported species with low (high

light-grown *Aulacomnium palustre*, 0.54 $mg \cdot g^{-1}$ DW) and high total chlorophyll content (low light-grown *Fissindens* sp., 4.04 $mg \cdot g^{-1}$ DW). In most cases, however, total chlorophyll content varies between 1.0 and 2.9 $mg \cdot g^{-1}$ DW (Song *et al.* 2012). Total chlorophyll may even exceed 5.0 $mg \cdot g^{-1}$ DW, according to Marschall & Proctor (2004). Our data, however, suggest that *S. uncinata* from KGI and JRI was adapted to high light because it had generally a low total chlorophyll content (Chl $a+b$). Indeed, the sites of collection at KGI and JRI were open habitats with no shading by the microrelief or by stones and boulders (M. Barták, personal observation). On the other hand, the Chl a/b ratio was 1.20 times higher in *S. uncinata* from JRI than from KGI, which might be attributed to the different radiation regimens of the two islands: JRI has fewer overcast days than KGI (177 versus 294 days, as calculated from the Meteoblue datasets: source <https://www.meteoblue.com/en/weather/historyclimate/climatemodelled/>). The differences in Chl a/b fit the concept of Hájek *et al.* (2009), who reported higher Chl a/b in shaded *Sphagnum magellanicum* and *S. angustifolium* than in the same two species from open habitats.

The UV-B absorbing compounds

The UV absorption spectrum peaked at 206–208 nm, which is consistent with the very well-established fact that Antarctic bryophytes synthesize UV-B-absorbing compounds, which are localised in their cells and cell walls (Waterman *et al.* 2018). Several compounds can be considered in this range, such as phenolics and flavonoids that are highly abundant in *Bryum* sp. (Waterman *et al.* 2017, 2018), as well as kaempferol (Núñez-Olivera *et al.* 2010) or luteolin. The latter two are, however, reported for *Bryum* sp. but not for *S. uncinata*. High levels of UV-B absorbing compounds are induced by ozone hole events in the Antarctic (September–November) and are accompanied by high constitutive amounts of carotenoids (Newsham *et al.* 2002) and antioxidants such as phenolics (Fernandes *et al.* 2011).

In *S. uncinata*, the range in concentrations of UV-B-absorbing compounds was reported by Newsham *et al.* (2002): 1.2–2.4 AUC_(280–315) g⁻¹ DW. We can, therefore, conclude that *S. uncinata* from KGI (0.625 ± 0.089) and JRI (0.465 ± 0.088) contained lower amounts of UV-B absorbing compounds than those reported in Newsham *et al.* (2002). However, the KGI samples had significantly higher AUC_(280–315) than the JRI samples. This difference might be attributed to different UV-B doses incident on terrestrial ecosystems at KGI and JRI during the ozone hole period, *i.e.* September to December 2018 (according to the Atmosphere Monitoring Service; see Copernicus in other sources). Another co-acting factor could be that, thanks to a generally wetter climate during the austral summer season at KGI, mosses remain hydrated and thus physiologically active for a longer time than at JRI. The likely explanation is that the KGI samples had a longer period available for synthesis of UV-B screening compounds, while the JRI samples remained mainly desiccated, with either low or no synthesis of UV-B absorbing compounds.

Spectral reflectance

Spectral reflectance curves showed a difference between the moss WET and DRY states: WET spectra reached lower values than DRY spectra. This difference was, however, not very large and the largest difference was only reached at wavelengths above 700 nm. However, spectral reflectance parameters differed between DRY and WET states. NDVI was lower in DRY than in WET state, which corresponds to earlier findings of May *et al.* (2018) and Orekhova and coworkers, personal communication. For *Sanionia* sp., there was an increase in NDVI values with increasing intrathalline water content (Valøen 2019). A similar response was found for NDVI in *Pleuroosium* sp. and *Sphagnum* sp. (van Gaalen 2005) and in moss-dominated biological soil crusts (Fang *et al.* 2015). The photochemical reflectance index (PRI) was lower in the DRY than in the WET state in *S. uncinata*, similar to the evidence reported by Varela *et al.* (2013), who studied seasonal changes and reported a lower PRI in spring/summer (dry period) than in winter (wet period). In mosses, however, both increases and decreases of PRI are reported for the DRY state (Lovelock & Robinson 2002; van Gaalen 2005). Higher PRI values with ongoing desiccation are related to dehydration-induced activation of xanthophyll cycle pigment conversion and are known for mosses and lichens. MCARI and MCARI1 responded sensitively to the WET/DRY state and might be considered indicators of water status, similar

to suggestions in an earlier study of Antarctic mosses (Orekhova and coworkers, personal communication: *Bryum pseudotriquetrum*, *Brachythecium austro-glareosum*).

Photoinhibition and recovery

Photoinhibition after photoinhibitory treatment was indicated by decreases in F_V/F_M and Φ_{PSII} in KGI but not in JRI samples. However, the decreases were generally low and full recovery was reached 90 min after termination of the PIT. These results indicate that primary photosynthetic processes in well-hydrated *S. uncinata* are resistant to photoinhibition. During the PIT, photoprotecting mechanisms were activated, as shown by the rapid increase in NPQ (see Fig. 2 for KGI samples and qN in Fig. 5). NPQ values in photoinhibited mosses in the wet state are dose-dependent (Marschall & Proctor 2004 for *Polytrichum formosum*; Giudici 2019 for *P. commune*).

Since the PIT induced an increment in NPQ and fast (60 min recovery) relaxation to pre-photoinhibitory values in KGI samples (see Fig. 2), we assume that the natural (constitutive) capacity of processes forming NPQ was sufficiently high to cope with photoinhibition-induced changes in PSII. In mosses under photoinhibitory stress, NPQ increases, as do three components forming qN, *i.e.* qE (energy-dependent quenching), qI (photoinhibitory quenching) and qT (transitory quenching). The first (qE) is associated with the violaxanthin to zeaxanthin transformation and thermal dissipation, while the other two (qI and qT) are associated with conformational changes in LHC and PSII structure and spill-over (*i.e.* state1 to state 2 transition). Involvement of specific qN components in photoinhibition of a moss in the wet state is not well understood because most studies combine photoinhibition with desiccation stress. Only a limited number of studies have focused on wet state photoinhibition in mosses. A recent study of Giudici (2019) suggests that qE is a fast-activated and rapidly reversible component. For elucidation of the proportion of qE/qI and qI, however, further experimental evidence is needed.

Experimental PIT led to only slight photoinhibition of F_V/F_M and Φ_{PSII} and fast recovery after 90 min in *S. uncinata* from KGI and JRI. This indicated high resistance of this species to photoinhibition. When considering increases in F_V/F_M and Φ_{PSII} during the recovery period, this was faster in KGI than in JRI samples, suggesting that *S. uncinata* from KGI was more resistant to photoinhibition. This is supported by the fact that F_0 was generally higher in JRI than in KGI samples (see Fig. 2), indicating a higher level of stress in the light harvesting complexes (Hong & Xu 1999) of JRI samples. Generally, both KGI and JRI samples showed high resistance as the shape of the slow Kautsky kinetics was almost the same in both control and photoinhibited samples (data not shown). In the slow Kautsky kinetics, there was hardly any photoinhibition-induced curve flattening as reported for strongly photoinhibited lichens/mosses (*e.g.* Barták *et al.* 2012 for *Usnea antarctica*; Giudici 2019 for mosses – unpublished data). Such resistance is associated with effective protective mechanisms in the mosses, particularly non-photochemical quenching and underlying mechanisms (for review see Robinson & Waterman 2014). Protein-associated quenching is one such mechanism. In the photosynthetic apparatus of mosses, both PsbS and Light Harvesting Complex Stress-Related proteins (LHCSR) are expressed during high light stress and are active in non-

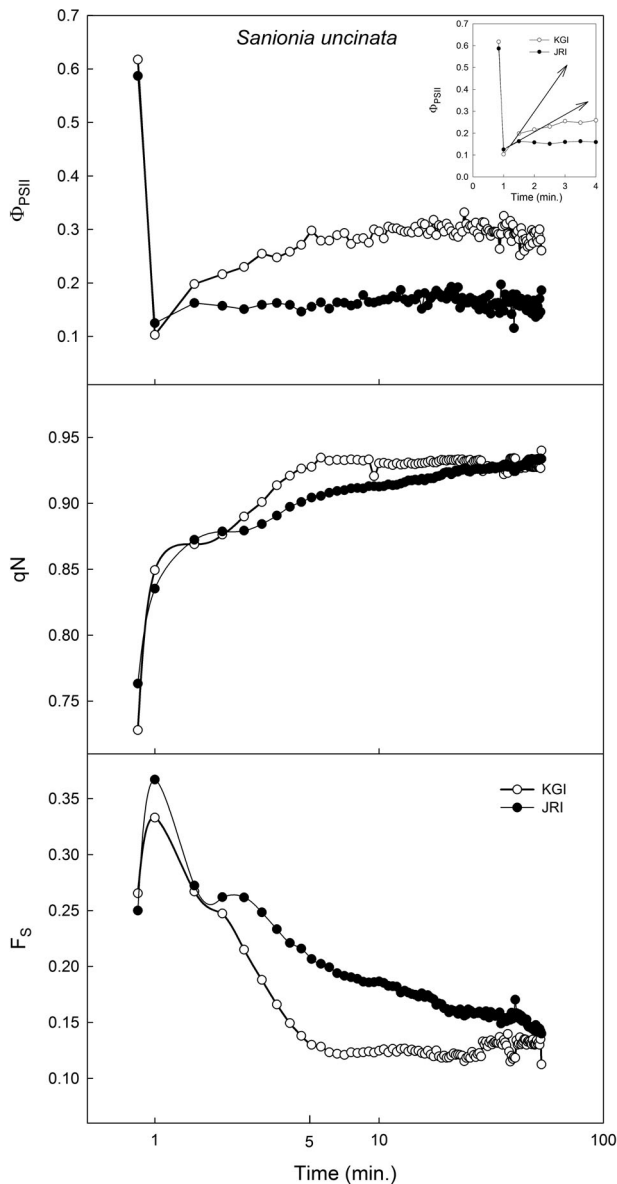


Fig. 5. Response of chlorophyll fluorescence parameters (Φ_{PSII} – effective yield of photochemical photosynthetic processes in PSII, F_s , steady-state chlorophyll fluorescence; q_N , non-photochemical quenching) to photoinhibitory treatment ($2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR for 1 h) measured simultaneously during photoinhibitory treatment. Data points are mean of five replicates. KGI and JRI data are statistically significantly different (t -test, $P < 0.05$). Inset: Time in logarithmic expression. KGI, King George Island; JRI, James Ross Island.

photochemical quenching (Alboresi *et al.* 2011; Gerotto *et al.* 2012). PsbS is associated mainly with the qE component of NPQ (Niyogi *et al.* 2005). Recently, high light stress was studied in *Physcomitrella patens* using *in vitro* spectroscopic and quenching characteristics (Stella 2016), where the LHCSR1 protein was found to be involved in thermal dissipation.

Effects on OJIPs and derived parameters

Photoinhibitory treatment caused a decrease in overall functioning of the photosynthetic apparatus of both KGI and JRI

samples, followed by a slight recovery, as demonstrated by the performance index (see Pi_Abs in Fig. 4). Pi_Abs responds sensitively to various stress conditions (*e.g.* Strasser *et al.* 2004) including temperature (Bednařiková *et al.* 2020) and high light (Yao *et al.* 2017) stress. A photoinhibition-induced decrease in Pi_Abs is a universal response in plants exposed to a photoinhibitory treatment (*e.g.* Živčák *et al.* 2014), including Antarctic autotrophs (Barták *et al.* 2003; Barták *et al.* 2006; Barták *et al.* 2012). In our study, both KGI and JRI samples showed high light-induced increases in thermal dissipation (DI_0/RC) as well as decreases in photosynthetic electron transport (ET_0/RC), which are associated with increased involvement of photoprotective mechanisms, particularly thermal dissipation. Indeed, effectivity of thermal dissipation increased after PIT more in JRI than KGI samples (*cf.* Φ_{D_0} in Fig. 4). Figure 3 shows that chlorophyll fluorescence increased at points O and J, which is associated with relatively higher emission of fluorescence from LHCI complexes (compared to control) and is related to detachment LHCs from RC of PSII and inhibition of electron transport from OEC toward the PQ pool (Yamane *et al.* 2000).

Photoinhibitory treatment led to increased values of TR_0/RC and ABS/RC , which is consistent with the fact that the number of functioning PSII reaction centres decreased after PIT. However, those RCs that remained active, *i.e.* capable of electron transfer to the primary acceptor Q_a , worked at higher efficiency. The increase in TR_0/RC and ABS/RC has also been reported for other stressors, such as salt and drought stress (Killi & Haworth 2017). Specifically, for photoinhibition, increases in TR_0/RC and ABS/RC are reported for Antarctic lichens in the genus *Usnea* (Balarinová *et al.* 2014). Generally, PIT leads to an increase in the number of inactive, *i.e.* Q_B -non-reducing RCs (Vredenberg *et al.* 2006), similarly to other stressors such as temperature (Mathur *et al.* 2011) and osmotic (Singh-Tomar *et al.* 2012) stress. In our study, analysis of OJIPs and OJIP-derived parameters revealed that wet *S. uncinata* shows a high degree of resistance to photoinhibition, since there was only minor photoinhibition-induced flattening of OJIPs (data not shown) and most ChlF parameters derived from OJIPs showed fast partial recovery. Based on OJIP parameter analysis, the PSII of samples from KGI were found to be more resistant to photoinhibition than those of JRI, because Pi_Abs and ET_0/RC decreased to a lesser extent in KGI samples (immediately after PIT, and also after 150 min recovery). The Pi_Abs and ET_0/RC data presented in Fig. 4 provide a 'KGI/JRI' ratio of 1.7 (for Pi_Abs) and 1.3 (ET_0/RC), 1.3 (for Pi_Abs) and 1.1 (ET_0/RC) for samples measured immediately after photoinhibition and after 150 min recovery, respectively. This supports the idea of higher resistance of PSII to photoinhibition in KGI than in JRI samples.

Early stages of photoinhibition

In laboratory-based studies, photoinhibition is typically measured as a decrease in F_V/F_M or Φ_{PSII} from control values (before PIT), and the value reached immediately after treatment (typically 30 min, 60 min; Barbato *et al.* 2020; Barták *et al.* 2012). Behaviour of these two parameters during the PIT, however, has received much less attention. In our data, as well as in our previous studies on vascular plants and lichens (unpublished), several phases of adjustment of PSII

to high light stress can be distinguished. First, there was a drop to minimum values within the first 10 s of PIT (phase 1); then there was a positive adjustment as an increase in F_V/F_M and Φ_{PSII} is apparent in both fast (phase 2, 0–5 min of PIT) and slow (phase 3, 5–50 min) part. Phase 2 can be attributed to rapidly activated photoprotective mechanisms leading to increased NPQ (Barták *et al.* 2003), while phase 3 relates to processes (mostly biochemical) ensuring an equilibrium between photochemical and biochemical processes of photosynthesis. Within phase 3, there was a slightly decreasing trend in Φ_{PSII} both in KGI and JRI samples. In our data, the rate of adjustment of Φ_{PSII} in phase 2 was much faster in samples from King George Island (KGI) than from James Ross Island (JRI), suggesting that resistance to high light stress of the KGI samples was higher.

CONCLUSION

Short-term PIT in well-hydrated *S. uncinata* caused only a limited decline in photosynthetic parameters (F_V/F_M and Φ_{PSII}). The extent of which differed between samples from KGI and JRI. Rapid recovery was apparent in both parameters within 2 h after the termination of PIT. Together with short-term involvement of photoprotective mechanisms (NPQ) during treatment and consequent recovery, our data suggest that *S. uncinata* is highly resistant to photoinhibition in the wet state. Some chlorophyll fluorescence parameters related exclusively to PSII functioning (OJIP-derived parameters), however,

require > 2 h to recover. Among these, thermal dissipation from PSII showed incomplete recovery, which indicates that at least some photoprotective mechanisms remain active even after a 2-h recovery.

In this study, we compared several chlorophyll fluorescence parameters in *S. uncinata* the KGI and JRI when exposed to PIT. The parameters related to slow Kautsky kinetics, quenching analysis, as well as the fast chlorophyll fluorescence curve (OJIP and OJIP-derived parameters) indicated higher resistance of *S. uncinata* from KGI than from JRI. We therefore conclude that, although moss samples from both localities might be considered highly resistant to photoinhibition, the KGI samples had higher resistance to photoinhibition than the JRI samples.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the projects ECOPOLARIS (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001708) and CzechPolar-I, II (LM2010009 and LM2015078) for providing facilities and infrastructure used in the research reported here, and INACH RT_2716 for the field campaign logistic support during the Antarctic Scientific Expedition in 2019. The support from ARCTOS MU project during manuscript writing is acknowledged.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Alboresi A., Gerotto C., Cazzaniga S., Bassi R., Morosinotto T. (2011) A red-shifted antenna protein associated with photosystem II in *Physcomitrella patens*. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 28978–28987.
- Alboresi A., Gerotto C., Giacometti G.M., Bassi R., Morosinotto T. (2010) *Physcomitrella patens* mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, **107**, 11128–11133.
- Balarinová K., Barták M., Hazdrová J., Hájek J., Jílková J. (2014) Changes in photosynthesis, pigment composition and glutathione contents in two Antarctic lichens during a light stress and recovery. *Photosynthetica*, **52**, 538–547.
- Barbato R., Tadini L., Cannata R., Peracchio C., Jeran N., Alboresi A., Morosinotto T., Bajwa A.A., Paakkarinen V., Suorsa M., Aro E.-M., Pesaresi P. (2020) Higher order photoprotection mutants reveal the importance of ΔpH -dependent photosynthesis control in preventing light induced damage to both photosystem II and photosystem I. *Scientific Reports*, **10**, 6770.
- Barcikowski A., Loro P.M. (1999) Changes in chlorophyll content throughout the year in selected species of mosses on King George Island, South Shetland Islands, maritime Antarctic. *Polish Polar Research*, **20**, 291–299.
- Barták M., Hájek J., Očenášová P. (2012) Photoinhibition of photosynthesis in Antarctic lichen *Usnea antarctica*. I. Light intensity- and light duration-dependent changes in functioning of photosystem II. *Czech Polar Reports*, **2**, 42–51.
- Barták M., Hájek J., Vráblíková H., Dubová J. (2004) High-light stress and photoprotection in *Umbilicaria antarctica* monitored by chlorophyll fluorescence imaging and changes in zeaxanthin and glutathione. *Plant Biology*, **6**, 333–341.
- Barták M., Solhaug K.A., Vráblíková H., Gauslaa Y. (2006) Curling during desiccation protects the foliose lichen *Lobaria pulmonaria* against photoinhibition. *Oecologia*, **149**, 553–560.
- Barták M., Vráblíková H., Hájek J. (2003) Sensitivity of photosystem 2 of Antarctic lichens to high irradiance stress: fluorometric study of fruticose (*Usnea antarctica*) and foliose (*Umbilicaria decussata*) species. *Photosynthetica*, **41**, 497–504.
- Bednaříková M., Folgar-Cameán Y., Kučerová Z., Lazár D., Špundová M., Hájek J., Barták M. (2020) Analysis of K- and L-band appearance in OJIPs in Antarctic lichens in low and high temperature. *Photosynthetica*, **58**(SI), 646–656.
- Cannone N., Corinti T., Malfasi F., Gerola P., Vianelli A., Vanetti I., Zaccara S., Convey P., Guglielmin M. (2017) Moss survival through *in situ* cryptobiosis after six centuries of glacier burial. *Scientific Reports*, **7**, 4438.
- Csintalan Z., Proctor M.C.F., Tuba Z. (1999) Chlorophyll fluorescence during drying and rehydration in the mosses *Rhytidiadelphus loreus* (Hedw.) Warnst., *Anomodon viticulosus* (Hedw.) Hook. & Tayl. and *Grimmia pulvinata* (Hedw.) Sm. *Annals of Botany*, **84**, 235–244.
- Daughtry C.S.T., Walthall C.L., Kim M.S., Brown D.E., Colstoun E., McMurtrey J.E. (2000) Estimating corn leaf chlorophyll concentration from leaf and canopy reflectance. *Remote Sensing of Environment*, **74**, 229–239.
- Dikaios I., Schiphorst C., Dall'Osto L., Alboresi A., Bassi R., Pinnola A. (2019) Functional analysis of LHCSR1, a protein catalyzing NPQ in mosses, by heterologous expression in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research*, **142**, 249–264.
- Elster J., Nedbalová L., Vodrážka R., Láška K., Haloda J., Komárek J. (2016) Unusual biogenic calcite structures in two shallow lakes, James Ross Island, Antarctica. *Biogeosciences*, **13**, 535–549.
- Fang S., Yu W., Qi Y. (2015) Spectra and vegetation index variations in moss soil crust in different seasons, and in wet and dry conditions. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, **38**, 261–266.
- Fernandes A.S., Alencar A.S., Evangelista H., Mazzei J.L., Felzenszwalb I. (2015) Photoprotective and toxicological activities of extracts from the Antarctic moss *Sanionia uncinata*. *Pharmacognosy Magazine*, **11**, 38–43.
- Fernandes A.S., Mazzei J.L., Alencar A.S., Evangelista H., Felzenszwalb I. (2011) Effects of *Sanionia uncinata* extracts in protecting against and inducing DNA cleavage by reactive oxygen species. *Redox Report*, **16**, 201–207.
- Fernandes A.S., Mazzei J.L., Oliveira C.G., Evangelista H., Marques M.R.C., Ferraz E.R.A., Felzenszwalb I. (2017) Protection against UV-induced toxicity and lack of mutagenicity of Antarctic *Sanionia uncinata*. *Toxicology*, **376**, 126–136.
- Furukawa R., Aso M., Fujita T., Akimoto S., Tanaka R., Tanaka A., Yokono M., Takabayashi A. (2019) Formation of a PSI–PSII megacomplex containing LHCSR and PsbS in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Research*, **132**, 867–880.
- Gamon J.A., Peñuelas J., Field C.B. (1992) A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes

- in photosynthetic efficiency. *Remote Sensing of Environment*, **41**, 35–44.
- Gerotto C., Alboreasi A., Giacometti G.M., Bassi R., Morosinotto T. (2012) Coexistence of plant and algal energy dissipation mechanisms in the moss *Physcomitrella patens*. *New Phytologist*, **196**, 763–773.
- Giudici G.N.M. (2019) Photoinhibition of primary photosynthetic processes in hydrated *Polytrichum commune*: analysis of non-photochemical quenching affecting species resistance. *Czech Polar Reports*, **9**, 160–169.
- Glime J.M. (2017) Photosynthesis: Photoinhibition. In: Glime J.M. (Ed), *Bryophyte Ecology*. Vol. 1, chapter 11-2-1. Physiological Ecology. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. Last updated 11 November 2017. Available from <http://digitalcommons.mtu.edu/bryophyte-ecology/>.
- Haboudane D., Miller J.R., Pattey E., Zarco-Tejada P.J., Strachan I.B. (2004) Hyperspectral vegetation indices and novel algorithms for predicting green LAI of crop canopies: Modeling and validation in the context of precision agriculture. *Remote Sensing of Environment*, **90**, 337–352.
- Hájek T., Tuittila E.-S., Ilomets M., Laiho R. (2009) Light responses of mire mosses: a key to survival after water-level drawdown? *Oikos*, **118**, 240–250.
- Heber U., Bilger W., Shuvalov V.A. (2006) Thermal energy dissipation in reaction centres and in the antenna of photosystem II protects desiccated poikilohydric mosses against photooxidation. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 2993–3006.
- Hedenäs L. (1989) The genus *Sanionia* (Musci) in Northwestern Europe, a taxonomic revision. *Annales Botanici Fennici*, **26**, 399–419.
- Hedenäs L. (2003) Amblystegiaceae (Musci). *Flora Neotropica Monograph*, **89**, 1–107.
- Hong S.S., Xu D.Q. (1999) Light-induced increase in initial chlorophyll fluorescence F_0 level and the reversible inactivation of PSII reaction centers in soybean leaves. *Photosynthesis Research*, **61**, 269–280.
- Killi D., Haworth M. (2017) Diffusive and metabolic constraints to photosynthesis in quinoa during drought and salt stress. *Plants (Basel)*, **6**, 49.
- Kopalová K., Nedbalová L., Nývlt D., Elster J., Van De Vijver B. (2013) Diversity, ecology and biogeography of the freshwater diatom communities from Ulu Peninsula (James Ross Island, NE Antarctic Peninsula). *Polar Biology*, **36**, 933–948.
- Lewis Smith R.I., Øvstedal D.O. (1994) *Solorina spongiosa* in Antarctica: an extremely disjunct bipolar lichen. *The Lichenologist*, **26**, 209–215.
- Lichtenthaler H.K., Welburn A.R. (1983) Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of extracts in different solvents. *Biochemical Society*, **11**, 591–592.
- Lovelock C.E., Robinson S.A. (2002) Surface reflectance properties of Antarctic moss and their relationship to plant species, pigment composition and photosynthetic function. *Plant, Cell and Environment*, **25**, 1239–1250.
- Lud D., Moerdijk T.C.W., Van De Poll W.H., Buma A.G.J., Huiskes A.H.L. (2002) DNA damage and photosynthesis in Antarctic and Arctic *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske under ambient and enhanced levels of UV-B radiation. *Plant, Cell and Environment*, **25**, 1579–1589.
- Lud D., Schlensog M., Schroeter B., Huiskes A.H.L. (2003) The influence of UV-B radiation on light-dependent photosynthetic performance in *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske in Antarctica. *Polar Biology*, **26**, 225–232.
- Marschall M., Proctor M.C.F. (2004) Are Bryophytes shade plants? Photosynthetic light responses and proportions of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and total carotenoids. *Annals of Botany*, **94**, 593–603.
- Mathur S., Allakhverdiev S.I., Jajoo A. (2011) Analysis of high temperature stress on the dynamics of antenna size and reducing side heterogeneity of photosystem II in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Biochimica et Biophysica Acta*, **1807**, 22–29.
- May J.L., Parker T., Unger S., Oberbauer S.F. (2018) Short term changes in moisture content drive strong changes in Normalized Difference Vegetation Index and gross primary productivity in four Arctic moss communities. *Remote Sensing of Environment*, **212**, 114–120.
- Murray K.J., Tenhunen J.D., Nowak R.S. (1993) Photoinhibition as a control on photosynthesis and production of *Sphagnum* mosses. *Oecologia*, **96**, 200–207.
- Nabe H., Funabiki R., Kashino Y., Koike H., Satoh K. (2007) Responses to desiccation stress in bryophytes and an important role of dithiothreitol-insensitive non-photochemical quenching against photoinhibition in dehydrated states. *Plant and Cell Physiology*, **48**, 1548–1557.
- Newsham K.K. (2003) UV-B radiation arising from stratospheric ozone depletion influences the pigmentation of the Antarctic moss *Andreaea regularis*. *Oecologia*, **135**, 327–331.
- Newsham K.K., Hodgson A.W., Murray A.W.A., Peat H.J., Smith R.I.L. (2002) Response of two Antarctic bryophytes to stratigraphic ozone depletion. *Global Change Biology*, **8**, 972–983.
- Niyogi K.K., Li X.-P., Rosenberg V., Jung H.-S. (2005) Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, **56**, 375–382.
- Núñez-Olivera E., Otero S., Tomás R., Fabón G., Martínez-Abaigar J. (2010) Cyclic environmental factors only partially explain the seasonal variability of photoprotection and physiology in two mosses from an unforested headwater stream. *The Bryologist*, **113**, 277–291.
- Peñuelas J., Frederic B., Andfilella I. (1995) Semi-empirical indices to assess carotenoids/chlorophyll *a* ratio from leaf spectral reflectance. *Photosynthetica*, **31**, 221–230.
- Peñuelas J., Gamon J.A., Fredeen A.L., Merino J., Andfield C.B. (1994) Reflectance indices associated with physiological changes in nitrogen- and water-limited sunflower leaves. *Remote Sensing of Environment*, **48**, 135–146.
- Perera-Castro A.V., Waterman M.J., Turnbull J.D., Ashcroft M.B., McKinley E., Watling J.R., Bramley-Alves J., Casanova-Katny A., Zuniga G., Flexas J., Robinson S.A. (2020) It is hot in the sun: antarctic mosses have high temperature optima for photosynthesis despite cold climate. *Frontiers in Plant Science*, **11**, 1178.
- Pinnola A., Dall'Osto L., Gerotto C., Morosinotto T., Bassi R., Alboreasi A. (2013) Zeaxanthin binds to light-harvesting complex stress-related protein to enhance nonphotochemical quenching in *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell*, **25**, 3519–3534.
- Pizarro M., Contreras R.A., Köhler H., Zúñiga G.E. (2019) Desiccation tolerance in the Antarctic moss *Sanionia uncinata*. *Biological Research*, **52**, 46.
- Putzke J., Pereira A.B. (2020) The vegetation of the south shetland islands and the climatic change. In: *Glaciers and Polar Environment*. IntechOpen, 1–22. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94269>.
- Robinson S.A., King D.H., Bramley-Alves J., Waterman M.J., Ashcroft M.B., Wasley J., Turnbull J.D., Miller R.E., Ryan-Colton E., Benny T., Mullany K., Clarke L.J., Barry L.A., Hua Q. (2018) Rapid change in east Antarctic terrestrial vegetation in response to regional drying. *Nature Climate Change*, **8**, 879–884.
- Robinson S.A., Waterman M.J. (2014) Sunsafe bryophytes: Photoprotection from excess and damaging solar radiation. In: Hanson D.T., Rice S.K. (Eds), *Photosynthesis in Bryophytes and Early Land Plants*. Springer, Berlin, Germany, pp 113–130.
- Rouse J.W., Haas R.H., Schell J.A., Anddeering D.W. (1974) Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS. In: Freden S.C., Mercanti E.P., Becker M. (Eds), *Third Earth Resources Technology Satellite-1 Symposium*. Volume I: Technical Presentations, NASA SP-351, NASA, Washington, DC, USA. pp 309–317.
- Singh-Tomar R., Mathur S., Allakhverdiev S.I., Jajoo A. (2012) Changes in PS II heterogeneity in response to osmotic and ionic stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **44**, 411–419.
- Skácelová K., Barták M. (2014) Gradient of algal and cyanobacterial assemblages in a temporary lake with melting water at Solorina Valley, James Ross Island, Antarctica. *Czech Polar Reports*, **4**, 185–192.
- Smith R.I.L. (1996) Terrestrial and freshwater biotic components of the western Antarctic Peninsula. In: Ross R.M., Hofmann E.E., Quentin L.B. (Eds), *Foundations of Ecological Research West of the Antarctic Peninsula Antarctic Research Series*, Vol 70. American Geophysical Union, Washington DC, USA, pp 15–59.
- Smith R.C.G., Adams J., Stephens D.J., Hick P.T. (1995) Forecasting wheat yield in a Mediterranean-type environment from the NOAA satellite. *Australian Journal of Agricultural Research*, **46**, 113–125.
- Song L., Liu W.-Y., Ma W.-Z., Qi J.-H. (2012) Response of epiphytic bryophytes to simulated N deposition in a subtropical montane cloud forest in southwestern China. *Oecologia*, **170**, 847–856.
- Soriano G., Del-Castillo-Alonso M.-Á., Monforte L., Núñez-Olivera E., Martínez-Abaigar J. (2019) Acclimation of Bryophytes to sun conditions, in comparison to shade conditions, is influenced by both photosynthetic and ultraviolet radiations. *Frontiers in Plant Science*, **10**, 998.
- Stella G.R. (2016) Light stress and photoprotection in green algae, mosses and diatoms. Ph.D. thesis, University of Verona and University Pierre et Marie Curie: pp 144.
- Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M. (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M., Pathre U., Mohanty P. (Eds), *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. Taylor & Francis, London, UK, pp 445–483.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. (2004) Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds), *Chlorophyll*

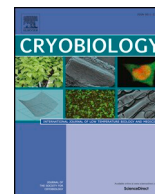
- a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration.* Springer, Dordrecht, the Netherlands, pp 321–362.
- Takahashi S., Badger M.R. (2011) Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science*, **16**, 53–60.
- Torres-Mellado G.A., Jaña R., Casanova-Katny M.A. (2011) Antarctic hair grass expansion in the South Shetland archipelago and Antarctic Peninsula revisited. *Polar Biology*, **34**, 1679–1688.
- Uchida M., Muraoka H., Nakatsubo T., Bekku Y., Ueno T., Kanda H., Koizumi H. (2002) Net photosynthesis, respiration, and production of the moss *Sanionia uncinata* on a Glacier Foreland in the High Arctic, Ny-Ålesund, Svalbard. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, **34**, 287–292.
- Valoen K. (2019) Stochastic rain events increase NDVI through moss water content: a High-Arctic field experiment. Master's thesis in MLREAL. Norwegian University of Science and Technology: pp 47.
- Van Gaalen K.E. (2005) Photosynthetic CO₂ exchange and spectral vegetation indices of boreal mosses. Master thesis, Lethbridge, Alberta, Canada. pp 110.
- van Kooten O., Snell J.F.H. (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, **25**, 147–150.
- Varela Z., Aboal J.R., Rey-Asensio A., Carballeira A., Fernández J.A. (2013) Establishing reference values of spectral reflectance indices in transplants of *Pseudoscleropodium purum* for potential use in atmospheric biomonitoring. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **91**, 345–348.
- Virtanen R.J., Lundberg P.A., Moen J., Oksanen L. (1997) Topographic and altitudinal patterns in plant communities on European Arctic islands. *Polar Biology*, **17**, 95–113.
- Vredenberg W., Kasalicky V., Durchan M., Prasil O. (2006) The chlorophyll *a* fluorescence induction pattern in chloroplasts upon repetitive single turnover excitations: accumulation and function of QB-nonreducing centers. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1757**, 173–181.
- Waterman M.J., Bramley-Alves J., Miller R.E., Keller P.A., Robinson S.A. (2018) Photoprotection enhanced by red cell wall pigments in three east Antarctic mosses. *Biological Research*, **51**, 49.
- Waterman M.J., Nugraha A.S., Hendra R., Ball G.E., Robinson S.A., Keller P.A. (2017) Antarctic moss biflavonoids show high antioxidant and ultraviolet-screening activity. *Journal of Natural Products*, **80**, 2224–2231.
- Yamakawa H., Fukushima Y., Itoh S., Heber U. (2012) Three different mechanisms of energy dissipation of a desiccation-tolerant moss serve one common purpose: to protect reaction centres against photo-oxidation. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 3765–3775.
- Yamane Y., Shikanai T., Kashino Y., Koike H., Satoh K. (2000) Reduction of Q_A in the dark: another cause of fluorescence F₀ increases by high temperatures in higher plants. *Photosynthesis Research*, **63**, 23–34.
- Yao X., Zhou H., Zhu Q., Li C., Zhang H., Wu J.-J., Xie F. (2017) Photosynthetic response of soybean leaf to wide light-fluctuation in maize–soybean intercropping system. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 1695.
- Živčák M., Olšovská K., Slamka P., Galambošová J., Rataj V., Shao H.B., Brestič M. (2014) Application of chlorophyll fluorescence performance indices to assess the wheat photosynthetic functions influenced by nitrogen deficiency. *Plant, Soil and Environment*, **60**, 210–215.
- Zúñiga-González P., Zúñiga G.E., Pizarro M., Casanova-Katny A. (2016) Soluble carbohydrate content variation in *Sanionia uncinata* and *Polytrichastrum alpinum*, two Antarctic mosses with contrasting desiccation capacities. *Biological Research*, **49**, 6.

OTHER SOURCES

<https://www.meteoblue.com/en/weather/historyclimate/climate-modelled/>; <https://atmosphere.copernicus.eu/ozone-monitoring>
<https://data.bas.ac.uk/> [Antarctic Plant Database (British Antarctic Survey Herbarium database)]

Publikace 5 (Příloha 6)

Orekhova A., Barták M., Hájek J. (2018b) Post rapid freezing growth of Antarctic strain of *Heterococcus* sp. monitored by cell viability and chlorophyll fluorescence. *Cryobiology*, 856: 39-46. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.10.004.



Post rapid freezing growth of Antarctic strain of *Heterococcus* sp. monitored by cell viability and chlorophyll fluorescence



Alla Orekhova, Miloš Barták, Josef Hájek*

Department of Experimental Biology, Division of Plant Physiology and Anatomy, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00, Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:
Antarctica
Cold stress
Cryoresistance
Ribitol
Terrestrial alga

ABSTRACT

The soil microalgae of the genus *Heterococcus* are found in cold environments and have been reported for the terrestrial ecosystems of several Sub-Antarctic and Antarctic Islands. This study focused on resistance of *Heterococcus* sp. to sub-zero temperature. *Heterococcus* sp. was isolated from soil samples from James Ross Island, Antarctica. Culture of *Heterococcus* sp. grown in liquid medium were used to study ribitol effects at sub-zero temperatures on the species resistance to rapid freezing (RF, immersion of a sample into liquid nitrogen) and consequent cultivation on agar. Before the experiment, *Heterococcus* sp. was cultured in liquid medium for 11 months and then treated in ribitol concentrations of 32 or 50 mM for 2 h. Then, 1 ml samples were frozen to $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in liquid nitrogen (day 0) and inoculated on BBM agar after thawing. Number of living and dead cells was evaluated and the cell viability (P_v) was calculated repeatedly using the optical microscopy approach. The addition of ribitol caused a noticeable increase in P_v on days 9, 12, 14 (with a P_v of 25–45% in ribitol-treated samples compared to 10% in the untreated control). In the following period (d 16–19), the positive effect of ribitol on P_v was less pronounced but still statistically significant. To evaluate the negative effects of RF on chlorophyll fluorescence parameters, the potential yield of photochemical reactions in PS II (F_v/F_M), and the effective quantum yield of photochemical reactions in PS II (Φ_{PSII}) were measured immediately before and after RF. Consequently, F_v/F_M and Φ_{PSII} of agar inoculates were measured repeatedly for 30 d cultivation in 3 d interval. Both the 32 and the 50 mM addition of ribitol caused earlier detection of the parameters (d 16) compared to the control measurements (d 23) as well as reaching the maximum values of the chlorophyll fluorescence parameters earlier (d 23 in ribitol-treated samples compared to d 25 in control samples). *Heterococcus* sp. proved to be a species resistant to rapid freezing. The ability may help the species to survive in harsh Antarctic environments typified by rapid fluctuations in temperature that may bring a rapid freezing of the alga.

1. Introduction

In Antarctica, the species diversity in vegetation oases, mosses and lichens in particular, is very limited due to the extremely low temperature and limited water availability [57]. Nevertheless, terrestrial microalgae are well adapted to the harsh conditions of the polar latitudes and may survive even at extremely low sub-zero temperatures [14]. Therefore, numerous unicellular terrestrial algae are reported for deglaciated areas in Antarctica (see Ref. [8]).

In addition to their freezing tolerance, terrestrial microalgae are very important components of Antarctic natural environments since they serve as suppliers of nutrients in vegetation-covered ecosystems

[6,9]. They also have several adaptations and acclimation mechanisms to cope with the harsh environment and play an important role in the bio-geochemical cycle of terrestrial ecosystems in polar regions [42]. Low temperature-induced changes in the cell metabolism of terrestrial algae from polar regions are the main mechanisms for adapting to low and sub-zero temperature [18]. They include the increased synthesis of sugars and polyols [3,62], the formation of anti-freeze proteins [39], ice-binding proteins [54], alterations in lipid content [10], and strategies to avoid intracellular ice formation [42]. Recently, a great attention has been devoted to the molecular mechanisms allowing microalgae to adapt to low and sub-zero temperatures using an ‘omics’ approach (for review, see Ref. [42]).

Abbreviations: ChF, chlorophyll fluorescence; KK, Kautsky kinetics of chlorophyll fluorescence; R32, ribitol 32 mM; R50, ribitol 50 mM; d, day; P_v , viability; F_v/F_M , potential yield of photochemical photosynthetic processes in PS II; Φ_{PSII} , effective yield of photochemical photosynthetic processes in PS II; NPQ, non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence; F_s , steady-state fluorescence

* Corresponding author.

E-mail address: jhajek@sci.muni.cz (J. Hájek).

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.10.004>

Received 20 June 2018; Received in revised form 24 September 2018; Accepted 3 October 2018

Available online 04 October 2018

0011-2240/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

For psychrophiles, including polar algae, the activity of cold-adapted enzymes [61], and maintenance of functionality of cell membranes are important at low temperatures [67]. The latter is achieved by incorporating polyunsaturated fatty acids [42,45]. The process is associated with the change in the composition of membrane lipids and driven by the activation of intracellular phospholipases [48]. Since they are allocated mainly in contractile vacuoles (especially in unicellular freshwater algae) the presence and size of contractile vacuoles is considered a marker of cryoresistance [35].

In response to low and sub-zero temperature, terrestrial algae synthesize different osmolytes [21], such as amino acids (proline), sugars, polyols and other osmotically active substances. The role of polyols in cryoresistance and the metabolic response to various stressors has been proven for many autotrophic organisms including algae [68], cyanobacteria [55], lichens [28], and higher plants [64]. In response to low and sub-zero temperature, they increase the content of the polyols (sugar alcohols): mannitol, arabitol, and ribitol. Ribitol is one of the main cryoprotective substances in lichens, which is synthesized by symbiotic algae. The ribitol content of different algal species isolated from lichens has been studied by several researchers [2,11,12,56,62]. Moreover, the effects of ribitol addition on the primary photosynthetic processes have been studied in chlorolichens [26,28]. The two studies report the positive effects of ribitol on chlorophyll fluorescence parameters in lichens when measured at low or sub-zero temperatures.

Algae from polar regions exhibit high cryoresistance, i.e. the ability to survive and cope well with repetitive freezing/thawing cycles. Such a capability has been studied in polar terrestrial algae [17] and chlorolichens [30] within the last few decades with the main emphasis given to their survival capacity under different freezing conditions (rate of cooling, repetitive freezing – for details see below). Last but not least, the practical aspects of *in vitro* cryoconservation of polar algae has been addressed (see Ref. [15] for review) in order to preserve the microalgae biodiversity by storing them in Culture collections (e.g. UMACC - University of Malaya Algae Culture Collection, CCALA – Třeboň, Czech Republic, SAG – Göttingen, Germany – [19]).

Several studies evaluated the effects of ultra-low temperature on various chlorolichens and algal species [36,37, 65]. They exploited either the approach of (1) cooling the samples to sub-zero temperatures at low ([62], 5°C h^{-1}) and high rates ([29], $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$), (2) rapid freezing to -196°C , and (3) the combination of the two approaches [65]. The technique of rapid freezing in liquid nitrogen with the consecutive cultivation and evaluation of species-specific viability was used in the unicellular alga *Trebouxia* sp. isolated from lichens [27]. The study reported species-specific differences in cell viability and photosynthetic parameters.

We have investigated if and to what extent unicellular alga *Heterococcus* sp. from James Ross Island (Antarctica) exhibits characteristics of cryoresistance. Algae of the genus *Heterococcus* belongs to the yellow-green algae that thrive well in polar regions [60]. They are psychrophilic and can be found in a variety of polar environments [13]. In the field, however, *Heterococcus* is a rare species. In addition, *Heterococcus* sp. is a symbiotic alga in the lichens of *Verrucariaceae* family [51,70–72].

Microalgae of *Heterococcus* genus are found in polar seas [1] as well as terrestrial polar ecosystems [16]. The genus is reported in the Canadian Arctic [54], the Svalbard region [7,53,58], the Antarctic Peninsula [23], while also in the soils of cold regions of the Alps [41]. Other species of the *Heterococcus* genus are reported in polar regions: i.e. *H. leptosiroides* from Princess Elizabeth Land, Vestfold Hills [52]; and *H. chodatii* from the Thala Hills oasis (Enderby Land, East Antarctic) [63]. The cryptoendolithic species, *H. endolithicus* was described [13] in the Linnaeus terrace (Dry Valleys, Asgard Range, Wright Valley, Antarctica). The authors reported akinete formation induced by nutrient starvation.

In the last decades, only a few physiological studies of *Heterococcus* sp. have been carried out that addressed specific problems such as resistance to salinity stress and the production of mannitol and growth suppression [20]. Recently, the molecular background of the *Heterococcus* sp. resistance to low temperatures, putative cold-tolerance genes and those encoding anti-freeze proteins in particular, was investigated [49]. Molecular biology studies addressed the taxonomy of species of the *Heterococcus* genus. Stoop et al. [64] presented a method and a reference data base for the unambiguous identification of species of the genus *Heterococcus* which uses DNA sequence variation in markers from plastids and nuclear genomes. In the *Heterococcus* sp. the content of a fatty acid profile and toxicity was studied [33]. Other studies ([52] and [38]) reported the fatty acid profile in the *Heterococcus* sp. similar to that observed in other xanthophytes. Several studies have focused on cryoresistance and underlying mechanisms in terrestrial microalgae. Recent study evaluates the viability and the growth of the *Heterococcus* sp. subsequent to the rapid freezing of samples with and without the addition of ribitol. We have hypothesized that ribitol addition would increase the viability and the rate of restoring primary photosynthetic processes assessed by the potential (F_v/F_m) and the effective quantum yield (Φ_{PSII}) of photochemical processes of photosynthesis in photosystem II of the *Heterococcus* sp. Time courses were evaluated for other chlorophyll fluorescence parameters after rapid freezing and consequent cultivation on agar in order to assess their indicative value for the cryoprotective effect of ribitol in Antarctic freshwater microalgae.

2. Materials and methods

2.1. Algal material

The *Heterococcus* sp. (CCALA, strain No. 878) isolated from soil samples from James Ross Island, Antarctica was used for experiments addressing species resistance to rapid freezing (Fig. 1). The *Heterococcus* sp. was cultivated in a 3 N inorganic Bold basal liquid medium (BBM – [5]) in 100 ml glass flasks under continuous irradiation of $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation (PAR). The cultivation was static, the flasks were placed on racks in a cultivation box (Liebherr FKS 5002, Germany). Once in 48 h, the flasks were shaken manually for 5 s. Cultivation temperature was set to 10°C .

3. Experimental design

3.1. Rapid freezing treatment

Algal culture suspensions were pipetted into microcryovials (1.5 ml cryogenic tube with screw cap, BRAND®, Germany) and used for experimental treatments. The control was 1 ml of algal suspension with no addition of cryoprotective compounds (5 replicates). Ribitol (Merck, Germany) treatments were added into the culture suspension (0.5 ml of suspension and 0.5 ml of ribitol). Two concentrations of ribitol were used: (1) R32 (32 mM, 5 g dm^{-3}), and (2) R50: (50 mM, 7.6 g dm^{-3}). The samples were exposed for 2 h (5 replicates per each ribitol treatment). After the ribitol treatment, all samples including control were frozen by immersion into liquid nitrogen (-196°C) for 10 min. Then the cryovials with frozen algae were taken away from liquid nitrogen and thawed naturally at room temperature (23.0°C).

After the thawing (2 h in the target temperature of 23°C), liquid inoculum (0.5 ml) was spread uniformly on an agar plate (inorganic 3 N BBM medium with a 1.5% agar, Duchefa, the Netherlands, Prod. No. 1001.1000) with a glass rod (day 0). The samples (control, 32R, 50R) were cultivated in Petri dishes on agar plates for the following 30 days (5 dishes per treatment). During cultivation, the samples were exposed to a temperature of 10°C and a radiation of $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR.

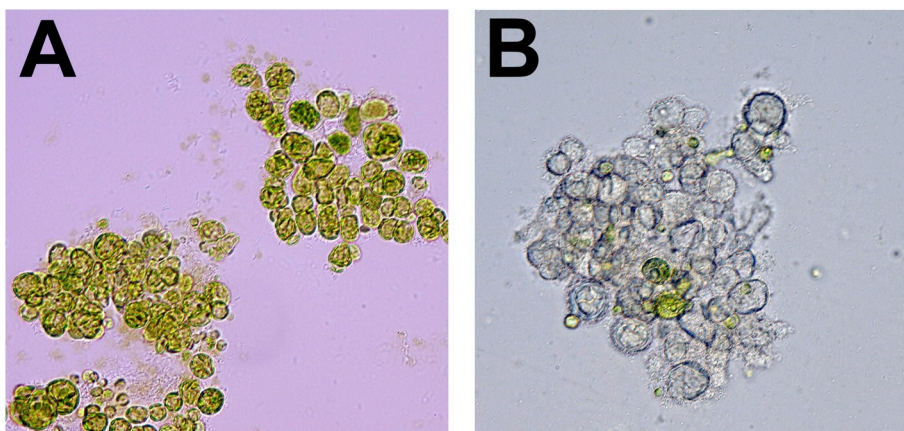


Fig. 1. Green living cells of *Heterococcus* sp. (CCALA strain No. 878 in control (no rapid freezing in liquid N) grown in liquid BBM medium (A), and dead (discolored) algae cells of *Heterococcus* sp. observed after rapid freezing in liquid nitrogen and inoculation on agar (B). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

During cultivation, photoperiod was set to 16/8 h light/dark. The growth of the culture was checked regularly every 3 days by optical microscopy (Olympus BX 41, Japan). However, the first countable number of living cells appeared on Day 9 after the inoculation of the culture passing rapid freezing and consequent thawing.

3.2. Viability assessment

Microscopy was used to count the number of living/dead cells of the *Heterococcus* sp. strain for the control, R32, and R50 treatments (5 Petri dishes per treatment). The numbers were evaluated on at least 15 spots (area of 0.01 mm²) located randomly on the algal culture grown on a single Petri dish. Typically, 100 cells were inspected per a spot. Green cells with well-distinguishable chloroplast and without any signs of rupture were denoted as living. Ruptured, and/or colourless cells were denoted as dead. Only fully visible cells were evaluated. For each day of

microscopy study (Days 9, 12, 14, 16, 19, and 22), viability (P_v) was calculated using the formula:

$$P_v (\%) = (\text{No. living cells} \times 100) / (\text{No. of living} + \text{No. of dead cells}) \quad (1)$$

3.3. Chlorophyll fluorescence measurements

Chlorophyll fluorescence parameters were measured: (1) before the experiment (control, *Heterococcus* sp. in liquid culture), (2) after rapid freezing and subsequent thawing of room temperature (*Heterococcus* sp. in liquid culture), and (3) repeatedly after the inoculation of frozen culture on agar and the following growth, typically in 3d interval. The changes in the physiological state of the algae cells during each cultivation period following rapid freezing were evaluated by chlorophyll fluorescence, using a HFC-010 FluorCam (Photon Systems Instruments,

Table 1
Physiological meaning of the chlorophyll fluorescence parameters used in this study.

Parameter	Description	Physiological meaning
F_v/F_M	Ratio of variable to maximum chlorophyll fluorescence	Capacity of photosynthetic processes in photosystem II (PSII), i.e. potential yield
Φ_{PSII}	Genty parameter	Effective yield of photosynthetic processes in PS II related to actual photosynthesis
NPQ	Non-photochemical quenching	Absorbed light energy that is not used in photosynthetic processes but protective mechanisms
Rfd	Relative (chlorophyll) fluorescence decline [40]	Vitality index assessing overall physiological status of the photosynthetic apparatus of a sample
qF_0	Quenching of background chlorophyll fluorescence	Indicator of stress-induced changes in functioning of light harvesting complexes of PS II

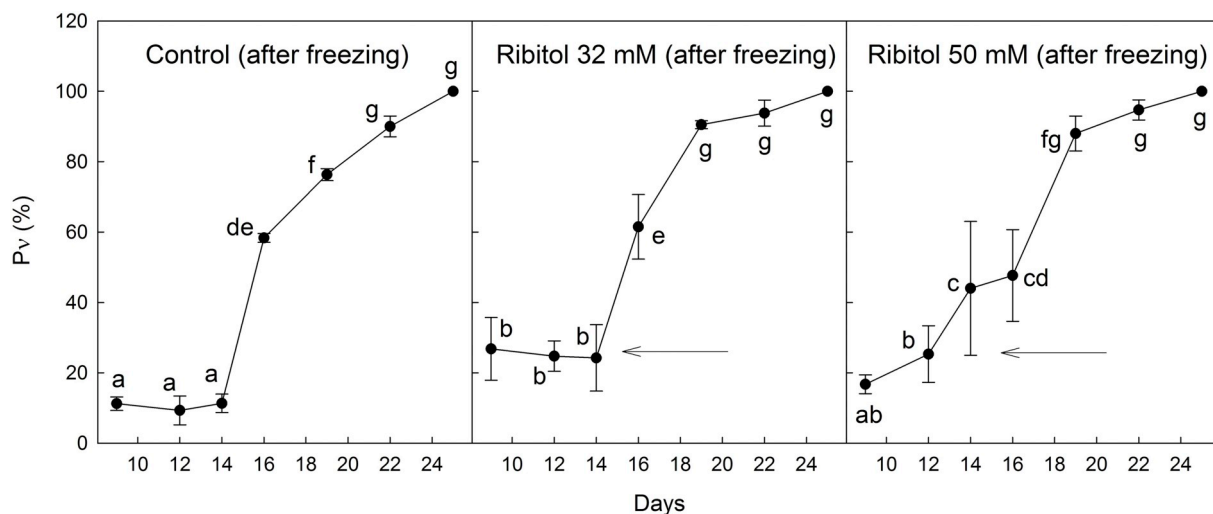


Fig. 2. Viability (P_v) of *Heterococcus* sp. in response to the time of cultivation on BBM agar. Day 0 represents the time of inoculation of frozen culture of *Heterococcus* sp. (CCALA strain No. 878) on agar after rapid freezing. The positive effect of ribitol addition on P_v values is indicated by the arrows for Day 14.

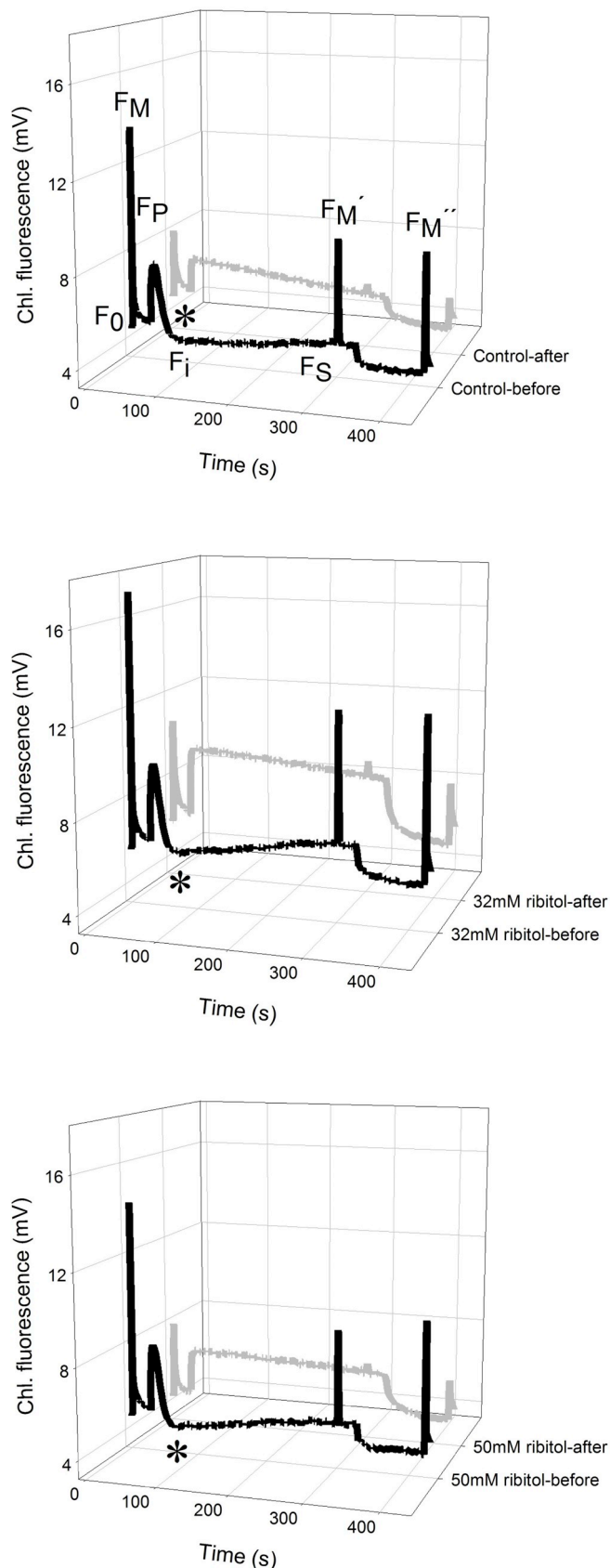


Fig. 3. Kautsky kinetics recorded before and after rapid freezing of *Heterococcus* sp. culture. Data are presented for control and the culture with addition of ribitol (32 and 50 mM). Key to the parameters: F_0 – background chlorophyll fluorescence, F_p – chlorophyll fluorescence reached at peak P, F_i – intermediate state of chlorophyll fluorescence (between F_p and F_s), F_s – steady state chlorophyll fluorescence, F_M – maximum chlorophyll fluorescence reached after a saturation pulse of light applied in dark-adapted state of a sample. An asterisk indicates F_i .

Czech Republic). The Petri dishes with algal cultures were dark-adapted for 5 min and slow Kautsky kinetics supplemented with quenching analysis were measured. The method and experimental set up optimized for lichens and described elsewhere was used, see Ref. [69]. From the curves, particular chlorophyll fluorescence signals (see Fig. 3 and Eqs. (2)–(6)), and the following chlorophyll fluorescence parameters were evaluated: the potential yield of photochemical photosynthetic processes in PS II (F_V/F_M), the effective yield of photochemical photosynthetic processes in PS II (Φ_{PSII}), non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence (NPQ), and steady-state fluorescence (F_s). Table 1 summarizes physiological meaning of the chlorophyll fluorescence parameters used in this study. The chlorophyll fluorescence parameters were used to assess: (1) direct effect of rapid freezing, and (2) growth of inoculum after rapid freezing.

$$F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M \quad (2)$$

$$\Phi_{PSII} = (F_M' - F_s)/F_M' \quad (3)$$

$$NPQ = (F_M - F_M')/F_M' \quad (4)$$

$$Rfd = (F_p - F_s)/F_s \quad (5)$$

$$qF_0 = (F_0 - F_0')/F_0 \quad (6)$$

3.4. Statistical analysis of variance

The statistical analysis was done for the data sets of viability (P_v), ChF parameters (F_V/F_M , Φ_{PSII} , NPQ, Rfd, qF_0), and ChF signal (F_s) by one-way ANOVA (Fisher LSD test) – Statistica ver. 13. Statistically-significant differences were considered at $p < 0.05$. Tested factors were the treatments (control, R32 and R50), and the time of cultivation of the *Heterococcus* sp. inoculum on agar. Number of replicates was 5 per treatment.

4. Results

4.1. Viability assessment - culture growth after rapid freezing

Changes in *Heterococcus* sp. viability P_v (here defined as a proportion of living to dead cells) are presented in Fig. 2. The data shows P_v values gained during the cultivation of the *Heterococcus* sp. inoculate, i.e. the thawed cultures on agar. P_v increased with time following an S-curve. During the first two weeks of cultivation, added ribitol caused a statistically-significant increase in P_v values, while no differences between P_v measured in the control and the cultures with added ribitol were apparent after Day 19.

4.2. Direct effect of rapid freezing on chlorophyll fluorescence

The direct effect of rapid freezing was studied in the *Heterococcus* sp. culture using chlorophyll fluorescence measured before and immediately after insertion into liquid nitrogen. The slow Kautsky kinetics (KK) of the *Heterococcus* sp. supplemented with saturation pulses (0.8 s, $5000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) responded to rapid freezing by changes in the shape of KK and the values of the particular chlorophyll fluorescence signals F_M , F_p , F_s , F_M' , and F_M'' (Fig. 3). The most remarkable change is the lack of fast relaxation in ChF from F_p to F_s in frozen culture. It

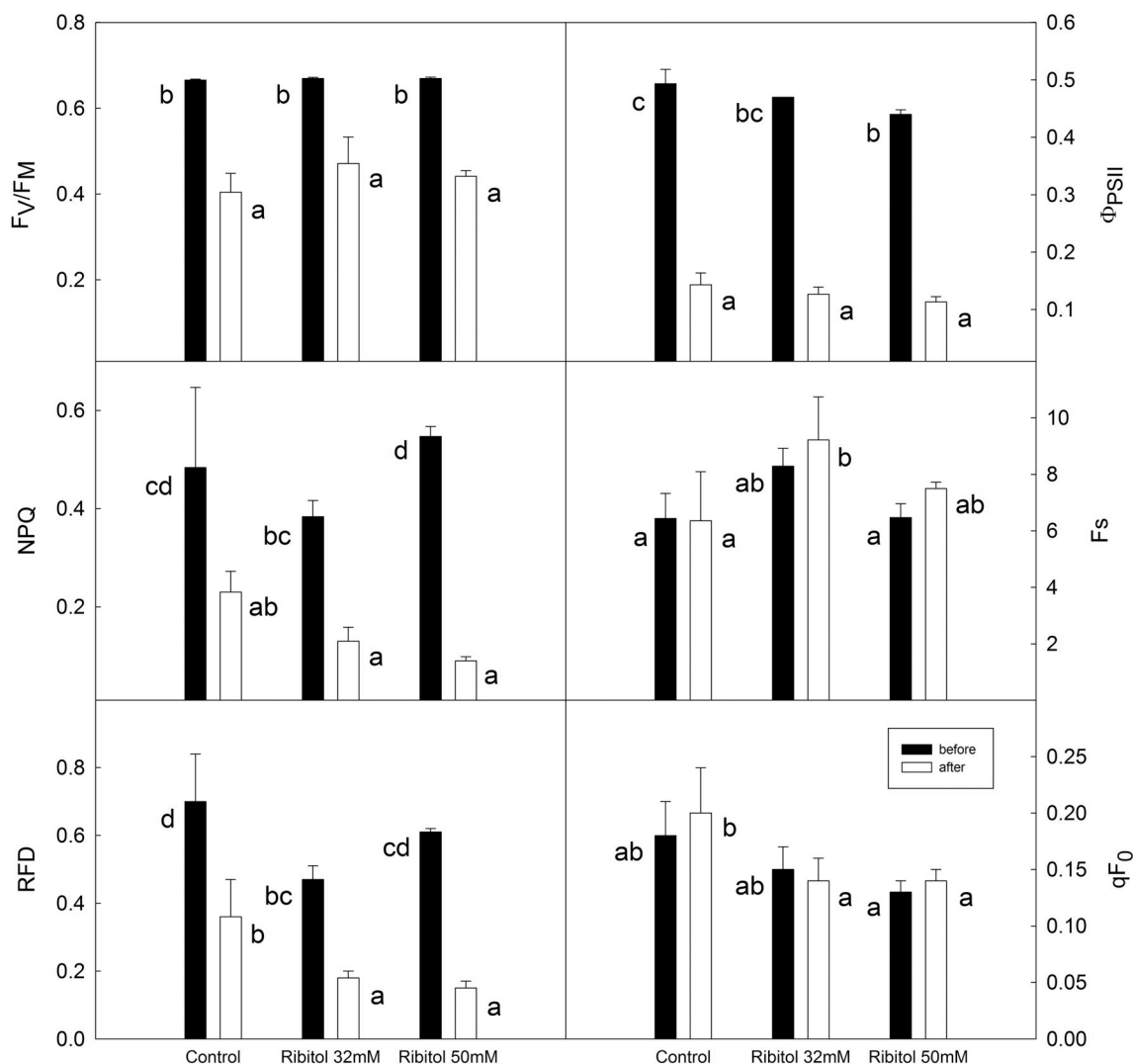


Fig. 4. Chlorophyll fluorescence parameters measured in *Heterococcus* sp. culture before and after rapid freezing (F_v/F_M , Φ_{PSII} , NPQ, Rfd, qF_0 and F_S) in liquid N. The data are presented for control (no addition), and ribitol-treated samples (addition of 32, and 50 mM ribitol).

shows a rather slow linear fall during the exposure of the sample to light (over the period from 50 to 300 s). In contrast, a fast exponential drop from F_p to ChF intermediate state (F_i) was found in the control (indicated by an asterisk in Fig. 3, after a time of 70 s). Moreover, in the control, ChF values increased with time (70–300 s) from F_i to F_S and the final F_S values were either comparable to or lower than the initial values of background chlorophyll fluorescence (F_0). The opposite was found for the frozen cultures where F_S was higher than F_0 . The difference was more pronounced in ribitol-treated samples (23.5% in control, 46.8% in 32 mM, and 42.4% in 50 mM ribitol treatments). Rapid freezing led to a decrease in F_M , F_M' , and F_M'' signals.

The potential (F_v/F_M) and the effective quantum yield (Φ_{PSII}) of photosynthetic processes in PSII decreased dramatically in the frozen culture, more apparently in Φ_{PSII} (Fig. 4). No effect from ribitol addition was observed since F_v/F_M and Φ_{PSII} fell to a similar extent in the untreated control and the ribitol-treated *Heterococcus* sp. Rapid freezing also induced negative change in Rfd. It decreased to 51.5% of the initial value in the control, 38.3% and 24.6% in 32 mM- and 50 mM-ribitol treated culture. Non-photochemical quenching (NPQ) fell in the frozen culture to a large extent, more significantly in the culture treated by 50 mM ribitol – 16.5% of initial value. The steady state chlorophyll fluorescence (F_S) in frozen culture showed either no change (control) or slight increase (ribitol-treated culture). The quenching of the background chlorophyll fluorescence (qF_0) remained unaffected by rapid

freezing. The qF_0 values, however, were much lower in the culture with the addition of ribitol than in control. In the culture where ribitol had later been added in the control, the rapid freezing did not bring any change in qF_0 .

4.3. Growth of inoculum after rapid freezing assessed by chlorophyll fluorescence

ChF parameters of the *Heterococcus* sp. inoculum cultivated on agar is shown in Fig. 5 (Day 12 to Day 32), and the statistical analysis is presented in Table 2. The control culture showed constant F_v/F_M and Φ_{PSII} values during the time of cultivation. The steady state chlorophyll fluorescence (F_S) increased steadily during the cultivation time from 8 to 22 mV found on Day 32. Thanks to growth and proliferation of the cells surviving rapid freezing, the first detectable chlorophyll fluorescence parameters were detectable after 21 days and reached the maximum of F_v/F_M and Φ_{PSII} on Day 21. The F_v/F_M and Φ_{PSII} maxima were comparable to the untreated control. The positive effect of ribitol addition was apparent in both cultures (32 and 50 mM ribitol). The addition brought faster growth of the culture since the first detection of F_v/F_M and Φ_{PSII} was on Day 17 (vs. Day 22 in the frozen control). The primary photosynthetic processes in ribitol-affected cultures were restored quickly. From initial values of about 0.4 (F_v/F_M) and 0.37 (Φ_{PSII}), they reached their maxima on Day 28 (about 0.65 F_v/F_M , and

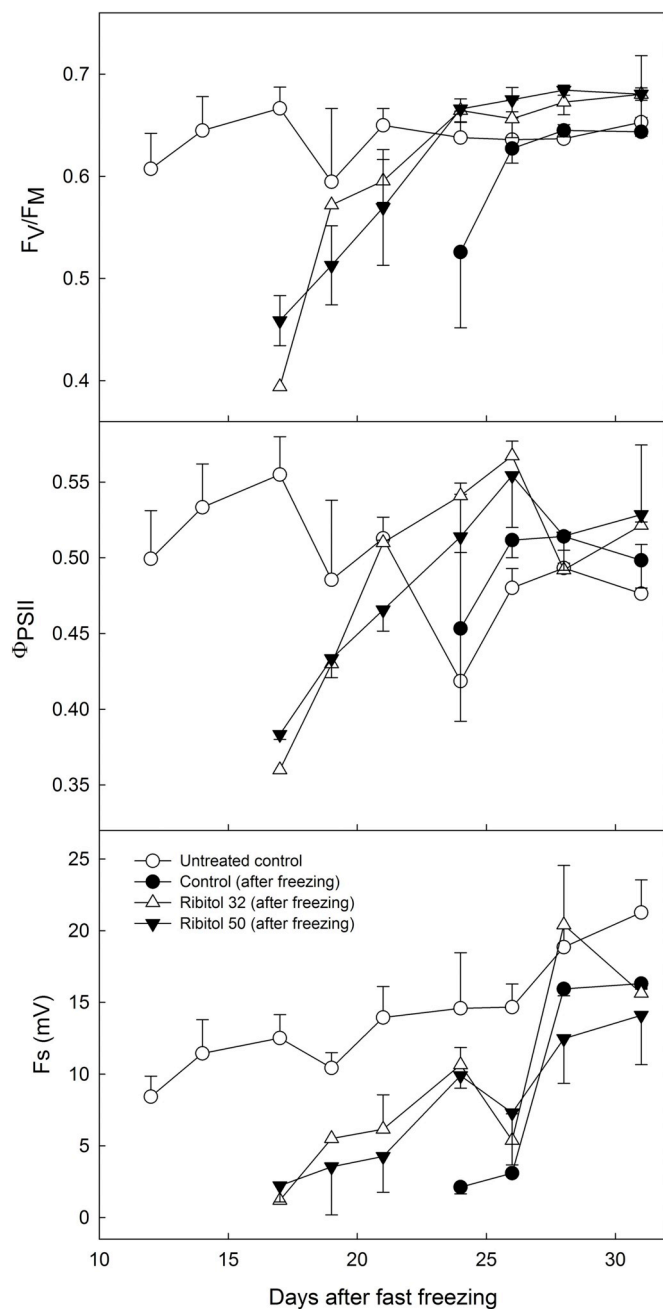


Fig. 5. Time courses of F_v/F_M , Φ_{PSII} , F_S (chlorophyll fluorescence signal, mV) during cultivation of *Heterococcus* inoculated on BBM agar after rapid freezing (day 0). The courses are presented for non-frozen control, frozen control, 32 mM and 50 mM ribitol treatments (for data points specification see the inset legend). Before Day 12, chlorophyll fluorescence parameters were not detectable due to low density of algal cells over the agar surface. For statistical analysis see Table 2.

0.5 Φ_{PSII}). Similarly, the first F_S detection was on Day 17. Over the time of cultivation, F_S increased in both the 32 and 50 mM cultures. Addition of ribitol brought the F_S values of 16, and 14 mV for R32 and R50 on Day 32.

5. Discussion

The viability of the *Heterococcus* sp. found on Day 9 (11.3%) was lower than for the *Trebouxia* sp., a symbiotic alga in chlorolichens, found on day 4 in a similarly designed experiment [27]. The study reported *Trebouxia* cell viability ranging from 20% to 69% in frozen

Table 2

Summary of statistical analysis of Chlorophyll fluorescence parameters presented in Fig. 5. Different letters represent statistically significant differences ($P = 0.05$) for the means (data points) calculated for particular days of cultivation (12, 14, 17, 19, 21, 24, 26, 28, 31).

	Treatment	Days after freezing									
		12	14	17	19	21	24	26	28	31	
F_v/F_M	Untreated control	e-h	f-j	ij	ef	g-j	g-j	g-j	g-j	h-j	
	Control (after freezing)						cd	f-i	f-j	f-j	
	Ribitol 32 (after freezing)			a	de	e-g	ij	h-j	j	j	
	Ribitol 50 (after freezing)			b	c	de	ij	ij	j	j	
Φ_{PSII}	Untreated control	d-i	f-i	g-i	c-h	e-i	a-c	c-h	c-i	c-g	
	Control (after freezing)						b-e	e-i	e-i	d-i	
	Ribitol 32 (after freezing)			a	d	e-i	g-i	i	a-d	e-i	
	Ribitol 50 (after freezing)			ab	a-d	c-f	e-i	h-i	e-i	f-i	
F_S	Untreated control	e-h	h-k	h-l	g-j	j-l	kl	kl	m	m	
	Control (after freezing)						b	a-c	l	l	
	Ribitol 32 (after freezing)			a	b-e	c-f	g-j	b-e	m	l	
	Ribitol 50 (after freezing)			b	a-d	a-d	f-i	d-g	i-l	j-l	

cultures of different species. This may indicate a lower viability in the *Heterococcus* sp. than in the *Trebouxia* sp. caused by a large extent of rapid freezing-induced intra- and extracellular injuries including cell wall and plasmalemma damage [32]. The species-specific difference in viability might be associated with different ecological niches of *Heterococcus* and *Trebouxia* and the differences in the freezing/thawing cycles that the algae undergo in the field. It was reported that cryoresistance differed significantly between the two groups of algae from contrasting polar habitats: snow algae (*Chlamydomonas*) and lichen symbiotic algae (lichen photobionts - *Trebouxia* sp.) [26].

The effects of rapid freezing on the slow Kautsky kinetics shape (i.e. time course), the values of particular signals and chlorophyll fluorescence parameters might be attributed to rapid changes caused by freezing of *Heterococcus* sp. chloroplasts, and the pigment protein complexes in thylakoid membranes in particular. These changes result in reducing significantly the energy transformation in photosystem II (see the lower F_M – Fig. 3, and F_v/F_M values – Fig. 4) and the processes involved in the photosynthetic linear electron transport chain (decreased F_M' , and Φ_{PSII}). The critical reduction in linear electron transport might be documented by: (1) limited drop in the chlorophyll fluorescence signal from F_P to F_I in the frozen sample, and (2) the small difference between F_P and F_S which is associated with the extremely limited reoxidation of the plastocyanin pool. Such a response is described also for the short-term effect of low and sub-zero temperatures on the shape of slow Kautsky kinetics in Antarctic lichens [43,47]. Typically, sub-zero temperature causes the ‘flattening’ of slow Kautsky kinetics between F_P and F_S chlorophyll fluorescence levels [47]. Generally, a polyphasic course of slow Kautsky kinetics recorded in the physiological temperature is caused by several co-acting processes [34]: the redox state of electron acceptors (Q_A in particular), the proportion between the photochemical and non-photochemical quenching of absorbed light energy, the changes in functioning of light harvesting complexes and the involvement of state transition between photosystems [44], and the limitation of ATP, NADPH by Calvin-Benson cycle.

As expected, rapid freezing led to negative changes in the chlorophyll fluorescence parameters related to PSII functioning. The reduction in F_v/F_M [50] and Φ_{PSII} is a well described phenomenon in algae exposed by sub-zero temperatures. In our experiment, part of PSII

remained functioning after rapid freezing and was able to contribute to photosynthetic linear electron transport since Φ_{PSII} had decreased to 29.1 (control), 27.0 (R32), and 25.8% (R50) of initial values recorded before freezing. This indicates resistance of primary photosynthetic processes to rapid freezing in the *Heterococcus* sp. Since the addition of ribitol led to a fall in NPQ in the frozen culture (compared to the control without ribitol), we may expect a positive role of the ribitol on the photosynthetic processes, i.e. a lower demand for activating of protective processes in response to freezing stress. No change in qF_0 (the ribitol treated versus the control culture) might be interpreted as ribitol effect having no effect on light harvesting complexes of PSII since qF_0 is attributed to any change in their structure and function [22]. Rapid freezing did not cause any change in qF_0 , in contrast to the increase which is reported for the *Trebouxia* sp. exposed to 0 °C for 30 days [4]. No effect of rapid freezing on qF_0 in the *Heterococcus* sp. might be attributed to the rapidity of freezing that did not allow the LHCs to change their conformation and functioning.

The time courses of F_V/F_M , Φ_{PSII} and F_S measured on *Heterococcus* sp. cultivated on agar revealed that the cultures became more vigorous over the time of cultivation (i.e. an increase in F_V/F_M , Φ_{PSII} and F_S values) reflecting the processes of producing new cells and the death of the cells damaged by rapid freezing. Moreover, added ribitol speeded up the recovery of F_V/F_M and Φ_{PSII} occurring between Days 18–22. The effect might be related to the positive role of ribitol in stabilizing photosystem II [46] that helped to reduce detrimental changes in PSII caused by rapid freezing.

The positive role of ribitol was seen on the chlorophyll fluorescence parameters in the *Heterococcus* sp. under freezing stress (see Figs. 4 and 5). In general, ribitol, and other polyols are synthesized by aeroterrestrial algae (see Refs. [24,25] for the *Trebouxia* sp.). They represent an integral part of biochemical protective strategies against water loss and sub-zero temperatures [31]. However, the interactions of polyols with intracellular macromolecules under stress are not completely understood. It is, however believed that the mechanisms could be similar to those activated in microalgae under desiccation stress.

Several mechanisms have been suggested for the role of polyols in the protection of the intracellular enzymatic system [6]. The mechanisms can be grouped into two basic types: (1) those that hypothesize the existence of direct solute-protein interactions; and (2) those that postulate that protein stability is mediated by solute-induced changes in water structure [59,72]. However, there is still little experimental evidence in green algae for any of these two types [31].

An increase in the *Heterococcus* sp. viability caused by the addition of ribitol (compared to the control, Day 7–14) might be attributed to its cryoprotective effect that helped a larger number of cells to survive than in the untreated control. Such a phenomenon is associated with the positive effects of ribitol on the stability and functioning of cell compartments in low and sub-zero temperatures as described e.g. for lichens [28]. The underlying mechanism is an osmotic adjustment to sub-zero temperatures and a consequent decrease in the ice nucleation temperature. In algae living in harsh, especially cold environments, many osmolytes are present in high concentrations [66]. For Antarctic *Heterococcus*, mannitol is reported as an osmoregulatory compound, the amount of which increases with extracellular osmotic stress [20]. The addition of 50 mM ribitol brought an increase in viability between Day 7 and Day 14, in contrast to the control and 32 mM ribitol treatment. The explanation might be in the likely higher vitality of surviving cells at 50 mM treatment and the resulting faster reproduction.

6. Concluding remarks

Recently, the intrathalline physical factors forming freezing resistance in lichens has been reviewed [30]. Among them, the role of loosely and tightly bound water fractions in freezing tolerance is studied. Main aspects are the rate of freezing of loosely bound water molecules; the active transfer of freezing from the loosely bound water

to a non-freezing one; the presence of tightly bound non-freezing water molecules; and the non-cooperative immobilization of supercooled bound water. These factors may play a role also in the dense colonies of terrestrial algae and/or communities forming microbiological mats in polar regions.

Acknowledgements

The authors thank the projects ECOPOLARIS project (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001708) and CzechPolar-I, II (LM2010009 and LM2015078) for providing facilities and the infrastructure used in the research reported in this study.

References

- [1] C. Andreoli, I. Moro, N. La Rocca, L.D. Valle, L. Masiero, N. Rascio, F. Dalla Vecchia, Ecological, physiological, and biomolecular surveys on microalgae from Ross Sea (Antarctica), Ital. J. Zool. 67 (sup.1) (2000) 147.
- [2] R.A. Armstrong, S.N. Smith, The levels of ribitol, arabitol and mannitol in individual lobes of the lichen *Parmelia conspersa* (Ehrh ex Ach), Ach. Environ. Exp. Bot. 34 (1994) 253–260.
- [3] R.J. Arnold, P. Convey, K.A. Hughes, D.D. Wynn-Williams, Seasonal periodicity of physical factors, inorganic nutrients and microalgae in Antarctic fellfields, Polar Biol. 26 (2003) 396–403.
- [4] T. Bayer, N.V. Alba, Temperature optima for growth and photosynthetic processes in *Trebouxia erici* isolated from an Antarctic lichen and cultivated in a temperature gradient, Czech Polar Rep. 7 (2017) 34–44.
- [5] H.W. Bischoff, H.C. Bold, Some Soil Algae from Enchanted Rock and Related Algal Species, University of Texas, Austin, TX, USA, 1963, pp. 1–95 Phycological studies 4 (1963).
- [6] M.A. Bisson, G.O. Kirst, Osmotic acclimation and turgor pressure regulation in algae, Naturwissenschaften 82 (1995) 461–471.
- [7] N. Borchhardt, C. Baum, T. Mikhailyuk, U. Karsten, Biological soil crusts of Arctic Svalbard – water availability as potential controlling factor for microalgal biodiversity, Front. Microbiol. 8 (2017) 1485.
- [8] P.A. Broady, The distribution of terrestrial and hydro-terrestrial algal associations at three contrasting locations in southern Victoria Land, Antarctica, Algal. Stud. 118 (2005) 95–112.
- [9] B.J. Cardinale, K.L. Matulich, D.U. Hooper, J.E. Byrnes, E. Duffy, L. Gamfeldt, P. Balvanera, M.I. O'Connor, A. Gonzalez, The functional role of producer diversity in ecosystems, Am. J. Bot. 98 (3) (2011) 572–592.
- [10] P. Cid-Aguero, J.L. Cuello, S. Ruiz, Growth and lipid profiles of the Antarctic snow microalga *Chlamydomonas* sp. in response to changes in temperature, photoperiod, salinity and substrate, An. Inst. Patagonia 45 (3) (2018) 45–58.
- [11] G. Cooper, G.C. Carroll, Ribitol as a major component of water-soluble leachates from *Lobaria oregana*, Bryologist 81 (1978) 568–572.
- [12] L. Dahlman, J. Persson, T. Nasholm, K. Palmqvist, Carbon and nitrogen distribution in the green algal lichens *Hypogymnia physodes* and *Platismatia glauca* in relation to nutrient supply, Planta 217 (2003) 41–48.
- [13] R.B. Darling, E.L. Friedmann, P.A. Broady, *Heterococcus endolithicus* sp. nov. (Xanthophyceae) and other terrestrial *Heterococcus* species from Antarctica: morphological changes during life history and response to temperature, J. Phycol. 23 (1987) 598–607.
- [14] M.C. Davey, Effects of Physical factors on the survival and growth of Antarctic terrestrial algae, Br. Phycol. J. 36 (1991) 315–325.
- [15] J.G. Day, Cryopreservation of microalgae and cyanobacteria, in: J.G. Day, G.N. Stacey (Eds.), Cryopreservation and Freeze-drying Protocols, Humana Press, 2007, pp. 141–151.
- [16] J. Elster, Ecological classification of terrestrial algal communities in polar environments, in: L. Beyer, M. Bölter (Eds.), Geocology of Antarctic Ice-free Coastal Landscapes, Springer-Verlag, 2002, pp. 303–326.
- [17] J. Elster, P. Degma, L. Kováčik, L. Valentová, K. Šramková, A.B. Pereira, Freezing and desiccation injury resistance in the filamentous green alga *Klebsormidium* from the Antarctic, Arctic and Slovakia, Biologia 63 (6) (2008) 839–847.
- [18] G. Feller, Life at low temperatures: is disorder the driving force? Extremophiles 11 (2) (2007) 211–216.
- [19] T. Friedl, M. Lorenz, The culture collection of algae at Göttingen University (SAG), A biological resource for biotechnological and biodiversity research, Procedia Environ. Sci. 15 (2012) 110–117.
- [20] S. Fujii, R. Yamamoto, S. Nakayama, S. Yasui, P.A. Broady, Effects of salinity on growth and content of intracellular solutes in *Heterococcus* sp. (Tribonematales, Xanthophyceae) from Antarctica, Phycol. Res. 47 (2) (2006) 65–69.
- [21] B.J. Fuller, Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state, Cryo-Letters 25 (6) (2004) 375–388.
- [22] B. Genty, J. Wonders, N.R. Baker, Non-photochemical quenching of F_0 in leaves is emission wavelength dependent: consequences for quenching analysis and its interpretation, Photosynth. Res. 26 (1990) 133–139.
- [23] G. González Garza, G. Mataloni, P. Fermiani, A. Vinocur, Ecology of algal communities of different soil types from Cierva, Polar Biol. 34 (2011) 339–351.
- [24] L. Gustavs, A. Eggert, D. Michalik, U. Karsten, Physiological and biochemical responses of aeroterrestrial green algae (Trebouxiophyceae) to osmotic and matric

- stress, *Protoplasma* 243 (2010) 3–14.
- [25] L. Gustavs, M. Görs, U. Karsten, Polyols as chemotaxonomic markers to differentiate between aeroterrestrial green algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), *J. Phycol.* 47 (2011) 533–537.
- [26] J. Hájek, P. Váczi, M. Barták, Photosynthetic electron transport at low temperatures in the green algal foliose lichens *Lasallia pustulata* and *Umbilicaria hirsuta* affected by manipulated levels of ribitol, *Photosynthetica* 47 (2) (2009) 199–205.
- [27] J. Hájek, P. Váczi, M. Barták, L. Jahnová, Interspecific differences in cryoresistance of lichen symbiotic algae of genus *Trebouxia* assessed by cell viability and chlorophyll fluorescence, *Cryobiology* 64 (2012) 215–222.
- [28] J. Hájek, P. Váczi, M. Barták, L. Smejkal, H. Lipavská, Cryoprotective role of ribitol in *Xanthoparmelia somloensis*, *Biol. Plant.* 53 (4) (2009) 677–684.
- [29] J. Hájek, M. Barták, J. Hazdrová, M. Forbelská, Sensitivity of photosynthetic processes to freezing temperature in extremophilic lichens evaluated by linear cooling and chlorophyll fluorescence, *Cryobiology* 73 (3) (2016) 329–334. Academic Press.
- [30] H. Haranczyk, A. Casanova-Katny, M. Olech, K. Strzalka, Dehydration and freezing resistance of lichenized fungi, in: V. Shukla, et al. (Ed.), *Plant Adaptation Strategies in Changing Environment*, Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2017, pp. 77–102.
- [31] A. Holzinger, U. Karsten, Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological, and molecular mechanisms, *Front. Plant Sci.* (2013), <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00327>.
- [32] R. Honegger, Lichen-forming fungi and their photobionts, in: H.B. Deising (Ed.), *The Mycota V*, Springer, Berlin Heidelberg, 2009, pp. 307–333 (Chapter 16).
- [33] S. Jiménez-Valera, M. del Pilar Sánchez-Saavedra, Growth and fatty acid profiles of microalgae species isolated from the Baja California Peninsula, México, *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 44 (4) (2016) 689–702.
- [34] H.M. Kalaji, G. Schansker, R.J. Ladle, V. Goltsev, K. Bosa, S.I. Allakhverdiev, M. Brestic, F. Bussotti, A. Calatayud, P. Dąbrowski, N.I. Elsheery, L. Ferroni, L. Guidi, S.W. Hogewoning, A. Jajoo, A.N. Misra, S.G. Nebauer, S. Pancaldi, C. Penella, D. Poli, M. Pollastrini, Z.B. Romanowska-Duda, B. Rutkowska, J. Seródio, K. Suresh, W. Szulc, E. Tambussi, M. Yannicari, M. Zivcak, Frequently asked questions about *in vivo* chlorophyll fluorescence: practical issues, *Photosynth. Res.* 122 (2014) 121–158.
- [35] L. Kalinina, Current state of the problem of cryopreservation of low eukaryotic organisms (unicellular algae and protozoa), *Cryobiology* (Kiev) 3 (1990) 12–18 (In Russian).
- [36] L. Kappen, Responses to extreme environments, in: V. Ahmadjian, M.E. Hale (Eds.), *The Lichens*, Academic Press, London, 1973, pp. 311–380.
- [37] J. Kvíderová, J. Hájek, R.M. Worland, The ice nucleation activity of extremophilic algae, *Cryo-Letters* 34 (2013) 137–148.
- [38] I. Lang, L. Hodac, T. Friedl, I. Feussner, Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection, *Plant Biol.* 11 (2011) 124.
- [39] H. Li, X. Liu, Y. Wang, H. Hu, X. Xu, Enhanced expression of antifreeze protein genes drives the development of freeze tolerance in an Antarctica isolate of *Chlorella vulgaris*, *Prog. Nat. Sci.* 19 (9) (2009) 1059–1062.
- [40] H.K. Lichtenthaler, C. Buschmann, M. Knapp, How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RfD of leaves with the PAM fluorometer, *Photosynthetica* 43 (2005) 379–393.
- [41] G.M. Lohrhorst, Taxonomic Studies in the Genus *Heterococcus* (Tribophyceae, Tribonematales, Heteropodiaceae). A Combined Cultural and Electron Microscopy Study, Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, New York, 1992 1–246.
- [42] B.R. Lyon, T. Mock, Polar microalgae: new approaches towards understanding adaptations to an extreme and changing environment, *Biology* 3 (2014) 56–80.
- [43] M. Marečková, M. Barták, Effects of short-term low temperature stress on chlorophyll fluorescence transients in Antarctic lichen species, *Czech Polar Rep.* 6 (1) (2016) 54–65.
- [44] S. Masoz, M. Hanikenne, B. Bailleul, N. Coosemans, M. Radoux, H. Miranda-Astudillo, P. Cardol, V. Larosa, C. Remacle, *In vivo* chlorophyll fluorescence screening allows the isolation of a *Chlamydomonas* mutant defective for NDUFAF3, an assembly factor involved in mitochondrial complex I assembly, *Plant J.* 92 (2017) 584–595.
- [45] R.M. Morgan-Kiss, J.C. Prisco, T. Pocock, L. Gudynaite-Savitch, N.P.A. Huner, Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70 (2006) 222–252.
- [46] T. Matthew, W. Zhou, J. Rupprecht, L. Lim, S.R. Thomas-Hall, A. Doebbe, O. Kruse, B. Hankamer, U.C. Marx, S.M. Smith, P.M. Schenk, The metabolome of *Chlamydomonas reinhardtii* following induction of Anaerobic H2 production by sulfur depletion, *J. Biol. Chem.* 284 (35) (2009) 23415–23425.
- [47] A. Mishra, J. Hájek, T. Tuháčková, M. Barták, K.B. Mishra, Features of chlorophyll fluorescence transients can be used to investigate low temperature induced effects on photosystem II of algal lichens from polar regions, *Czech Polar Rep.* 5 (2015) 99–111.
- [48] G.J. Morris, G.E. Coulson, K.J. Clarke, Freezing Injury in *Chlamydomonas*: a Synoptic Approach, *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*, Acad. Press, London, New York, 1981, pp. 390–399.
- [49] D.R. Nelson, Y.J. Tu, P.A. Lefevbre, *Heterococcus* sp. DN1 draft genome: focus on cold tolerance and lipid production, *Microbiome Sci. Med.* 1 (2013) 30–38.
- [50] A. Oukarroum, M. El Gharous, R.J. Strasser, Does *Parmelia tiliacea* lichen photosystem II survive at liquid nitrogen temperatures? *Cryobiology* 74 (2017) 160–162.
- [51] O.O. Parra, J. Redon, Aislamiento de *Heterococcus caespitosus* Vischer ficobionte de *Verrucaria maura* Wahlenb, *Bol. Soc. Biol. Concepcion* 51 (1977) 219–224.
- [52] H. Pitschmann, Vorarbeiten zu einer Monographie der Gattung *Heterococcus*, *Nova Hedwigia* 5 (1963) 487–531.
- [53] L. Raabová, L. Kováčik, Four aeroterrestrial algae grown at a special substrate of deglaciated coastal areas of Petuniabukta, Svalbard, *Czech Polar Rep.* 3 (2) (2013) 157–162.
- [54] J.A. Raymond, M.G. Janech, Ch Fritsen, Novel ice-binding proteins from a psychrophilic Antarctic alga (Chlamydomonadaceae, Chlorophyceae), *J. Phycol.* 45 (1) (2009) 130–136.
- [55] R.H. Reed, D.L. Richardson, W.D.P. Stewart, Osmotic responses of unicellular blue-green algae (cyanobacteria): changes in cell volume and intracellular solute levels in response to hyperosmotic treatment, *Plant Cell Environ.* 9 (1986) 25–31.
- [56] D.H.S. Richardson, D.C. Smith, Carbohydrate movement from the *Trebouxia* symbiont of *Xanthoria aureola* to the fungus, *New Phytol.* 67 (1968) 61–68.
- [57] S.A. Robinson, J. Wasley, A.K. Tobin, Living on the edge – plants and global change in continental and maritime Antarctica, *Global Change Biol.* 9 (2003) 1681–1717.
- [58] M. Rippin, N. Borchhardt, L. Williams, C. Colesie, P. Jung, B. Büdel, U. Karsten, B. Becker, Genus richness of microalgae and Cyanobacteria in biological soil crusts from Svalbard and Livingston Island: morphological versus molecular approaches, *Polar Biol.* 41 (2018) 909–923.
- [59] M.F. Roberts, Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms, *Saline Syst.* 1 (2005) 5.
- [60] N. Rybalka, R.A. Andersen, I. Kostikov, K.I. Mohr, A. Massalski, M. Olech, T. Friedl, Testing for endemism, genotypic diversity and species concepts in Antarctic terrestrial microalgae of the Tribonemataceae (Stramenopiles, Xanthophyceae), *Environ. Microbiol.* 11 (3) (2009) 554–565.
- [61] K.S. Siddiqui, R. Cavicchioli, Cold-adapted enzymes, *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 403–433.
- [62] K.A. Solhaug, D.P. Chowdhury, Y. Gauslaa, Short- and long-term freezing effects in a coastal (*Lobaria virens*) versus a widespread lichen (*L. pulmonaria*), *Cryobiology* 82 (2018) 124–129.
- [63] K. Starmach, Freshwater algae of the Thala Hills oasis (enderby Land, East Antarctic), *Pol. Polar Res.* 16 (3–4) (1995) 113–148.
- [64] J.H.M. Stoop, J.D. Williamson, D.M. Pharr, Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress, *Trends Plant Sci.* 1 (1996) 139–144.
- [65] M. Šabacká, J. Elster, Response of cyanobacteria and algae from Antarctic, *Polar Biol.* 30 (2006) 31–37.
- [66] A. Tartari, G. Forlani, Osmotic adjustments in a psychrophilic alga, *Xanthonema* sp. (Xanthophyceae), *Environ. Exp. Bot.* 63 (2008) 342–350.
- [67] D.N. Thomas, G.S. Dieckmann, Antarctic sea ice – a habitat for extremophiles, *Science* 295 (2002) 641–644.
- [68] T. Tonon, Y. Li, S. McQueen-Mason, Mannitol biosynthesis in algae: more widespread and diverse than previously thought, *New Phytol.* 213 (4) (2017) 1573–1579.
- [69] K. Trnková, M. Barták, Desiccation-induced changes in photochemical processes of photosynthesis and spectral reflectance in *Nostoc commune* (Cyanobacteria, Nostocales) colonies from polar regions, *Phycol. Res.* 65 (2017) 44–50.
- [70] E. Tschermak, Untersuchungen über die Beziehungen Von Pilz und Alge im flechtenthallus, *Oë sterr. Bot. Z.* 90 (1941) 233–307.
- [71] E. Tschermak-Woess, The algal partner, in: M. Galun (Ed.), *CRC Handbook of Lichenology*, vol. I, CRC Press, Boca Raton, 1988, pp. 39–92.
- [72] P.H. Yancey, Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses, *J. Exp. Biol.* 208 (2005) 2819–2830.

Publikace 6 (Příloha 7)

Orekhova A., Barták M., Özkar A., Elster J. (2019) The effect of shock freezing on physiological properties and consequent growth of Antarctic filamentous (*Stigeoclonium* sp.) and coccal alga (*Diplosphaera chodatii*) on agar plates. *Czech Polar Reports*, 9(1): 37-48. doi:10.5817/CPR2019-1-4.

The effect of shock freezing on physiological properties and consequent growth of Antarctic filamentous (*Stigeoclonium* sp.) and coccal alga (*Diplosphaera chodatii*) on agar plates

Alla Orekhova^{1*}, Miloš Barták¹, Aleyna Özkar², Josef Elster³

¹Department of Experimental Biology, Division of Plant Physiology and Anatomy, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

²Zonguldak Bulent Ecevit University, Molecular Biology and Genetics, Farabi Kampüsü, 67100 Zonguldak, Turkey

³Centre for Polar Ecology, Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, Na Zlaté stoce 3, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

Abstract

In this study, we investigated the effects of shock freezing on physiological properties and consequent growth of in the Antarctic alga *Stigeoclonium* sp. and comparative coccal alga *Diplosphaera chodatii* on agar plates. Culture of algae grown in liquid medium were used to study subzero temperatures on the species resistance to shock freezing. Then, microalgae were frozen in liquid nitrogen and inoculated on BBM agar after thawing. Physiological status of algae was evaluated by chlorophyll fluorescence parameters during 28 days. The results showed that interspecific differences existed in their tolerance to shock freezing, as well as their consequent growth rate on agars. Direct effects of freezing in liquid nitrogen was demonstrated in chlorophyll fluorescence parameters recorded immediately after thawing the samples (in liquid medium). In spite of the fact that majority of cells was destroyed by shock freezing, the potential of photochemical processes in PS II (F_V/F_M) remained constant in *D. chodatii*. It may indicate high resistance of the species to freezing/thawing cycles and a capability of the surviving cells, core chlorophylls in PS II respectively, to perform photosynthetic processes related to PS II. Contrastingly, *Stigeoclonium* sp. showed a shock freezing-dependent decrease in F_V/F_M . When shock-frozen, thawed and inoculated on agar plates, the culture of *D. chodatii*, and *Stigeoclonium* sp. showed cultivation time-dependent increase in chlorophyll fluorescence parameters (F_V/F_M , F_S).

Key words: Antarctica, cold stress, cryoresistance, algal cultures, biotechnologies

DOI: 10.5817/CPR2019-1-4

Received March 4, 2019, accepted June 5, 2019.

*Corresponding author: A. Orekhova <asp.sniish@mail.ru>

Acknowledgements: The authors are very grateful to the MŠMT projects ECOPOLARIS (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001708) and CzechPolar - I, II (LM2010009 and LM2015078) for providing facilities and the infrastructure used in the research reported in this study.

Symbols and abbreviations: BBM – Bold’s Basal Medium, ChF – chlorophyll fluorescence, KK – Kautsky kinetics of chlorophyll fluorescence, F_V/F_M – potential yield of photochemical photosynthetic processes in PS II, F_S – steady-state fluorescence, PS II - photosystem II, R_{Fd} - relative fluorescence decline (vitality ratio), qF_0 - quenching of background chlorophyll fluorescence

Introduction

It is well established that algae from the polar regions exhibit high cryoresistance. Typically, they have the ability to survive and cope well with repetitive freezing/thawing cycles. The ability and underlying mechanisms have been studied in polar terrestrial algae (*e.g.* Elster *et al.* 2008, Orekhova *et al.* 2018) and chlorolichens (*e.g.* Haranczyk *et al.* 2017). Several aspects of algal cryoresistance have been studied within the last few decades. Main emphasis has been given to their survival capacity under different freezing conditions (Hájek *et al.* 2012). In our recent study, we focused on photosynthetic parameters in two algae from James Ross Island, where long-term research of photosynthesis (both field and laboratory-based experiment) has been carried out since 2007. We addressed experimental freezing effects on *Diplosphaera chodatii* and *Stigeoclonium* sp. in order to prove cryoresistance of the two species.

Diplosphaera chodatii Bialosuknia (Bialosuknia 1909), is a unicellular green alga that is within the family Trebouxiophyceae (Thüs *et al.* 2011). It is a symbiotic alga of the lichens of genus *Dermatocarpon*. General features of *D. chodatii* has been reviewed by Doering (2017) recently. The species is a single-celled green alga growing also on rock at the interface between the water and the terrestrial environment around rivers and lakes. It is considered a terrestrial species, found in soil (Flechtner *et al.* 1998, Lukešová and Hoffmann 1996), wooden piers (Handa *et al.* 2001), and deserts (Flechtner *et al.* 2008). *D. chodatii* can be found free-living (Flechtner *et al.* 1998, Lukešová and Hoffmann 1996). As mentioned above, it forms a symbiosis with

a lichen-forming fungus, *Dermatocarpon luridum* (With.) Laundon (Fontaine *et al.* 2013) as well. Similarly, *D. chodatii* is believed to be the photobiont partner of the lichenised ascomycete *Dermatocarpon luridum* (Řeháková 1968, Fontaine 2013). *D. chodatii* is found to be associated with a wide-variety of lichen-forming fungi in the Verrucariaceae including species of *Staurothele*, *Endocarpon* Hedw., *Dermatocarpon*, *Verrucaria*, *Normandina* Nyl. (Thüs *et al.* 2011).

D. chodatii is a unicellular, rod-shaped green alga (Fontaine *et al.* 2012). The species is closely related to members of *Stichococcus Nägeli* (Thüs *et al.* 2011). Phylogenetically, it is also related to *Chlorella sphaerica* Tschermak-Woess (Karbovska and Kostikov 2012). It exhibits a wide variety of morphological shapes including micareoid and globose (Coppins 1983) as well as ovular/spherical and cylindrical (Fontaine *et al.* 2012, Stocker-Wörgötter and Türk 1989). Individual cells have rather oval, *i.e.* not perfectly round shape. They are approximately 4 – 8 μm long by 3 – 5 μm wide (Coppins 1983, Fontaine *et al.* 2012, Yahr *et al.* 2006). Cell wall is thin. The species occurs in groups of two to four cells typically. In some cases, the cell clusters may be surrounded by a gelatinous matrix (Stocker-Wörgötter and Türk 1989). It exhibits high desiccation tolerance which helps the species to survive up to two months of desiccation (Zhang and Wei 2011).

Stigeoclonium sp. is a filamentous, branched alga found in several well-hydrated terrestrial ecosystems in subantarctic islands, Antarctica (*e.g.* Pushparaj *et al.* 2004), specifically at the King George

Island (Mrozinska et al. 1998, Komárek and Komárek 1999) and the James Ross Island (Caisová et al. 2009). Occurrence of *Stigeoclonium* sp. was also recorded in winters in central Europe shallow wetlands (Machová et al. 2008). It grows in wet places like small-area freshwater lakes, streams and seepages. Recently, photosynthetic processes of *Stigeoclonium* sp. (EEL-004, collection in James Ross Island, Antarctica) have been studied by the approach of light response curves of effective quantum yield (Φ_{PSII}) and oxygen evolution rate (OER) - Váczi (2018). Genus *Stigeoclonium* contains a large number of species (about 80), although some critical revisions of *Stigeoclonium* (Francke and Simons 1984, Simons et al. 1986, Caisová et al. 2011) have reduced it to much lower number. The genus *Stigeoclonium* has been extensively studied particularly in relation to its morphology, reproduction, and cytology (e.g. Branco et al. 2002, Skinner and

Entwistle 2004, Michetti et al. 2010). Recently, selected species of *Stigeoclonium* genus are considered prospective for future biotechnologies, secondary compound production in particular, and tested (e.g. Liu et al. 2016a - for polyunsaturated fatty acids, Liu et al. 2016b - for large-scale biotechnologies).

In our study, we focused two aspects of physiology of two algae, one from the James Ross Island the other one from the Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCALA, Třeboň, Czech Republic). First, it was algal resistance to subzero temperature, shock freezing in particular and, secondly, the applicability of chlorophyll fluorescence technique to monitor growth and physiological status of algal culture during cultivation on agar plates. We hypothesized that interspecific differences would exist in their resistance to shock freezing, as well as their consequent growth rate on agars.

Material and Methods

Algal material

The *Diplosphaera chodatii* (CCALA strain No. 336) and *Stigeoclonium* sp. (EEL strain No. 004) were isolated from the samples from Netolice (Czech Republic) and the James Ross Island, Antarctica. *D. chodatii* was isolated by Lukešová in 1988 and then cultivated as stock culture on Bold's Basal Medium (BBM). *Stigeoclonium* sp. was isolated from water samples taken from the Big Lachman lake (NE of the James Ross Island). Big Lachman Lake is a typical coastal shallow lake located on a terrace at an altitude of about 9 m. Daily mean temperature of the lake measured at the depth of 50 cm ranges from -22°C (July) to +10°C (December/Jan-

uary). The samples of *Stigeoclonium* sp. were collected from lake bottom from the depth of 30 cm. Stock cultures of *D. chodatii* and *Stigeoclonium* sp. were used for experiments addressing species resistance to shock freezing (Fig. 1). The microalgae were cultivated in a 3 N inorganic Bold's Basal liquid Medium (BBM) in 100 ml glass flasks under continuous irradiation of $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation (PAR). The cultivation was static, the flasks were placed on racks in a cultivation box (Liebherr FKS 5002, Germany). Cultivation temperature was set to 10°C.

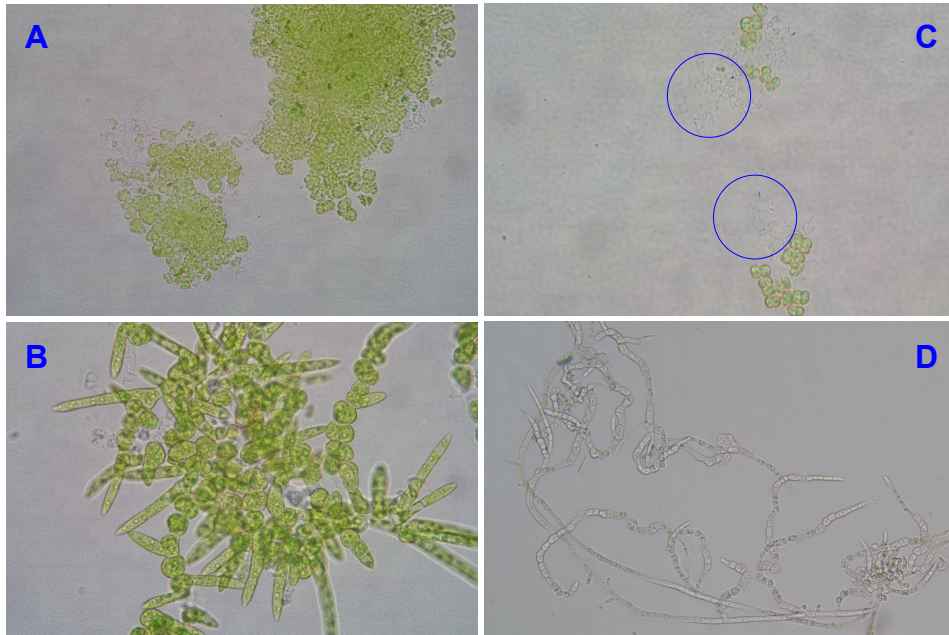


Fig. 1. Cell cultures of the experimental species *Diplosphaera chodatii* and *Stigeoclonium* sp. before (left sub-panels, A, B) and after shock freezing in liquid nitrogen (right sub-panels, C, D). The area of lysed cells in shock-frozen culture of *D. chodatii* is indicated by circles.

Experimental design

Shock freezing treatment

Experimental design and shock freezing were similar to that applied in previous study (Orekhova *et al.* 2018). Algal culture suspensions were pipetted into microcryovials (1.5 ml cryogenic tube with screw cap, BRAND[®], Germany) and used for experimental treatments (3 replicates). Samples were frozen by immersion into liquid nitrogen (-196°C) for 10 min. Then the cryovials with frozen algae were taken away from liquid nitrogen and thawed naturally at room temperature (23°C).

After the thawing (2 h in the target temperature of 23°C), liquid inoculum (0.5 ml) was spread uniformly on an agar plate (inorganic 3 N BBM medium with a 1.5% agar, Duchefa, the Netherlands, Prod. No. 1001.1000) with a glass rod (Day 1). The samples were cultivated in Petri dishes on agar plates for the following 28 days (3 dish-

es per treatment). During cultivation, the samples were exposed to a temperature of 10°C and a radiation of 15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, photoperiod was set to 16/8 h light/dark. The growth of the culture was checked regularly by optical microscopy (Olympus BX 41, Japan).

After a week of cultivation on agar plates, the number of living cells increased so that the chlorophyll fluorescence measurements could be taken (*i.e.* chlorophyll fluorescence signal was above the detection limit of the instrument - *see* below section). Therefore, the first measurement of slow Kautsky kinetics and quenching analysis of chlorophyll fluorescence could be taken on Day 7 after the inoculation of the culture (passing shock freezing and consequent thawing) on agar plates.

Chlorophyll fluorescence measurements

Chlorophyll fluorescence parameters were measured: before the experiment (*Diplosphaera chodatii* and *Stigeoclonium* sp. in liquid culture), after shock freezing and subsequent thawing of room temperature, and repeatedly after the inoculation of frozen culture on agar and the following growth, typically in 7 days interval. The changes in the physiological state of the algae cells during each cultivation period following shock freezing were evaluated by chlorophyll fluorescence, using a HFC-010 FluorCam (Photon Systems Instruments, Czech Republic). The Petri dishes with algal cultures were dark-adapted for

5 min. and slow Kautsky kinetics supplemented with quenching analysis were measured. The method and experimental set up optimized for lichens and described elsewhere was used (*see* Trnková and Barták 2017). From the curves, particular chlorophyll fluorescence signals (*see* Fig. 4), and the following chlorophyll fluorescence parameters were evaluated: the potential yield of photochemical photosynthetic processes in PS II (F_V/F_M), and steady-state fluorescence (F_S). The chlorophyll fluorescence parameters were used to assess: (1) direct effect of shock freezing, and (2) growth of inoculum after shock freezing.

$F_V/F_M = (F_M - F_0) / F_M$		Eqn. 1
$R_{Fd} = (F_P - F_S) / F_S$	(Lichtenthaler et al. 2004)	Eqn. 2
$qF_0 = (F_0 - F_0') / F_0$	(Bilger and Schreiber 1986)	Eqn. 3

Table 1. The chlorophyll fluorescence parameters used in this study. Equations and resources are shown.

Results and Discussion

Direct effects of freezing in liquid nitrogen was demonstrated in chlorophyll fluorescence parameters recorded immediately after thawing the samples (in liquid medium). In spite of the fact that majority of cells was destroyed by shock freezing, the potential of photochemical processes in PS II (F_V/F_M) remained constant in *D. chodatii* (Fig. 2). It may indicate high resistance of the species to freezing/thawing cycles and a capability of the surviving cells, core chlorophylls in PS IIs respectively, to perform photosynthetic processes related to PS II. Contrastingly, *Stigeoclonium* sp. showed a shock freezing-dependent decrease in F_V/F_M . If treated with sub-zero temperature, typical critical point for

primary photosynthetic processes related to PS II (of lichen symbiotic algae) ranges from -20°C to -25°C (Barták et al. 2007). Shock freezing brings destruction of majority of algal cells. Surviving cells, however, are capable of regrowth and reproduction and restoration of full photosynthetic capacity in terms of weeks (Orekhovala et al. 2018).

Destruction of cells by shock freezing is well documented by the decrease of steady state chlorophyll fluorescence signal (F_S) which is considered an equivalent for the amount of functioning chlorophyll molecules. The shock freezing-induced decrease reached 52% (of control) in *D. chodatii*, and 51% *Stigeoclonium* sp.

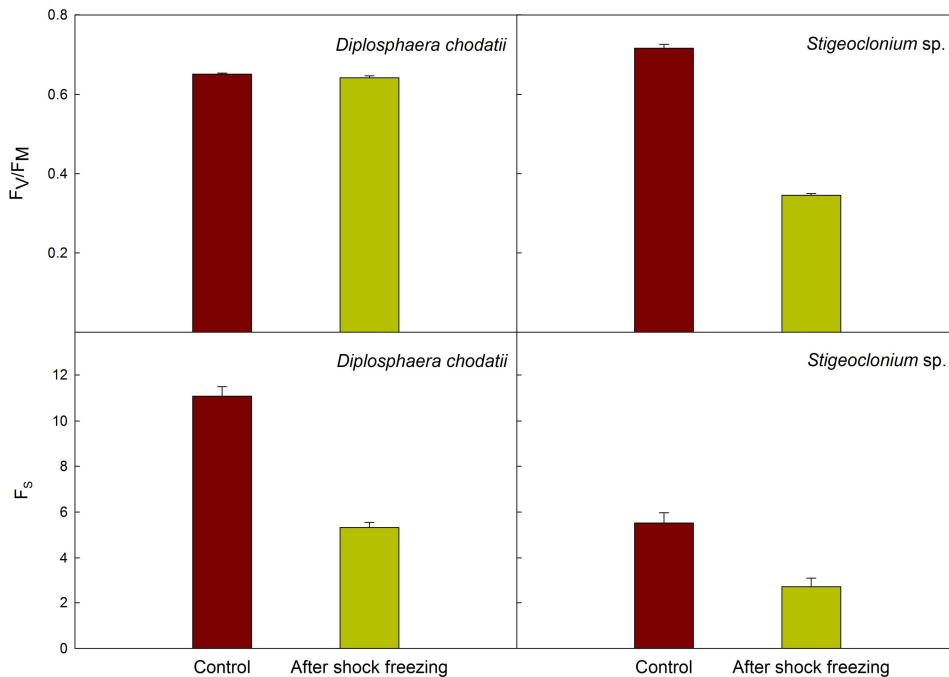


Fig. 2. Effects of shock freezing on F_v/F_M (potential yield of photochemical photosynthetic processes in PS II), and F_S (steady-state fluorescence). The two chlorophyll fluorescence parameters were recorded for control samples grown in liquid BBM medium, and then immediately after shock freezing and thawing.

The steady-state chlorophyll fluorescence (F_S) decrease is well documented in Fig. 2 that shows the effect of shock freezing. During further cultivation on agar plates, however, F_S increases with cultivation time (Fig. 3). *D. chodatii*, and *Stigeoclonium sp.* responded to shock freezing by changes in the shape of Kautsky kinetics and the values of the particular chlorophyll fluorescence signals F_M , F_P , F_S , F_M' , and F_M'' (see Fig. 4). Shock freezing also brought a change in R_{Fd} and qF_0 . R_{Fd} increased to 93% (*D. chodatii*) and 38% (*Stigeoclonium sp.*) of the initial values in the control (Fig. 5). For the two experimental species, similar increase in qF_0 was found (97 and 151%, respectively). The value of R_{Fd} increased thanks to shock freezing which is not consistent with other stressors that typically bring a decrease in R_{Fd} . The value decreases when the balance between

photochemical reactions in thylakoids and the rate of enzymatic reactions occurring in stroma chloroplasts is disturbed. As a result of the exposure to various stressors, an increase in F_S is observed at a relatively constant F_M value. Thereby, the difference $F_M - F_S$ decreases and, consequently, the R_{Fd} value decreases as well (Lichtenthaler et al. 2004). Shock freezing, however, destroys majority of chlorophyll molecules which results in overall decrease in chlorophyll fluorescence signal and a change in the shape of slow Kautsky kinetics. Therefore, the recorded changes in R_{Fd} induced by shock freezing are not comparable to the regulatory changes caused by other factors. The shock freezing-induced change in qF_0 , however, indicates some alternations in functioning of light harvesting complexes.

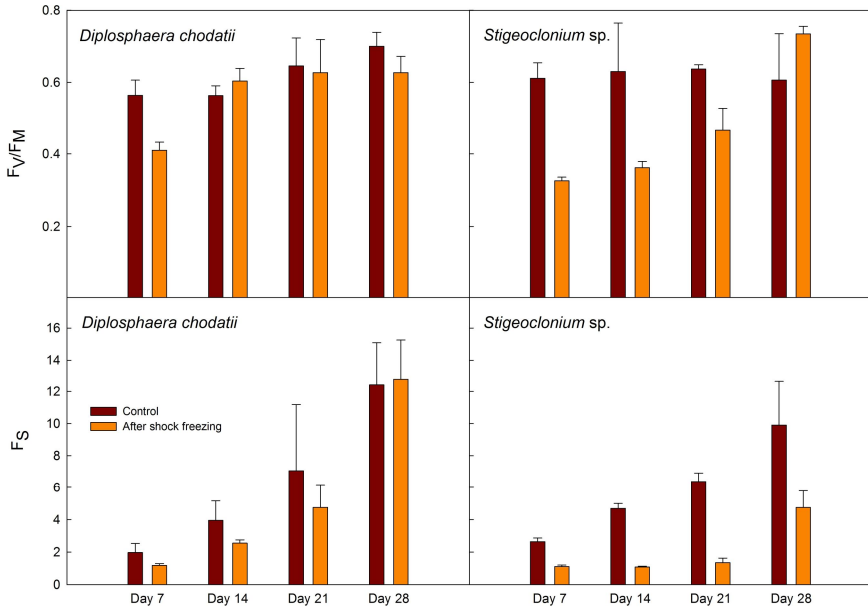


Fig. 3. Chlorophyll fluorescence parameters F_v/F_M and F_S recorded during the growth of the shock-frozen cultures of *Diplosphaera chodatii* and *Stigeoclonium sp.* on agar plates for 28 days.

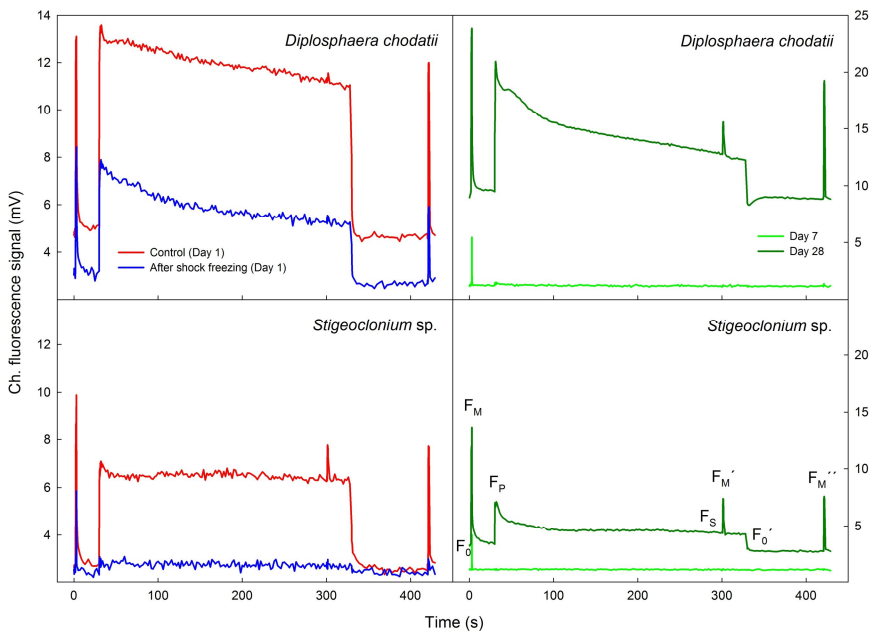


Fig. 4. Changes in the shape of slow Kautsky kinetics of chlorophyll fluorescence recorded in algal cultures of *Diplosphaera chodatii* and *Stigeoclonium sp.* grown in liquid BBM medium (left panels, the effect of shock freezing). The Kautsky kinetics recorded in the beginning (Day 7) and the end (Day 28) of cultivation of the algae on agar plates. Particular chlorophyll fluorescence signals are indicated.

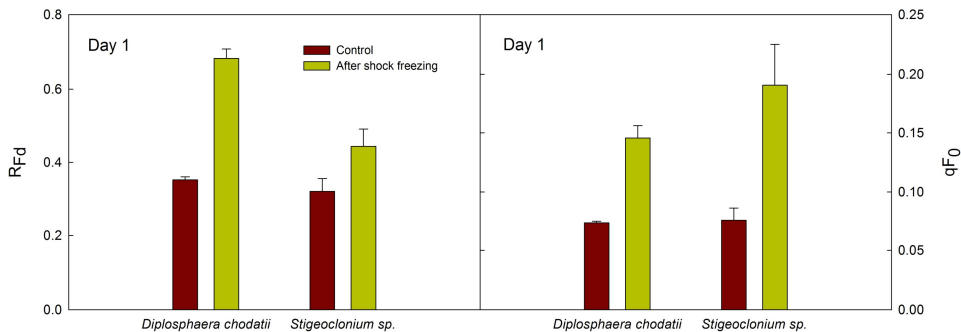


Fig. 5. Effects of shock freezing on Relative fluorescence decrease (R_{Fd}) and quenching of background chlorophyll fluorescence (qF_0). The two chlorophyll fluorescence parameters were recorded for control samples grown in liquid BBM medium, and then immediately after shock freezing and thawing.

Commonly, positive values of qF_0 are reached in plants since $0 < F_0' < F_0$. Exceptionally, when $F_0' > F_0$, qF_0 gives negative values. It is probably due to not fully re-oxidised PS II acceptor (Roháček 2002).

When shock-frozen, thawed and inoculated on agar plates, the cultures of *D. chodatii* and *Stigeoclonium sp.* showed cultivation time-dependent increase in chlorophyll fluorescence parameters (F_v/F_M , F_S). One week after the inoculation (Day 7), *D. chodatii* showed a decrease in F_v/F_M (in comparison to untreated control) attributed to the negative adjustment related to the change of medium from liquid to agar. However, with the following time of cultivation, F_v/F_M reached control values and remained more or less constant. *Stigeoclonium sp.*, contrastingly, showed much slower increase in F_v/F_M values in shock frozen inoculum in a course of time (Day 7 to Day 14), followed by a fast increase in the period from Day 21 to Day 28. Therefore, it reached control values 28 days after inoculation.

For steady state chlorophyll fluorescence (F_S) measured during the cultivation on agar plates (Fig. 3), there was no difference found between control and shock-frozen inoculum in *D. chodatii* (Day 28). The F_S values increased with the time of

cultivation similarly in both treatments which could be associated with similar rate of growth of control and shock freezing-treated *D. chodatii*. The F_S values, however, were lower on Days 7, 14, and 21. Control culture of *Stigeoclonium sp.* exhibited fast growth rate, because F_S increased in similar way as in *D. chodatii*. Shock freezing-treated culture of *Stigeoclonium sp.* reached 58% decrease in F_S value after a week cultivation (Day 7) on agar plates. Then, F_S increased with the time of cultivation, however, it was still substantially lower than in control. This might be explained as a consequence of negative effects of shock freezing on functioning of chloroplast photosynthetic apparatus (*cf.* also F_v/F_M). The underlying mechanism for such negative effects on photosynthetic processes and culture growth rate, however, remains unknown. Negative effect of potentially improper composition of growth medium might be excluded since the rate of growth (F_S -based) in control *Stigeoclonium sp.* was similar to that of *D. chodatii* (0.497 compared to 0.346 mV d^{-1}). In general, F_S time course of shock-frozen inoculum was comparable to the evidence gained for *Heterococcus sp.* in similarly-designed experiment (Orekhova *et al.* 2018).

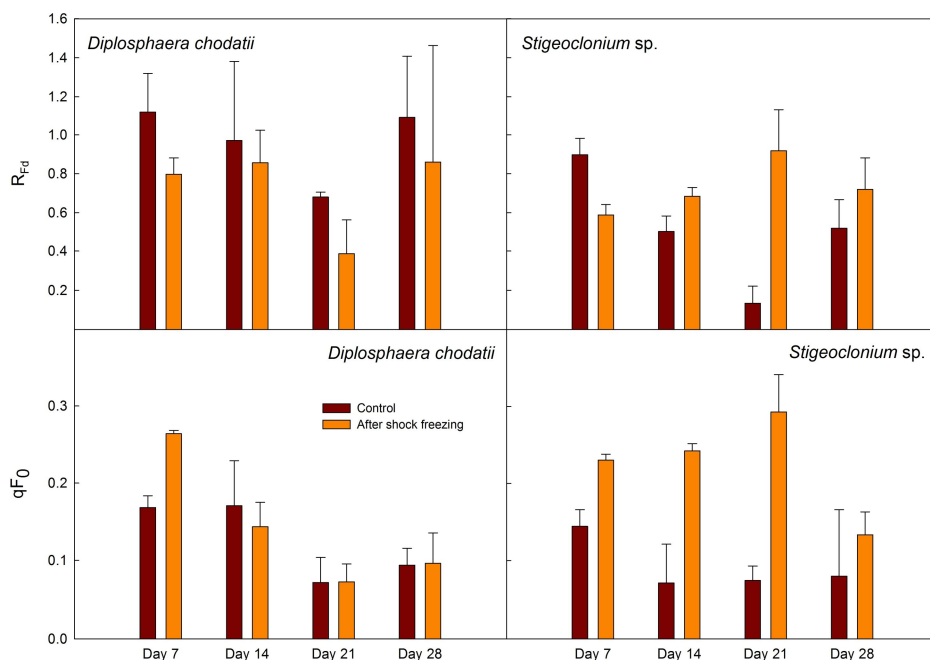


Fig. 6. Relative fluorescence decrease (R_{Fd}) and quenching of background chlorophyll fluorescence (qF_0) as dependent on cultivation time of *Diplosphaera chodatii* and *Stigeoclonium sp.* after inoculation on agar plates.

The effects of cultivation on agar plates on R_{Fd} and qF_0 values are shown in Fig. 6. The two parameters did not exhibit much change in *D. chodatii*. However, increase in R_{Fd} and qF_0 was apparent at the end of cultivation period (days 14-28) in *Stigeoclonium sp.* The reasons and underlying mechanisms remain unclear and will be addressed in one of the follow up studies.

Our experimental algae showed a high cryoresistance since they were capable of successful regrowth after shock freezing. This could be achieved thanks to cryoprotective mechanisms in microalgae from polar regions that have been overviewed by Lyon and Mock (2014). The mechanisms comprise mainly the maintenance of fluidity of cellular biomembranes under freezing temperature (long-term effect). Underlying mechanism is e.g. an increased con-

centration of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) which is well documented for chlorophytes (Fogliano et al. 2010, Chen et al. 2012). Polar microalgae do not only increase PUFA concentrations in cell membrane phospholipids, but also galactolipids integral to the chloroplast membrane (Morgan-Kiss et al. 2002). In psychrotolerant green alga, *Coccomyxa subellipsoidea*, the most enriched gene families of fatty acids synthases, elongases, lipases, and desaturases were found (Blanc et al. 2012). Moreover, in cryoresistant microalgae, several cryoprotectants play an important role. The amino acid proline is an abundant compatible solute in many cryophilic microalgae. Last but not least co-action with special proteins expressed in response to subzero temperature in polar microalgae should be mentioned.

References

- BARTÁK, M., VÁCZI, P., HÁJEK, J. and SMYKLA, J. (2007): Low-temperature limitation of primary photosynthetic processes in Antarctic lichens *Umbilicaria antarctica* and *Xanthoria elegans*. *Polar Biology*, 31: 47-51.
- BIALOSUKNIA, M.W. (1909): Sur un nouveau genre de pleurococccacées. *Bulletin la Société Bot. Geneve*, Série 2 1: 101-104. (In French).
- BILGER, W., SCHREIBER, U. (1986): Energy-dependent quenching of dark-level chlorophyll fluorescence in intact leaves. *Photosynthesis Research*, 10: 303-308.
- BLANC, G., AGARKOVA, I., GRIMWOOD, J., KUO, A., BRUEGGEMAN, A., DUNIGAN, D. D., GURNON, J., LADUNGA, I., LINDQUIST, E., LUCAS, S., PANGILINAN, J., PROSCHOLD, T., SALAMOV, A., SCHMUTZ, J., WEEKS, D., YAMADA, T., LOMSADZE, A., BORODOVSKY, M., CLAVERIE, J. M., GRIGORIEV, I. V. and VAN ETTEN, J. L. (2012): The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. *Genome Biology*, 13, doi:10.1186/gb-2012-13-5-r39.
- BRANCO, C. C. Z., NECCHI, O., JR. and BRANCO, L. H. Z. (2002): Taxonomy and ecological distribution of Chaetophoraceae (Chaetophorales, Chlorophyta) in lotic ecosystems from Sao Paulo State, southeastern Brazil. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie*, Supplement Volumes No. 106: 43-75. doi: 10.1127/algol_stud/106/2002/43.
- CAISOVÁ, L., KOMÁREK, J., ELSTER, J. and NEDBALOVÁ, L. (2009): Two freshwater filamentous, branched green algae, newly discovered to Antarctica. In: M. Barták, J. Hájek, P. Váczi (eds.): Structure and Function of Antarctic Terrestrial Ecosystems, Book of Abstracts and Contributed Papers, Conference, Brno, Oct. 22nd-23rd, 2009, Masaryk University Brno, pp. 14-20.
- CAISOVÁ, L., MARIN, B., SAUSEN, N., PRÖSCHOLD, T. and MELKONIAN, M. (2011): Polyphyly of *Chaetophora* and *Stigeoclonium* within the Chaetophorales, Chlorophyceae, revealed by sequence comparisons of nuclear-encoded SSU rRNA genes. *Journal of Phycology*, 47: 164-177.
- CHEN, Z., HE, C. and HU, H. (2012): Temperature responses of growth, photosynthesis, fatty acid and nitrate reductase in Antarctic and temperate *Stichococcus*. *Extremophiles*, 16: 127-133.
- COPPINS, B. J. (1983): A taxonomic study of the lichen genus *Micarea* in Europe. *Bulletin of British (Natural History)*, 11: 17-214.
- DOERING, J. A. (2017): An investigation of the spatial distribution and inference of dispersal method in the semi-aquatic lichenised green alga *Diplosphaera chodatii* around Payuk Lake, Manitoba. Master Thesis, Faculty of Graduate Studies of the University of Manitoba, Canada. 162 p.
- ELSTER, J., DEGMA, P., KOVÁČIK, L., VALENTOVÁ, L., ŠRAMKOVÁ, K. and PEREIRA, A.B. (2008): Freezing and desiccation injury resistance in the filamentous green alga *Klebsormidium* from the Antarctic, Arctic and Slovakia. *Biologia*, 63: 843-851.
- FLECHTNER, V. R., JOHANSEN, J. and CLARK, W. (1998): Algal composition of microbiotic crusts from the central desert of Baja California, Mexico. *Great Basin Naturalist*, 58: 95-311.
- FLECHTNER, V. R., JOHANSEN, J. R. and BELNAP, J. (2008): The Biological soil crusts of the San Nicolas Island: enigmatic algae from a geographically isolated ecosystem. *Western North American Naturalist*, 68: 405-436.
- FOGLIANO, V., ANDREOLI, C., MARTELLO, A., CAIAZZO, M., LOBOSCO, O., FORMISANO, F., CARLINO, P. A., MECA, G., GRAZIANI, G., RIGANO, V. D. M., VONA, V., CARFAGNA, S. and RIGANO, C. (2010): Functional ingredients produced by culture of *Koliella antarctica*. *Aquaculture*, 299: 115-120.
- FONTAINE, K. M., BECK, A., STOCKER-WÖRGÖTTER, E. and PIERCEY-NORMORE, M. D. (2012): Photobiont relationships and phylogenetic history of *Dermatocarpon luridum* var. *luridum* and related *Dermatocarpon* species. *Plants*, 1: 39-60.
- FONTAINE, K. M., STOCKER-WÖRGÖTTER, E., BOOTH, T. and PIERCEY-NORMORE, M. D. (2013): Genetic diversity of the lichen-forming alga, *Diplosphaera chodatii*, in North America and Europe. *Lichenologist*, 45: 799-813.

- FRANCKE, J. A., SIMONS, J. (1984): Morphology and systematics of *Stigeoclonium* Kützing (Chaetophorales). In: D. E. G. Irvine, D. M. John (eds.): Systematics of the green algae. Academic Press, London, pp. 363-377.
- HÁJEK, J., VÁČZI P., BARTÁK M. and JAHNOVÁ L. (2012): Interspecific differences in cryoresistance of lichen symbiotic algae of genus *Trebouxia* assessed by cell viability and chlorophyll fluorescence. *Cryobiology*, 64: 215-222.
- HANDA, S., NAKAHARA, M., NAKANO, T., ITSKOVICH, V. B. and MASUDA, Y. (2001): Aerial algae from southwestern area of Lake Baikal. *Hikobia*, 13(3): 463-472.
- HARANCZYK, H., CASANOVA-KATNY, A., OLECH, M. A. and STRZALKA, K. (2017): Dehydration and freezing resistance of lichenized fungi. In: V. Shukla, S. Kumar, N. Kumar (ed.): Plant Adaptation Strategies in Changing Environment. Springer Nature Singapore Pte Ltd., pp. 77-102.
- KARBOVSKA, V. M., KOSTIKOV, I. Y. (2012): *Chlorella sphaerica* and its position in the genus *Diplospira* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology. Ecology. 20: 34-42. doi:10.15421/011205. (In Ukrainian).
- KOMÁREK, O., KOMÁREK, J. (1999): Diversity of freshwater and terrestrial habitats and their oxyphototroph microflora in the Arctowski Station region, South Shetlands Islands. *Polish Polar Research*, 20(3): 259-282.
- LICHTENTHALER, H. K., BABANI, F. (2004): Light adaptation and senescence of the photosynthetic apparatus. Changes in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity. In: G. C. Papageorgiou, Govindjee (ed.): Chlorophyll Fluorescence: a Signature of Photosynthesis. Springer, Dordrecht. pp. 713-736.
- LIU, J., VANORMELINGEN, P. and VYVERMAN, W. (2016a): Fatty acid profiles of four filamentous green algae under varying culture conditions. *Bioresource Technology*, 200: 1080-1084.
- LIU, J., DANNEELS, B., VANORMELINGEN, P. and VYVERMAN, W. (2016b): Nutrient removal from horticultural wastewater by benthic filamentous algae *Klebsormidium* sp., *Stigeoclonium* spp. and their communities: From laboratory flask to outdoor Algal Turf Scrubber (ATS). *Water Research*, 92: 61-68.
- LUKEŠOVÁ, A., HOFFMANN, L. (1996): Soil algae from acid rain impacted forest areas of the Krušnéhory Mts. 1. *Algal communities*. *Vegetatio*, 125: 123-136.
- LYON B. R., MOCK T. (2014): Polar Microalgae: New Approaches towards Understanding Adaptations to an Extreme and Changing Environment. *Biology*, 3: 56-80.
- MACHOVÁ, K., ELSTER, J. and ADAMEC, L. (2008): Xanthophyceae assemblages during winter-spring flood: autecology and ecophysiology of *Tribonema fonticolum* and *T. monochloron*. *Hydrobiologia*, 600: 155-168. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9228-5>.
- MICETTI, K. M., LEONARDI, P. I. and CACERES, E. J. (2010): A comprehensive study of the life cycle of a South American population of *Stigeoclonium tenue* Chaetophorales, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 46: 997-1005.
- MORGAN-KISS, R., IVANOV, A. G., WILLIAMS, J., MOBASHSHER, K. and HUNER, N. P. A. (2002): Differential thermal effects on the energy distribution between photosystem II and photosystem I in thylakoid membranes of a psychrophilic and a mesophilic alga. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1561: 251-265.
- MROZINKSKA, T., OLECH, M. A. and MASSALSKI, A. (1998): Algae of ponds and a stream on moraines of Ecology Glacier (King George Island, South Shetland Islands, Antarctica). *Nova Hedwigia*, 67: 169-188.
- OREKHOVA, A., BARTÁK, M. and HÁJEK, J. (2018): Post rapid freezing growth of Antarctic strain of *Heterococcus* sp. monitored by cell viability and chlorophyll fluorescence. *Cryobiology*, 85: 39-46. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.10.004.
- PUSHPARAJ, B., PAPERI, R., SILI, C., PICCARDI, R., FARALONI, C., ENA, A. and TORZILLO, G. (2004): Antarctic micro-organisms for bioactive compound production: Isolation and characterization of cyanobacteria. In: P. Luporini, M. Morbidoni (eds.): Proceedings of the 5th PNRA Meeting on Antarctic Biology, Scientific and Technical Report Series, ISSN 1592-5064, pp. 11-18.
- ROHÁČEK, K. (2002): Chlorophyll Fluorescence Parameters: The Definitions, Photosynthetic Meaning, and Mutual Relationships. *Photosynthetica*, 40: 13-29.

- ŘEHÁKOVÁ, H. (1968): Lišejníkové řasy z rodu *Trebouxia*, *Diplosphaera* a *Myrmecia* (Flechtenalgen der Gattungen *Trebouxia*, *Diplosphaera* und *Myrmecia*). Ph.D. Thesis, Department of Botany, Charles University, Prague, Czech Republic. (In Czech).
- SIMONS, J., VAN BEEM, A. P. and DE VRIES, P. J. R. (1986): Morphology of the prostrate thallus of *Stigeoclonium* (Chlorophyceae, Chaetophorales) and its taxonomic implications. *Phycologia*, 25: 210-220.
- SKINNER, S., ENTWISLE, T. J. (2004). Non-marine algae of Australia: 5. Macroscopic Chaetophoraceae (Chaetophorales, Chlorophyta). *Telopea*, 10: 613-633.
- STOCKER-WÖRGÖTTER, E., TÜRK, R. (1989): The resynthesis of thalli of *Dermatocarpon minutum* under laboratory conditions. *Symbiosis*, 7: 37-50.
- THÜS, H., MUGLIA, L., PÉREZ-ORTEGA, S., FAVERO-LONGO, S.E., JONESON, S., O'BRIEN, H., NELSEN, M.P., DUQUE-THÜS, R., GRUBE, M., FRIEDL, T., BRODIE, J., ANDREW, C.J., LÜCKING, R., LUTZONI, F. and GUEIDAN, C. (2011): Revisiting photobiont diversity in the lichen family Verrucariaceae (Ascomycota). *European Journal of Phycology*, 46: 399-415.
- TRNKOVÁ, K., BARTÁK, M. (2017): Desiccation-induced changes in photochemical processes of photosynthesis and spectral reflectance in *Nostoc commune* (Cyanobacteria, Nostocales) colonies from polar regions. *Phycological research*, 65: 44-50.
- VÁCZI, P. (2018): Oxygen evolution rate in Antarctic filamentous alga *Stigeoclonium* sp. evaluated by optodes relates to chlorophyll fluorescence parameters. *Czech Polar Reports*, 8: 143-150.
- YAHR, R., VILGALYS, R. and DEPRIEST, P. T. (2006): Geographic variation in algal partners of *Cladonia subtenuis* (Cladoniaceae) highlights the dynamic nature of a lichen symbiosis. *New Phytologist*, 171: 847-860.
- ZHANG, T., WEI, J. (2011): Survival analyses of symbionts isolated from *Endocarpon pusillum* Hedwig to desiccation and starvation stress. *Science China Life Sciences*, 54: 480-489.