

УДК 547.42.577.121:582.232

А. Пуговкін^{1,2,3}, Й. Гаєк¹, Д. Джіордано¹, Й. Секерак¹, М. Бартак^{1*}

Міжвидові відмінності кріорезистентності автотрофних організмів полярних регіонів, визначені за флуоресценцією хлорофілу

UDC 547.42.577.121:582.232

A. Puhovkin^{1,2,3}, J. Hájek¹, D. Giordano¹, J. Sekerák¹, M. Bartak^{1*}

Cryoresistance Differences Between Species of Autotrops From Polar Regions Sensed by Chlorophyll Fluorescence

Реферат: Для побудови температурних кривих флуоресценції хлорофілу в експерименті з охолодженням при постійній швидкості від 20 до -45°C було обрано три види лишайників (*Xanthoria elegans*, *Umbilicaria cylindrica*, *Usnea sphacelata*) та представника екстремофільних ціанобактерій *Nostoc commune*. За допомогою модульованого флуориметра вимірювали два параметри флуоресценції хлорофілу (потенційний вихід фотосинтетичних процесів у фотосистемі II F_v/F_m та ефективний квантовий вихід Φ_{PSII}). Температурна відповідь II F_v/F_m і Φ_{PSII} мала S-подібну криву, яка складалася з плато (зниження температури від 20 до -5°C), спаду і плеча, що досягає критичної точки, та відповідала трьом фазам лінійного охолодження. Для всіх експериментальних зразків залежно від виду та параметра флуоресценції хлорофілу криві мали різну форму. Лишайник *U. cylindrica* виявився найбільш кріорезистентним відповідно до фотосинтетичних процесів, які відбуваються в тилакоїдній мембрані хлоропласта за від'ємної температури.

Ключові слова: флуоресценція хлорофілу, охолодження, кріорезистентність, лишайники, ціанобактерії, полярні регіони, фотосистема II, фотосинтез.

Abstract: Lichens from the cold regions of Earth exhibit high, but different degree of tolerance to drought and freeze stresses. Therefore, three lichen species *Xanthoria elegans*, *Umbilicaria cylindrica*, *Usnea sphacelata*, and a representative of extremophilic cyanobacteria *Nostoc commune* were selected to measure temperature response curves of chlorophyll fluorescence parameters in cooling experiment using a constant rate of cooling from 20 to -45°C . Two chlorophyll fluorescence parameters (F_v/F_m – potential yield of photosynthetic processes in photosystem II and Φ_{PSII} – effective quantum yield) were measured with a modulated fluorometer. For all experimental species, the temperature-response curves of II F_v/F_m and Φ_{PSII} showed typical triphasic shape: plateau (temperature decrease from 20 to -5°C), decline, and a shoulder reaching the critical point. The phase typically formed a S-curve of different shape as dependent on species and chlorophyll fluorescence parameter. *U. cylindrica* was the most cryoresistant in terms of photosynthetic processes ongoing in thylakoid membrane of chloroplast at below zero temperature.

Key words: chlorophyll fluorescence, cooling, cryoresistance, lichens, cyanobacteria, polar regions, photosystem II, photosynthesis.

Лишайники є невід'ємною частиною полярних екосистем, що демонструє стійкість до висушування та низькотемпературного впливу. Акліматизація лишайників залежно від виду має різні варіанти чутливості до температури [8].

Лишайники в полярних регіонах можна використовувати як біомонітори зміни клімату. В Антарктиці є визначена кількість їх видів, тому лишайники можуть бути зручним об'єктом для відстеження кліматичних впливів у просторовому та часовому вимірах [32]. Пов'язані зі зміною клімату коливання температури на

Lichens form an essential part of polar ecosystems and seem to be tolerant to dry and freeze stresses. Any acclimation processes in lichens are species-specific and there is a high degree of response variability and sensitivity to temperature in different species [8].

Lichens in the polar regions can be used as biomonitors for climate change, as there is a consistent number of species in Antarctica and they offer several excellent means to track climate effects at geographic and temporal scales [32]. Changing the temperature in Antarctic Peninsula due to climate

¹ Університет Масарика, Відділення експериментальної біології, м. Брно, Чеська Республіка

² Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

³ Державна установа Національний антарктичний науковий центр МОН України, м. Київ, Україна

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Каменіце, 5/C-13, м. Брно, Чеська Республіка 62500;
тел.: (+420) 549 49 3087
електронна пошта: mbartak@sci.muni.cz

Надійшла 20.12.2022

Прийнята до друку 27.02.2023

¹ Masaryk University, Department of Experimental Biology, Brno, Czech Republic

² Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

³ State Institution National Antarctic Scientific Centre of the Ministry of Education and Science, Kyiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

5/C-13, Kamenice str., Brno, Czech Republic 62500;
tel.: +420 549 49 3087
e-mail: mbartak@sci.muni.cz

Received 20, December, 2022

Accepted 27, February, 2023

Антарктичному півострові обумовлюють збільшення холодового стресу, що впливає на темп росту лишайників залежно від виду. У свою чергу, це призводить до втрати біорізноманіття [33]. Дослідження S.C. Schofield та співавт. [34] показало, що значна сезонна молекулярна акліматизація *Lobaria pulmonaria* відбувається в майже стабільній популяції клітин водоростей, яка не ділиться та зберігає фотосинтетичну здатність протягом багатьох років до зміни навколишнього середовища. Оскільки лишайники можуть легко переносити будь-які кліматичні явища в холодні періоди [5], тому їхня кріорезистентність є предметом постійних спостережень, зокрема з використанням кріобіологічних методів [7].

Одним із важливих напрямів вивчення холодостійкості автотрофів полярних регіонів є пошук організмів, здатних зберігати фотосинтетичну активність після експозиції в космічних умовах (у сухому стані). Наприклад, лишайник *Pleopsidium chlorophanum* (екстремофіл, який зростає в дуже холодних і сухих місцях на великій висоті) вижив і залишався фотосинтетично активним в умовах «марсіанської ніші» та фізіологічно адаптувався, збільшуючи свою фотосинтетичну активність протягом 34 діб [36]. Лишайники та інші симбіотичні системи широко використовуються як модельні організми для астробіологічних досліджень завдяки їхній здатності адаптуватися до суворих умов навколишнього середовища [24, 31].

Можна виділити дві основні групи сучасних досліджень: *in situ* (вивчення холодостійкості лишайників у природних умовах) і *ex situ* (лабораторні експерименти, зокрема програмне охолодження та вивчення його впливу на продуктивність фотосинтезу). Серед переваг першої групи досліджень можна відзначити можливість оцінювання потенційної активності фотосистеми II (PSII) та холодостійкості під снігом за природною температурою талому та кліматом. Так, C.W. Dodge [26] дослідив фотосинтетичну продуктивність *Xanthoria mawsonii* в умовах зовнішнього освітлення та весняної температури.

Друга група досліджень є більш поширеною, що обумовлено здатністю лишайників зберігати свою фотосинтетичну активність після збору і висушування. Тому лишайники є придатним об'єктом для транспортування та експериментів у лабораторії.

J.W. Bjerke [6] вивчав вплив снігового покриття, льоду та експозиції на повітрі на зволожені кормові лишайники північного оленя, які піддавалися перепадам температури від вище до

changes is determining an increase of cooling stress that is affecting lichens growth in different rates related to species, having an ecological impact that would also mostly cause a biodiversity loss [33]. Studies by Schofield *et al.* [34] show that large seasonal molecular acclimation in *Lobaria pulmonaria* occurs within a nearly stable, nondividing algal cell population that maintains photosynthetic capacity through many years of changing environmental cues. As any climate events in cold time may be readily tolerated by lichens [5], their cryoresistance and underlying mechanisms are under a close attention of researchers. Nowadays, translational cryobiology is applied in many laboratory processes [7].

One of the important directions in studies of the cold tolerance of autotrophic organisms from polar regions is searching for the organisms capable to maintain photosynthetic activity after their exposure to space condition (in dry state). For example, the lichen *Pleopsidium chlorophanum* (an extremophile that lives in very cold, dry, high-altitude habitats) survived and remained photosynthetically active under Martian niche condition and adapted physiologically by increasing its photosynthetic activity over 34 days [36]. Lichens and other symbiotic systems are widely used as model organisms for astrobiology studies, for their ability to cope with harsh environmental conditions [24, 31].

There are two main groups of recent studies: *in situ*, *i. e.* investigating the cold tolerance of lichens under natural conditions and *ex situ* meaning laboratory experiments, particularly programmed cooling and its effect on the photosynthetic performance. Among the advantages of the first group is an opportunity to evaluate the potential PSII activity and cold resistance under snow according to the natural thallus temperature and climatic conditions. So, C.W. Dodge has investigated a photosynthetic performance of *Xanthoria mawsonii* under ambient light and temperature conditions during spring [26].

The second group of the researches seems to be more frequent, especially when taking into account that lichens keep their photosynthetic performance being collected and dried and so are suitable object to be transferred and investigated in the laboratory.

J.W. Bjerke studied the effects of snow cover, ice encapsulation and air exposure on hydrated terricolous reindeer forage lichens subjected to temperature drops from above 0°C to well below freezing [6]. Physiological parameters of the lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. were measured after freezing of air-dried samples and short-term storage (15,



значно нижче 0°C. Фізіологічні показники лишайника *Evernia prunastri* (L.) Ach вимірювали після заморожування висушених на повітрі зразків і короточасного зберігання (15, 30 і 90 діб). L. Paoli та співавт. [27] дійшли висновку, що ці лишайники залишаються життєздатними.

Одним з методів оцінки кріорезистентності лишайників є вимірювання флуоресценції хлорофілу під час лінійного охолодження від 20 до -50°C із постійною швидкістю 2°C хв⁻¹. За допомогою цього методу було визначено міжвидові відмінності критичної температури первинних фотохімічних процесів фотосинтезу для *Usnea antarctica*, *Usnea aurantiaco atra* та *Umbilicaria cylindrica* [12]. M. Marečková та співавт. [21] виміряли параметри флуоресценції хлорофілу в *Dermatocarpon polyphyllizum* під час лінійного охолодження від 22 до -40°C. Фотосинтетичні відповіді на мінусову температуру оцінювали для симбіотичної водорості *Trebouxia sp.*, яка піддавалася лінійному охолодженню від фізіологічної (20°C) до мінусової температури (-30°C). Індуковане охолодженням зниження потенціалу (F_v/F_m) і ефективного квантового виходу PSII (Φ_{PSII}) були трифазними, показуючи «швидке–повільне–швидке» зниження двох параметрів флуоресценції Chl з падінням температури [13].

Повільні перехідні процеси флуоресценції хлорофілу в антарктичних лишайниках вимірювали під час повільного охолодження талому від 20°C до 5, 0 і -5°C з 20-хвилинною акліматизацією за кожної температури [23]. Їх вимірювання в *Rhizoplaca melanophthalma*, *Umbilicaria antarctica*, *Xanthoria elegans* були доповнені імпульсами насичення для аналізу параметрів флуоресценції хлорофілу (максимальний вихід PSII F_v/F_m). У дослідженнях параметри фотосинтезу *U. antarctica* та *X. elegans* вимірювали в діапазоні температур від -20 до 10°C за допомогою системи флуориметричної візуалізації [3]. Результати показали, що ці антарктичні види лишайників добре пристосовані до від'ємних температур і здатні здійснювати первинний фотосинтез при -15°C. Крім того, існує досить велика група робіт, присвячених оцінці та поясненню міжвидових відмінностей висихання та холодостійкості лишайників. T. Backhaus та співавт. [2] показали швидке відновлення фотосинтетичної активності лишайників *Circinaria gyrosa* та *Buellia frigida* після висихання та мінусових температур. K.A. Solhaug та співавт. [35] за допомогою методу флуоресценції хлорофілу вивчали морозостійкість полярних лишайників *Lobaria virens* і *Lobaria pulmonaria*. Продук-

30 and 90 days). L. Paoli *et al.* [27] concluded that lichens remained healthy.

Measurement of the chlorophyll fluorescence parameters during linear cooling is one of the methods to estimate the lichens cryoresistance. The method exploits cooling from 20 to -50°C at a constant rate of 2°C min⁻¹ and combines it with simultaneous measurements of chlorophyll fluorescence parameters. In this approach, the differences between species in the critical temperature for primary photochemical processes of photosynthesis were evaluated for *Usnea antarctica*, *Usnea aurantiaco atra*, and *Umbilicaria cylindrica* [12]. Marečková *et al.* [21] measured the chlorophyll fluorescence parameters in *Dermatocarpon polyphyllizum* during linear cooling from 22 to -40°C. Photosynthetic responses to sub-zero temperature were evaluated for symbiotic alga *Trebouxia sp.* exposed to linear cooling from physiological (20°C) to sub-zero temperature (-30°C). The cooling-induced decrease in potential (F_v/F_m) and effective quantum yield of PSII (Φ_{PSII}) were triphasic, showing a fast-slow-fast decline of the two Chl fluorescence parameters with temperature fall [13].

Slow chlorophyll fluorescence transients in Antarctic lichens were measured during slowly cooling of thallus from 20°C to 5, 0 and -5°C with 20-minute acclimation at each temperature [23]. Their measurements in *Rhizoplaca melanophthalma*, *Umbilicaria antarctica*, *Xanthoria elegans* were supplemented with saturation pulses for the analysis of chlorophyll fluorescence parameters (maximum yield of PSII photochemistry F_v/F_m). Photosynthetic parameters of *U. antarctica* and *X. elegans* were measured within the temperature range from -20 to 10°C by a fluorometric imaging system in the research [3]. The results showed that these Antarctic lichen species were well adapted to sub-zero temperatures and capable of performing primary photosynthesis at -15°C. Moreover, there is a rather large group of papers devoted to the evaluation and explanation of interspecific differences in desiccation and cold tolerance in lichens. Results of T. Backhaus *et al.* [2] reveal fast recovery of photosynthetic activity of lichens *Circinaria gyrosa* and *Buellia frigida* after desiccation and subzero temperatures. Freezing tolerance of polar lichens *Lobaria virens* and *Lobaria pulmonaria* using chlorophyll fluorescence technique was studied by K.A. Solhaug *et al.* [35]. The performance of the photosynthetic light reaction of isolated photobionts of different lichen species (*Usnea lambii*, *Pleopsidium chlorophanum*, *B. frigida*, *Umbilicaria decussata*, *U. antarctica*; *Fulgensia bracteata*) was compared with their



тивність фотосинтетичної світлової реакції ізольованих фотобіонтів різних видів лишайників (*Usnea lambii*, *Pleopsidium chlorophanum*, *B. frigida*, *Umbilicaria decussata*, *U. antarctica*, *Fulgensia bracteata*) порівнювали з їхньою реакцією на низькі температури та висихання [30]. Міжвидові відмінності в толерантності до висихання деяких лишайників також вивчали А. Puhovkin та співавт. [28].

Стійкість до замерзання та висихання екстремофільних автотрофних організмів вивчали М. Šabacká та співавт. [29]. Міжвидові відмінності кріорезистентності *Trebouxia asymmetrica*, *Trebouxia jamesii*, *Trebouxia glomerata*, *Trebouxiaaerici*, *Trebouxia irregularis* були виявлені після шокowego заморожування та подальшого культивування [14]. F. Míguez та співавт. [22] визначили загальні моделі акліматизації симбіотичних і вільноживучих *Trebouxiophyceae* в умовах охолодження та фотоохолодження. Було досліджено видоспецифічні реакції європейських лишайників *Lasallia pustulata* (L.) Mérat і *Umbilicaria hirsuta* (Sw. ex Westr.) Hoffm. на дегідратацію талому, спричинену осмотичним стресом у поєднанні з впливом низької температури [11]. J. Hájek та співавт. [15] також досліджували вплив рибітолу на фотохімічні процеси у фоліозних лишайниках (*L. pustulata* (L.) Mérat, *U. hirsuta* (Sw. ex Westr.) Hoffm.) за низької температури.

Мета дослідження — оцінка безпосереднього впливу низьких температур на флуоресценцію хлорофілу в автотрофних організмах із полярних регіонів, які є контрастними морфологічними екотипами хлоролишайників (*X. elegans*, *U. cylindrica*, *Usnea sphacelata*) та екстремофільних ціанобактерій (*Nostoc commune*).

Матеріали та методи

У роботі застосували метод лінійного охолодження для встановлення зв'язку з попередніми дослідженнями лишайників із полярних регіонів. Автори очікували визначити видоспецифічні відмінності у кріорезистентності, оцінені за фотосинтетичною продуктивністю (контрольованою кількома параметрами флуоресценції Chl). Дослідження зосереджене на побудові кривих температурної реакції та аналізі параметрів первинних фотосинтетичних процесів F_v/F_m та Φ_{PSII} протягом лінійного охолодження.

Дослідні види. Для вимірювання кривих температурної реакції параметрів флуоресценції хлорофілу використовували декілька екстремофільних автотрофних організмів: *X. elegans*, *U. cylindrica*, *U. sphacelata*, *N. commune*. Три види лишайників були відібрані для експериментів

response to low temperatures and desiccation [30]. Interspecific differences in desiccation tolerance of several lichens were also studied [28].

Freezing and desiccation tolerance in extremophilic autotrophic organisms was studied by M. Šabacká *et al.* [29]. Interspecific differences in cryoresistance of *Trebouxia asymmetrica*, *Trebouxia jamesii*, *Trebouxia glomerata*, *Trebouxiaaerici* and *Trebouxia irregularis* were found after shock freezing and consequent cultivation [14]. F. Míguez *et al.* [22] identified general patterns of acclimation in symbiotic and free-living *Trebouxiophyceae* under chilling and photochilling. Species-specific responses of european lichens *Lasallia pustulata* (L.) Mérat, and *Umbilicaria hirsuta* (Sw. ex Westr.) Hoffm. to dehydration caused by osmotic stress combined with the effect of low thallus temperature were studied [11]. J. Hájek *et al.* [15] also investigated the effect of ribitol on photochemical processes of photosynthesis in foliose lichens (*L. pustulata* (L.) Mérat., *U. hirsuta* (Sw. ex Westr.) Hoffm.) at low temperature.

The aim of the present study was to evaluate the direct effects of subzero temperatures on chlorophyll fluorescence in autotrophic organisms from polar regions that represented contrasting morphological chlorolichen ecotypes or extremophilic cyanobacteria: *X. elegans*, *U. cylindrica*, *Usnea sphacelata*, *Nostoc commune*.

Materials and methods

To compare with the already existing experimental evidence, we applied the linear cooling method so that we would be able to relate to the results of former studies in the lichens from polar regions. In our study, we expected species-specific differences in cryoresistance evaluated by photosynthetic performance (monitored by several Chl fluorescence parameters). We focused on plotting the temperature response curves and analysis of the parameters of primary photosynthetic processes F_v/F_m and Φ_{PSII} under effect of linear cooling.

Experimental species. Several extremophilic autotrophic organisms were used to measure the temperature response curves of chlorophyll fluorescence parameters: *X. elegans*, *U. cylindrica*, *U. sphacelata*, *N. commune*. The three lichen species were selected for the experiments focused on their cryoresistance because they represented contrasting morphological chlorolichen morphotypes: foliose (*U. cylindrica*), and fruticose (*U. sphacelata*) from polar regions. Moreover, colonies of *N. commune* were used as representatives of extremophilic cyanobacteria (see Fig. 1). The selected species were cho-



з вивчення їхньої кріорезистентності, оскільки вони представляють контрастні морфологічні будови морфотипів хлоролишайників: листяний (*U. cylindrica*) і куцистий (*U. sphacelata*) з полярних регіонів. Крім того, колонії *N. commune* використовували як представників екстремофільних ціанобактерій (рис. 1). Дані види були обрані для експериментів, тому що вони займають схожі екологічні ніші, незважаючи на різну морфологічну структуру. *N. commune* була обрана для експерименту в якості порівняльного виду, подібно до дослідження J. Hájek та співавт. [14].

Збір та обробка проб. *X. elegans* був зібраний в Антарктиці, на острові Джеймс Росс (63°48'50"S, 57°49'53"W). Місце збору розташоване на кам'янистому полі (висота 55 м над рівнем моря), яке утворювало обрані полігони з неглибокими западинами по краях. *X. elegans* переважно знаходили там за наявності води, що утворюється в цих западинах у період південного літнього сезону.

Таломи *U. sphacelata* збирали в місцевості Hallozetes Valley (63°47'52"S, 57°49'12"W). Як правило, таломи *U. sphacelata* збирали з верхньої частини каменів (розміром 15–60 см), що утворюють поверхню кам'янистого льодовика на висоті 220 м над рівнем моря.

Колонії *N. commune* були зібрані з просочування, розташованого на підніжжі, що межує з плоскою долиною (63°48'14"S, 57°53'01"W) на висоті 20 м над рівнем моря.

Талом *U. cylindrica* збирали на Шпіцбергені у долині Munindalen (78°40'09.4"N 16°10'25.9"E) на висоті 80–100 м над рівнем моря, а талом *U. cylindrica* — з кам'яних поверхонь на рівні землі.

Після збору таломи лишайників і колонії *N. commune* висушували природним шляхом (тінь, вітряне місце поблизу станції J.G. Mendel) та транспортували до Європи. Зібрані зразки зберігали сухими в холодильнику за 5°C. Перед експериментами їх змочували протягом 24 годин демінералізованою водою при 5°C і слабкому освітленні 10 ммоль м⁻²·с⁻¹ фотосинтетичного активного випромінювання (PAR). Після регідратації та повного відновлення фотосинтетичних процесів (що було перевірено за F_v/F_m) для експериментів з охолодженням використовували таломи, які демонструють максимальні значення F_v/F_m .

Протоколи охолодження та флуоресценція хлорофілу. Для оцінки видоспецифічної стійкості лишайників до від'ємних температур використовували метод визначення критичної тем-

sen for the experiments because they occupy similar ecological niches, in spite of their different morphology. Colonial *N. commune* was selected for the study as comparative species, similarly to the study of J. Hájek *et al.* [14].

Sample collection and handling. The *X. elegans* was collected in Antarctica, James Ross Island (63°48'50"S, 57°49'53"W). Site of collection was located in a stony field (altitude 55 m a.s.l.) forming sorted polygons with shallow depressions along their margins. *X. elegans* was preferentially found there because of availability of liquid water formed in these depressions during austral summer season.

Thalli of *U. sphacelata* were collected from the locality Hallozetes Valley (63°47'52"S, 57°49'12"W). Typically, thalli of *U. sphacelata* were collected from the upper part of stones (sized 15–60 cm) forming a surface of a stony glacier. Thalli were collected from the altitude of 220 m a.s.l.

Colonies of *N. commune* were collected from a seepage located on a foothill bordering with a shallow valley (63°48'14"S, 57°53'01"W) at the altitude of 20 m a.s.l.

Thalli of *U. cylindrica* were collected from Svalbard, the valley of Munindalen (78°40'09.4"N 16°10'25.9"E, the altitude of 80–100 m a.s.l. The *U. cylindrica* thalli were collected from stone surfaces, close to ground level.

After collection, the lichen thalli and *N. commune* colonies were dried out naturally (shade, windy place close to the J.G. Mendel station), then transported to Europe in a dry state. The collected samples were kept dry in a fridge at 5°C. Before experiments, they were wetted for 24 h by a demineralized water at 5°C and dim light 10 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation (PAR). After rehydration and full restoration of photosynthetic processes (checked by F_v/F_m) the thalli showing maximal values of F_v/F_m were used for the cooling experiments.

Cooling protocols and chlorophyll fluorescence. To evaluate species-specific resistance to subzero temperature, the method described by J. Hájek *et al.* was used to estimate the critical cooling temperature for photosynthetic processes of the samples [12].

The Planer Kryo 10 series chamber (Planer, Great Britain) linked to a 20 l Dewar flask with liquid nitrogen was used to cool the samples of extremophilic autotrophic organisms. Cooling protocol started from 20 (initial temperature), and ended at –50°C at a constant rate of 2°C·min⁻¹. Lichen thallus temperature was monitored by a built-in thermocouple. Before cooling, an indivi-

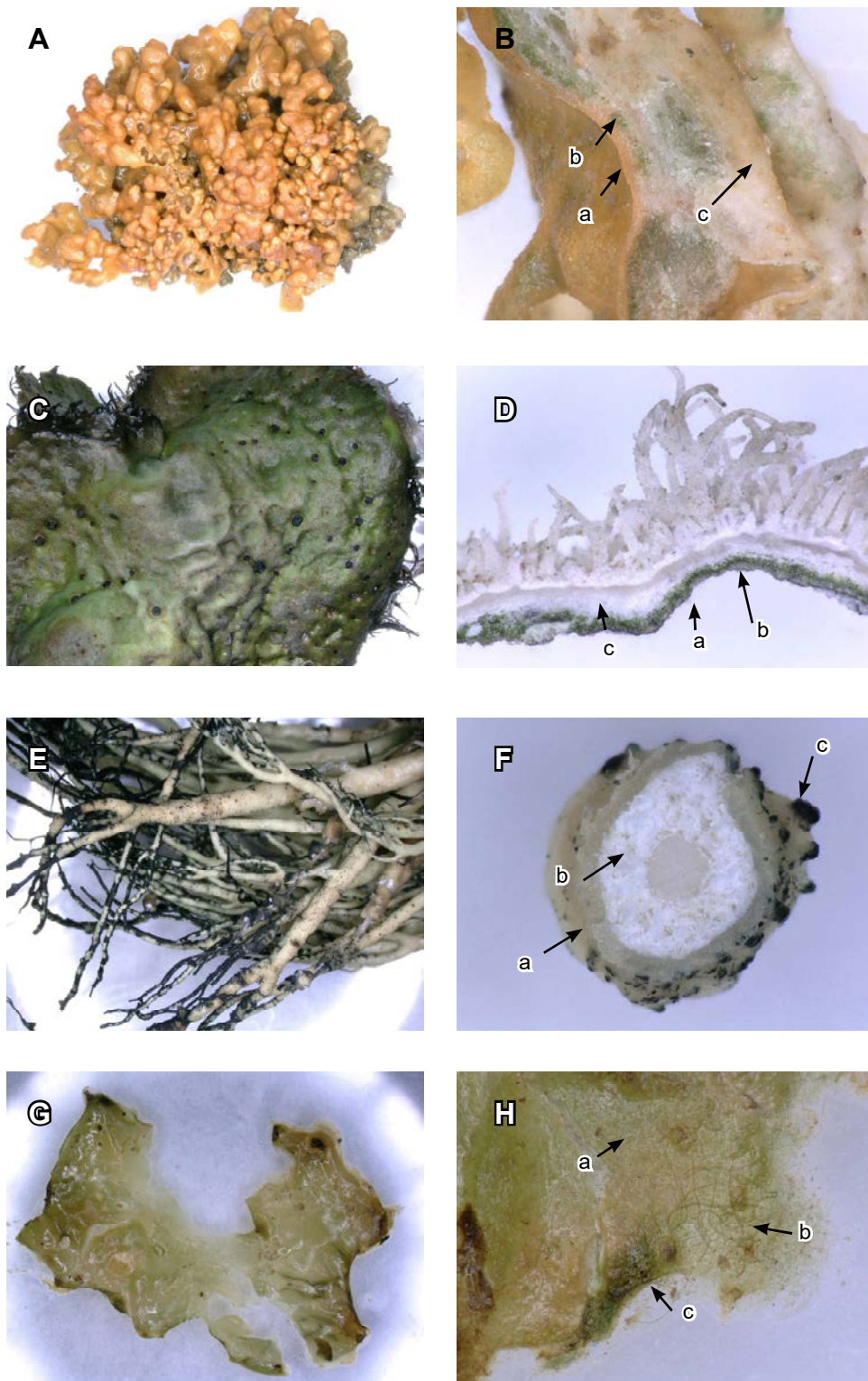


Рис. 1. Види автотрофних організмів. **A** — лишайник *X. elegans*; **B** — поперечний розріз талома *X. elegans* (верхній кортекс (a), шар фотобіонта (b) і нижній кортекс (c)); **C** — лишайник *U. cylindrica*; **D** — поперечний розріз талома *U. cylindrica* (тонкий верхній кортекс (a), шар фотобіонта (b), мозкова речовина з нижньою корою (c)); **E** — лишайник *U. sphacelata*; **F** — поперечний розріз талома *U. sphacelata* (товстий кортекс (a), внутрішня мозкова речовина з розташованими скупченнями фотобіонтів (b); сосочки (c)); **G** — *N. commune*; **H** — поперечний зріз *N. commune* (ціанобактеріальні (a), ниткоподібні структури (b) всередині оболонки, сосочки (c)).

Fig. 1. Autotrophs' species. **A** – *X. elegans* liche; **B** – *X. elegans* thallus cross section (upper cortex (a), photobiont layer (b) and lower cortex (c)); **C** – *U. cylindrica* lichen; **D** – *U. cylindrica* thallus cross section (thin upper cortex layer (a), photobiont layer (b), medulla with lower cortex (c)); **E** – *U. sphacelata* liche; **F** – *U. sphacelata* thallus cross section (thick cortex (a), internal medulla with arranged clusters of photobionts (b); papillae (c)); **G** – *N. commune*; **H** – *N. commune* cross-section (cyanobacterial (a), filamentous structures (b) inside the sheath, papillae (c)).

ператури охолодження для процесів фотосинтезу [12].

Охолодження зразків екстремофільних автотрофних організмів здійснювали за допомогою камери охолодження «Кryo 10» (Planer, Велика Британія), сполученої з посудиною Дьюара (20 л) з рідким азотом. За протоколом охолодження початкова температура зберігання зразків була 20°C, а кінцева — -50°C з постійною швидкістю 2°C·хв⁻¹. Температуру талому лишайника контролювали за допомогою вбудованої термопари. Перед охолодженням окремих зразок врівноважували до 20°C протягом 10 хв. Процес охолодження контролювався портативним комп'ютером, температуру камери та зразка регулярно вимірювали вбудованими термодатчиками. Одночасно з охолодженням визначали параметри флуоресценції хлорофілу (F_v/F_m , Φ_{PSII}) за допомогою флуориметра «PAM 2000» (H. Walz, Німеччина). Зонд флуориметра поміщали в охолоджувальну камеру на 3 мм над зразком для забезпечення задовільно високого сигналу флуоресценції хлорофілу під час вимірювань. Повторювані імпульси сатурації 5000 ммоль м⁻²·с⁻¹ протягом 0,8 с подавали кожні 30 с, щоб викликати максимальні сигнали флуоресценції хлорофілу. Для визначення F_v/F_m використовували фонове F_0 і максимальне F_m значення, виміряні на адаптованих до темряви зразках. Для оцінки Φ_{PSII} використовували актинічне світло 30 ммоль м⁻²·с⁻¹ PAR, яке вироблялося флуориметром, що вмикався за 5 хв до початку охолодження і працював протягом усього експерименту. Для кожного виду було проведено щонайменше три вимірювання параметрів флуоресценції хлорофілу (F_v/F_m , Φ_{PSII}).

Обробка даних. Дані F_v/F_m і Φ_{PSII} були нанесені на графік залежно від температури зразка та апроксимовані S-подібними кривими. За допомогою S-подібних кривих оцінювали такі параметри: температура зразка, за якої починається залежне від температури інгібування F_v/F_m і Φ_{PSII} (T1); критична температура, за якої F_v/F_m і Φ_{PSII} досягають 0°C (T2), а T1/2 визначається як температура, за якої F_v/F_m і Φ_{PSII} досягають 50% своїх максимумів.

Результати та обговорення

Результати у всіх досліджених видів F_v/F_m та Φ_{PSII} змінювалися зі зниженням температури зразка, утворенням типової S-подібної кривої (рис. 2, 3). На кривій можна виділити три фази: початкове повільне лінійне зниження, виявлене під час зниження температури зразка від 20 до -10°C — фаза I; проміжна фаза, типо-

дual sample was equilibrated to 20°C for 10 min. The cooling was PC-controlled, and chamber and sample temperature were regularly measured by in-built thermocouples. Simultaneously with the cooling, chlorophyll fluorescence parameters (F_v/F_m , Φ_{PSII}) were measured with a PAM 2000 fluorometer (H. Walz, Germany). The fluorometer probe was placed into the cooling chamber typically 3 mm above the sample to assure a satisfactorily-high chlorophyll fluorescence signal during measurements. Repeated saturation pulses of 5,000 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ for 0.8 s were provided each 30 s to induce maximum chlorophyll fluorescence signals. For F_v/F_m determination, values of background (F_0) and maximum (F_m) values measured on dark-adapted samples were used. For Φ_{PSII} evaluation, actinic light of 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR provided by a fluorometer was used. It was switched on 5 min before the cooling protocol started and lasted until the end of the cooling period. At least three measurements were conducted in each species, and in particular the chlorophyll fluorescence parameters (F_v/F_m , Φ_{PSII}).

Data processing. F_v/F_m and Φ_{PSII} were plotted against the sample temperature and fitted by S-curves. From the S-curves, the following parameters were evaluated: sample temperature at which temperature-dependent inhibition of F_v/F_m and Φ_{PSII} starts (T1), critical temperature at which F_v/F_m and Φ_{PSII} reach 0 (T2), and T1/2 defined as the temperature at which F_v/F_m and Φ_{PSII} reach 50% of their maxima.

Results and discussion

In all investigated species, F_v/F_m (Φ_{PSII}) changed with decreasing sample temperature forming a typical S-shaped curve (Fig. 2, 3). From the curve, three phases could be distinguished: an initial slow linear decrease found at the sample temperature decreasing from 20 to -10°C – Phase I; an intermediate phase typical of a rapid decrease (typically in the temperature range of -20 to -10°C) – Phase II, and the end part of the curve (slow decrease or constant close-to-zero values of F_v/F_m (Φ_{PSII}) found typically below -20°C) – Phase III.

Table shows F_v/F_m and Φ_{PSII} parameters characterizing interspecific differences evaluated from the S-curves.

All the investigated autotrophs exposed to subzero temperatures showed a substantial level of photosynthetic processes at the temperature below 10°C and critical subzero temperature (T2) below -20°C. As expected, F_v/F_m was inhibited in lower temperature (typically far below -25°C),

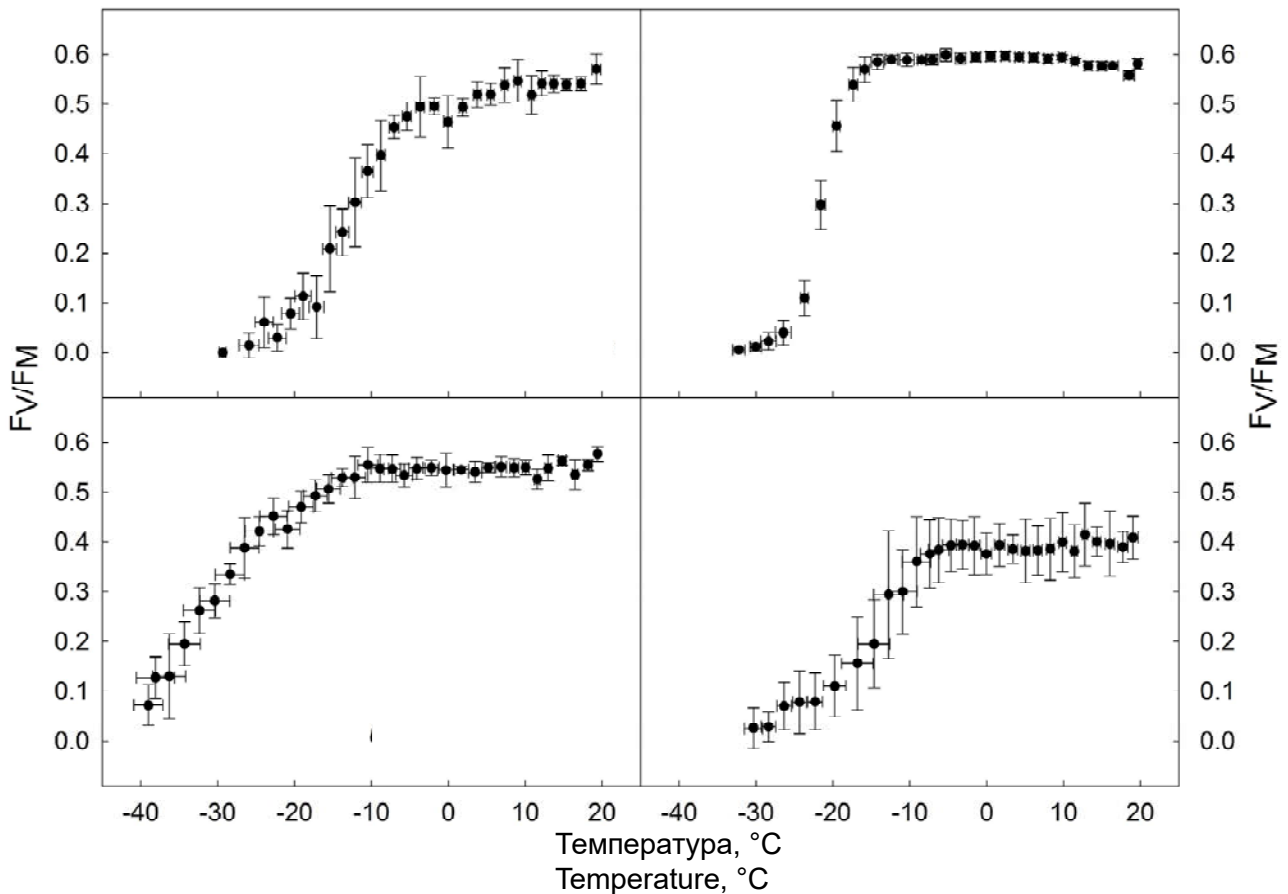


Рис. 2. Температурні криві F_v/F_M (потенційний вихід фотохімічних процесів у ФСII), записані під час лінійного охолодження експериментальних видів лишайників від 20 до -40°C зі швидкістю $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{хв}^{-1}$: **A** — *U. sphacelata*, **B** — *X. elegans*, **C** — *U. cylindrica*, **D** — *N. commune*. Дані є середніми для трьох повторів \pm стандартні відхилення.

Fig. 2. Temperature-response curves of F_v/F_M (potential yield of photochemical processes in PSII) recorded during linear cooling of experimental lichen species from 20 to -40°C at the rate of $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$: **A** – *U. sphacelata*, **B** – *X. elegans*, **C** – *U. cylindrica*, **D** – *N. commune*. Data point represents the means of 3 replicates \pm standard deviations.

ва для швидкого зниження (як правило, від -20 до -10°C) — фаза II; кінцева частина кривої, повільне зниження або постійні близькі до нуля значення F_v/F_M та Φ_{PSII} (як правило, нижче -20°C) — фаза III

У таблиці наведено параметри F_v/F_M та Φ_{PSII} , що характеризують міжвидові відмінності, оцінені за S-подібними кривими.

Усі досліджені автотрофні організми, які зазнали впливу від'ємних температур, показали значний рівень фотосинтетичних процесів за температури нижче 10°C і критичній мінусовій температурі (T_2) нижче -20°C . Як і очікувалося, F_v/F_M пригнічувався за більш низької температури (як правило, набагато нижче -25°C , тоді як Φ_{PSII} , пов'язаний з фотосинтетичним потоком електронів через їх носії у тилакоїдній мембрані, досягав від -20 до -30°C). Це узгоджується з даними попередніх досліджень антарктичних лишайників, які показали нижчу критичну температуру для F_v/F_M порівняно з Φ_{PSII} [3, 12]. Феномен обмеження Φ_{PSII} пов'язаний зі

while Φ_{PSII} associated with photosynthetic electron flow through the electron carriers in thylakoid membrane reached the range of -20 to -30°C . This is consistent with previous evidence of earlier studies in Antarctic lichens that showed critical temperature lower for F_v/F_M than Φ_{PSII} [3, 12]. The phenomenon of Φ_{PSII} limitation is associated with freeze-induced limitation of photosynthetic electron transport rate and NADP/ATP production at extreme subzero temperature while PSII functioning remains much less limited. In this concept, a feedback regulation of photosynthesis appears to balance the light absorbed by the primary photochemical reactions in photosystems, and the transformation of the energy into NADPH and ATP. The phenomenon is called photostasis [25] and associated with an acclimation to low temperature mediated by the changes in redox state of plastoquinone [9]. Photostasis is considered a protective mechanism of polar autotrophs [20].

For all experimental species, the temperature-response curves of F_v/F_M and Φ_{PSII} showed ty-



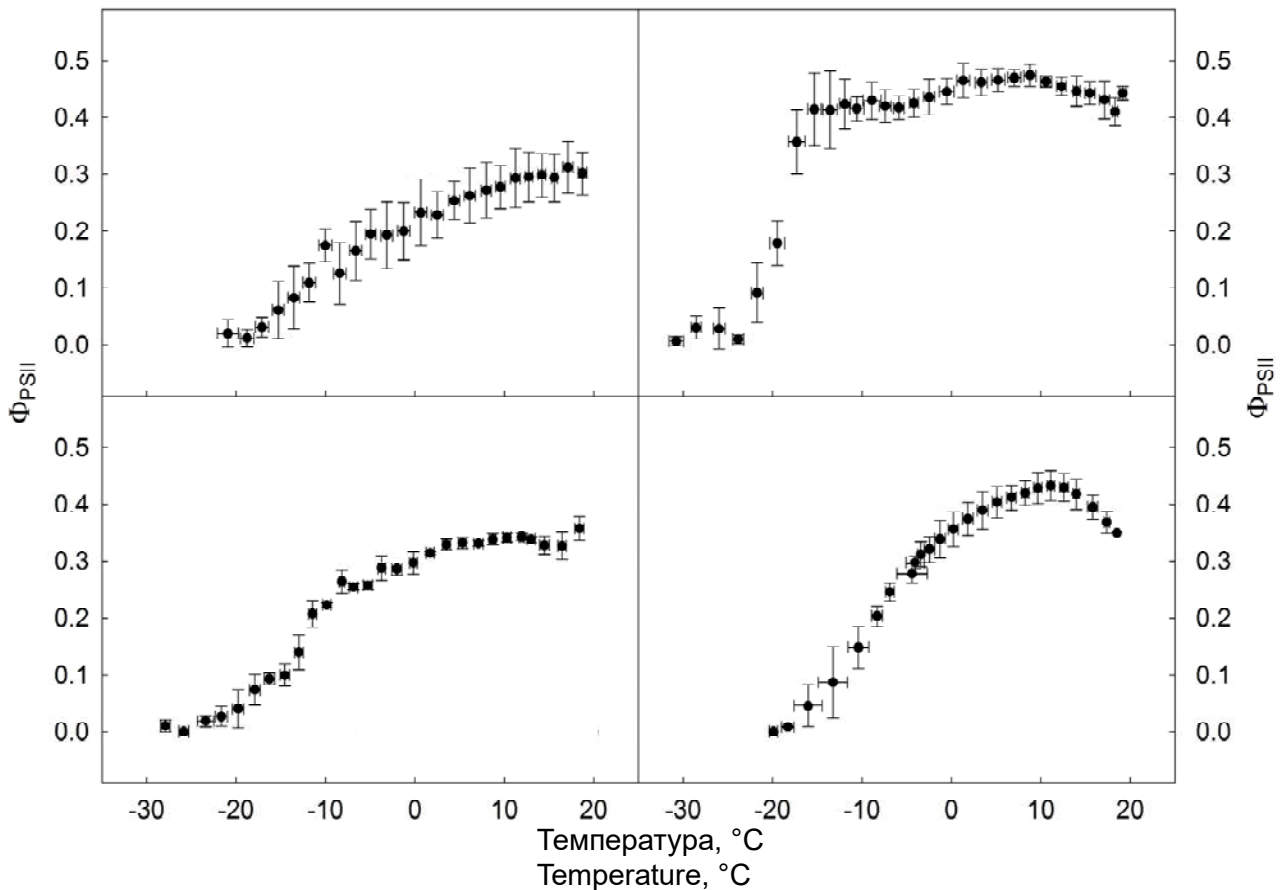


Рис. 3. Криві залежності від температури Φ_{PSII} (ефективний квантовий вихід фотохімічних процесів у PSII), записані під час лінійного охолодження експериментальних видів лишайників від 20 до -40°C зі швидкістю $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{хв}^{-1}$: **A** — *U. sphacelata*, **B** — *X. elegans*, **C** — *U. cylindrica*, **D** — *N. commune*. Дані представлені як середнє з трьох повторів \pm стандартні відхилення.

Fig. 3. Temperature-response curves of Φ_{PSII} (effective quantum yield of photochemical processes in PSII) recorded during linear cooling of experimental lichen species from 20 to -40°C at the rate of $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$: **A** — *U. sphacelata*, **B** — *X. elegans*, **C** — *U. cylindrica*, **D** — *N. commune*. Data point are means of 3 replicates \pm standard deviations.

зменшенням швидкості фотосинтетичного транспорту електронів і виробленням НАДФ/АТФ під час заморожування до екстремально низької температури, тоді як функціонування PSII залишається менш обмеженим. Таким чином відбувається регуляція фотосинтезу зі зворотним зв'язком для збалансування світла, що поглинається фотосистемами у ході первинних фотохімічних реакцій. Така регуляція супроводжується перетворенням енергії в НАДФН і АТФ. Це явище називається фотостазом [25] і пов'язане зі зниканням зразка до низької температури, опосередкованими змінами окисно-відновного стану пластохінону [9]. Фотостаз вважається захисним механізмом полярних автотрофів [20].

Для всіх експериментальних видів криві температурної відповіді F_v/F_m та Φ_{PSII} показали типову трифазну форму: плато (зниження температури від 20 до -5°C); спад і плече, що досягає критичної точки (рис. 2, 3) Зазвичай формується S-подібна крива різної форми залежно від виду та параметра флуоресценції

типичної трифазної форми: плато (зниження температури від 20 до -5°C), спад, і плече, що досягає критичної точки (рис. 2, 3). Фаза зазвичай утворює S-подібну криву різної форми залежно від виду та параметра флуоресценції. Між фазами I та II, можна розрізнити точку перегибу (для T_1 температури), яку знайдено в температурному діапазоні від -8 до -18°C (для F_v/F_m , див. рис. 2) і від -5 до -10°C (Φ_{PSII} , рис. 3). Цей діапазон був подібним до того, що згадується в попередніх дослідженнях [4, 12] і відповідає температурі, згаданій як критична для нуклеації льоду в гідратованих лишайникових таллах [18]. На температурі T_1 фотосинтетичний комплекс ЛХС-PSII проходить структурні та функціональні зміни, які пов'язані з збільшенням фонових флуоресценції (F_0) згадані Фолгар-Камеаном та Бартаком (2019) [10]. Наші дані про F_0 (не показано) підтверджують це явище для *X. elegans*, *U. cylindrica*, *U. sphacelata*, *N. commune*. З подальшим зниженням температури, F_0 зростає, зазвичай до критичної температури T_2

Параметри, що характеризують міжвидові відмінності
Parameters characterizing interspecific differences

Параметр Parameter	<i>Xanthoria elegans</i>		<i>Usnea sphacelata</i>		<i>Umbilicaria cylindrica</i>		<i>Nostoc commune</i>	
	F_v/F_M	Φ_{PSII}	FF_v/F_M	Φ_{PSII}	F_v/F_M	Φ_{PSII}	F_v/F_M	Φ_{PSII}
T1, °C	-15,6 ± 0,9	-14,1 ± 1,0	-5,6 ± 0,6	-2,1 ± 3,0	-19,5 ± 0,2	-4,6 ± 2,0	-5,8 ± 1,3	-0,9 ± 0,4
T2, °C	-28,0 ± 1,1	-25,2 ± 1,5	-23,3 ± 0,8	-20,0 ± 1,1	-43,0 ± 0,2	-22,4 ± 1,2	-27,2 ± 1,7	-17,9 ± 0,6
T1/2, °C	-21,6 ± 0,3	-21,2 ± 0,6	-12,6 ± 0,2	-8,7 ± 1,2	-30,5 ± 0,2	-13,0 ± 0,5	-15,7 ± 0,5	-10,5 ± 0,2

хлорофілу. Між фазами I і II можна виділити переломну точку (для температури T1), яка була знайдена в діапазоні температур від -8 до -18°C (для F_v/F_M , див. рис. 2) і від -5 до -10°C (для Φ_{PSII} , рис. 3). Цей діапазон був подібний до того, який використовувався у попередніх дослідженнях [4, 12], і відповідав температурі, що вважається критичною для нуклеації льоду в гідратованих таломіх лишайників [18]. За температури T1 фотосинтетичний комплекс LHC-PSII проходить структурні та функціональні зміни, які пов'язані зі збільшенням фонові флуоресценції хлорофілу F_0 [10]. Наші дані щодо F_0 (в статті не наведено) підтверджують це явище для *X. elegans*, *U. cylindrica*, *U. sphacelata*, *N. commune*. За подальшого зниження температури F_0 зростає, як правило, до досягнення критичної T2. Охолодження до температури нижче T2 не призводить до подальшого збільшення F_0 , що свідчить про припинення фотохімічних процесів у комплексах LHC-PSII через замерзання таломів.

Таким чином, критична температура T2 (при розгляді F_v/F_M) може бути обумовлена утворенням кристалів льоду в клітинах фотобіонтів, які повністю пригнічують функціонування PSII *per se*. Критична температура -20°C і/або нижче може бути пов'язана з температурою, яку реєструють за допомогою методів диференціальної скануючої калориметрії та Н-ЯМР спектроскопії [1, 17]. Однак, окрім утворення кристалів льоду, в клітинах, що формують талом лишайника, під дією мінусових температур відбувається ще кілька процесів. На молекули води можна впливати щонайменше 5 різними способами [16], зокрема заморожуванням слабко- і міцнозв'язаних молекул води [19].

is reached. Cooling to the temperature below T2 do not bring any further increase in F_0 , suggesting that photochemical processes in LHC-PSII complexes are stopped due to freezing of the thalli.

Therefore, critical temperature T2 (when considering F_v/F_M) might be associated with formation of ice crystals in photobiont cells that fully inhibits functioning of PSII *per se*. In this concept, the critical temperature of -20°C and/or lower might be associated with that reported by other techniques such as *e. g.* differential scanning calorimetry and H-NMR spectroscopy [1, 17]. However, apart extra-/intracellular formation, several processes co-act in the cells forming a lichen thallus exposed to the sub-zero temperature. Water molecules could be affected at least by 5 different ways [16]. These include *e. g.* different modus operandi of freezing of loosely- and tightly-bound water molecules, their shares, respectively [19].

Conclusions

Based on the critical (cooling) temperature T2 for F_v/F_M that decreased in the order of *U. sphacelata*, *N. commune*, *X. elegans* and *U. cylindrica*, we may suggest that the potential photochemical processes in PSII were the most cryoresistant for *U. cylindrica*. Among the investigated species, however, the T2 temperature for Φ_{PSII} showed similar value for *N. commune*, *X. elegans* and *U. cylindrica*, but significantly higher for *U. sphacelata*. Therefore, the species might be considered less cryoresistant than the other ones in terms of photosynthetic processes ongoing in thylakoid membrane of chloroplast at below zero temperature.



Висновки

За критичною температурою (охладження) T₂ для F_v/F_m, яка знижувалася в порядку *U. sphacelata*, *N. commune*, *X. elegans* і *U. cylindrica*, можна припустити, що потенційні фотохімічні процеси в PSII були найбільш кріорезистентними для *U. cylindrica*. Однак серед досліджених видів температура T₂ для Ф_{PSII} показала подібне значення для *N. commune*, *X. elegans* і *U. cylindrica*, але значно вище для *U. sphacelata*. Таким чином, за фотосинтетичними процесами цей вид можна вважати менш кріорезистентним порівняно з іншими, що відбуваються в тилакоїдній мембрані хлоропласта за температури нижче нуля.

Автори висловлюють подяку Чеській антарктичній дослідницькій програмі 2022 (CARP 2022), яка надала можливість збирати та обробляти зразки антарктичних пойкилогідричних автотрофів, використаних у цьому дослідженні.

Література

1. Bacior M, Harańczyk H, Nowak P, et al. Low-temperature immobilization of water in Antarctic Turgidosculum complicatulum and in Prasiola crispa. Part I. Turgidosculum complicatulum. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2019; 173: 869–75.
2. Backhaus T, de la Torre R, Lyhme K, et al. Desiccation and low temperature attenuate the effect of UVC254 nm in the photobiont of the astrobiologically relevant lichens *Circinaria gyrosa* and *Buellia frigida*. Int J Astrobiol. 2015; 14(3): 479–88.
3. Barták M, Vácz P, Hájek J, Smykla J. Low-temperature limitation of primary photosynthetic processes in Antarctic lichens *Umbilicaria antarctica* and *Xanthoria elegans*. Polar Biol. 2007; 31(1): 47–51.
4. Barták M, Vráblíková H, Hájek J. Sensitivity of photosystem 2 of Antarctic lichens to high irradiance stress: Fluorometric study of fruticose (*Usnea antarctica*) and foliose (*Umbilicaria decussata*) species. Photosynthetica. 2003; 41(4): 497–504.
5. Bjerke JW, Bokhorst S, Zielke M, et al. Contrasting sensitivity to extreme winter warming events of dominant sub-Arctic heathland bryophyte and lichen species. J Ecol. 2011; 99(6): 1481–8.
6. Bjerke JW. Ice encapsulation protects rather than disturbs the freezing lichen. Plant Biol. 2009; 11(2): 227–35.
7. Buriak I, Fleck RA, Goltsev A, et al. Translation of cryobiological techniques to socially economically deprived populations. Part 1: Cryogenic preservation strategies. J. Med. Devices. 2020; 14(1): 010801 EN.
8. Colesie C, Büdel B, Hurry V, Green TG. Can Antarctic lichens acclimatize to changes in temperature? Global Change Biol. 2018; 24(3): 1123–35.
9. Ensminger I, Busch F, Huner NP. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. Physiol Plant. 2006; 126(1): 28–44.

The authors are grateful to the Czech Antarctic Research Programme 2022 (CARP 2022), that allowed to collect and handle the samples of Antarctic poikilohydric autotrophs used in this study.

References

1. Bacior M, Harańczyk H, Nowak P, et al. Low-temperature immobilization of water in Antarctic Turgidosculum complicatulum and in Prasiola crispa. Part I. Turgidosculum complicatulum. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2019; 173: 869–75.
2. Backhaus T, de la Torre R, Lyhme K, et al. Desiccation and low temperature attenuate the effect of UVC254 nm in the photobiont of the astrobiologically relevant lichens *Circinaria gyrosa* and *Buellia frigida*. Int J Astrobiol. 2015; 14(3): 479–88.
3. Barták M, Vácz P, Hájek J, Smykla J. Low-temperature limitation of primary photosynthetic processes in Antarctic lichens *Umbilicaria antarctica* and *Xanthoria elegans*. Polar Biol. 2007; 31(1): 47–51.
4. Barták M, Vráblíková H, Hájek J. Sensitivity of photosystem 2 of Antarctic lichens to high irradiance stress: Fluorometric study of fruticose (*Usnea antarctica*) and foliose (*Umbilicaria decussata*) species. Photosynthetica. 2003; 41(4): 497–504.
5. Bjerke JW, Bokhorst S, Zielke M, et al. Contrasting sensitivity to extreme winter warming events of dominant sub-Arctic heathland bryophyte and lichen species. J Ecol. 2011; 99(6): 1481–8.
6. Bjerke JW. Ice encapsulation protects rather than disturbs the freezing lichen. Plant Biol. 2009; 11(2): 227–35.
7. Buriak I, Fleck RA, Goltsev A, et al. Translation of cryobiological techniques to socially economically deprived populations. Part 1: Cryogenic preservation strategies. J. Med. Devices. 2020; 14(1): 010801 EN.
8. Colesie C, Büdel B, Hurry V, Green TG. Can Antarctic lichens acclimatize to changes in temperature? Global Change Biol. 2018; 24(3): 1123–35.
9. Ensminger I, Busch F, Huner NP. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. Physiol Plant. 2006; 126(1): 28–44.
10. Folgar-Cameán Y, Barták M. Evaluation of photosynthetic processes in Antarctic mosses and lichens exposed to controlled rate cooling: Species-specific responses. Czech Polar Reports. 2019; 9(1): 114–24.
11. Hájek J, Barták M, Dubová J. Inhibition of photosynthetic processes in foliose lichens induced by temperature and osmotic stress. Biol Plant. 2006; 50(4): 624–34.
12. Hájek J, Barták M, Hazdrová J, Forbelská M. Sensitivity of photosynthetic processes to freezing temperature in extremophilic lichens evaluated by linear cooling and chlorophyll fluorescence. Cryobiology. 2016; 73(3): 329–34.
13. Hájek J, Hojďová A, Trnková K, et al. Responses of thallus anatomy and chlorophyll fluorescence-based photosynthetic characteristics of two Antarctic species of genus *Usnea* to low temperature. Photosynthetica. 2021; 59(1): 95–105.
14. Hájek J, Vácz P, Barták M, Jahnová L. Interspecific differences in cryoresistance of lichen symbiotic algae of genus *Trebouxia* assessed by cell viability and chlorophyll fluorescence. Cryobiology. 2012; 64(3): 215–22.
15. Hájek J, Vácz P, Barták M. Photosynthetic electron transport at low temperatures in the green algal foliose lichens



10. Folgar-Cameán Y, Barták M. Evaluation of photosynthetic processes in Antarctic mosses and lichens exposed to controlled rate cooling: Species-specific responses. *Czech Polar Reports*. 2019; 9(1): 114–24.
11. Hájek J, Barták M, Dubová J. Inhibition of photosynthetic processes in foliose lichens induced by temperature and osmotic stress. *Biol Plant*. 2006; 50(4): 624–34.
12. Hájek J, Barták M, Hazdrová J, Forbelská M. Sensitivity of photosynthetic processes to freezing temperature in extremophilic lichens evaluated by linear cooling and chlorophyll fluorescence. *Cryobiology*. 2016; 73(3): 329–34.
13. Hájek J, Hojdová A, Trnková K, et al. Responses of thallus anatomy and chlorophyll fluorescence-based photosynthetic characteristics of two Antarctic species of genus *Usnea* to low temperature. *Photosynthetica*. 2021; 59(1): 95–105.
14. Hájek J, Václav P, Barták M, Jahnová L. Interspecific differences in cryoresistance of lichen symbiotic algae of genus *Trebouxia* assessed by cell viability and chlorophyll fluorescence. *Cryobiology*. 2012; 64(3): 215–22.
15. Hájek J, Václav P, Barták M. Photosynthetic electron transport at low temperatures in the green algal foliose lichens *Lasallia pustulata* and *Umbilicaria hirsuta* affected by manipulated levels of ribitol. *Photosynthetica*. 2009; 47(2): 199–205.
16. Harańczyk H, Casanova-Katny A, Olech M, Strzalka K. Dehydration and freezing resistance of lichenized fungi. In: Shukla V, Kumar S, Kumar N, editors. *Plant adaptation strategies in changing environment*. Singapore: Springer; 2017. p. 77–102.
17. Harańczyk H, Grandjean J, Olech M. Low temperature effect in D₂O-hydrated Antarctic lichen *Himantormia lugubris* as observed by 1H NMR. *Molec Phys Rep*. 2001; 33: 220–24.
18. Harańczyk H, Grandjean J, Olech M, Michalik M. Freezing of water bound in lichen thallus as observed by 1H NMR. II. Freezing protection mechanisms in a cosmopolitan lichen *Cladonia mitis* and in Antarctic lichen species at different hydration levels. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2003; 28(4): 251–60.
19. Harańczyk H, Nowak P, Bacior M, et al. Bound water freezing in *Umbilicaria aprina* from continental Antarctica. *Antarct Sci*. 2012; 24(4): 342–52.
20. Hüner NP, Smith DR, Cvetkovska M, et al. Photosynthetic adaptation to polar life: Energy balance, photoprotection and genetic redundancy. *J Plant Physiol* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2022 Nov 25]; 268: 153557. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161721001966>.
21. Marečková M, Barták M, Hájek J. Temperature effects on photosynthetic performance of Antarctic lichen *Dermatocarpon polyphyllizum*: a chlorophyll fluorescence study. *Polar Biol*. 2019; 42(4): 685–701.
22. Míguez F, Schiefelbein U, Karsten U, et al. Unraveling the photoprotective response of lichenized and free-living green algae (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) to photochilling stress. *Front Plant Sci* [Internet]. 2017 Jul 4 [cited 2022 Nov 25]; 8: 1144. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01144/full>.
23. Mishra A, Hájek J, Tuháčková T, et al. 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*. 2015; 5(1): 99–111.
24. Noetzel RD, Sancho LG. Lichens as astrobiological models: experiments to fathom the limits of life in extraterrestrial environments. *Extremophiles as Astrobiological Models*. 2020; 20: 197–220.
25. Öquist, G, Huner NPA. Photosynthesis of overwintering evergreen plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2003; 54: 329–55.
26. Pannowitz S, Green TA, Schlenso M, et al. Photosynthetic performance of *Xanthoria mawsonii* CW Dodge in coastal habitats, Ross Sea region, continental Antarctica. *Lichenologist*. 2006; 38(1): 67–81.
27. Paoli L, Munzi S, Pisani T, et al. Freezing of air-dried samples of the lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. ensures that thalli remain healthy for later physiological measurements. *Plant Biosyst – Intl J Dealing Aspects Plant Biol*. 2013; 147(1): 141–4.
28. Puhovkin A, Bezsmertna O, Parnikoza I. Interspecific differences in desiccation tolerance of selected Antarctic lichens: Analysis of photosystem II effectivity and quenching mechanisms. *Czech Polar Reports*. 2022; 12(1): 31–43.
29. Šabacká, M., Elster, J. Response of cyanobacteria and algae from Antarctic wetland habitats to freezing and desiccation stress. *Polar Biol*. 2006; 30: 31–7.
30. Sadowsky A, Ott S. Photosynthetic symbionts in Antarctic terrestrial ecosystems: the physiological response of lichen photobionts to drought and cold. *Symbiosis*. 2012; 58(1): 81–90.
31. Sancho LG, de la Torre R, Pintado A. Lichens, new and promising material from experiments in astrobiology. *Fungal Biol Rev*. 2008; 22(3-4): 103–9.
32. Sancho LG, Pintado A, Green TA. Antarctic studies show lichens to be excellent biomonitors of climate change. *Diversity*

- habitats, Ross Sea region, continental Antarctica. *Lichenologist*. 2006; 38(1): 67–81.
27. Paoli L, Munzi S, Pisani T, et al. Freezing of air-dried samples of the lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. ensures that thalli remain healthy for later physiological measurements. *Plant Biosyst – Intl J Dealing Aspects Plant Biol*. 2013; 147(1): 141–4.
 28. Puhovkin A, Bezsmertna O, Parnikoza I. Interspecific differences in desiccation tolerance of selected Antarctic lichens: Analysis of photosystem II effectivity and quenching mechanisms. *Czech Polar Reports*. 2022; 12(1): 31–43.
 29. Šabacká, M., Elster, J. Response of cyanobacteria and algae from Antarctic wetland habitats to freezing and desiccation stress. *Polar Biol*. 2006; 30: 31–7.
 30. Sadowsky A, Ott S. Photosynthetic symbionts in Antarctic terrestrial ecosystems: the physiological response of lichen photobionts to drought and cold. *Symbiosis*. 2012; 58(1): 81–90.
 31. Sancho LG, de la Torre R, Pintado A. Lichens, new and promising material from experiments in astrobiology. *Fungal Biol Rev*. 2008; 22(3-4): 103–9.
 32. Sancho LG, Pintado A, Green TA. Antarctic studies show lichens to be excellent biomonitors of climate change. *Diversity* [Internet]. 2019 Mar 19 [cited 2022 Nov 25]; 11(3): 42. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-2818/11/3/42>.
 33. Sancho LG, Pintado A, Navarro F, et al. Recent warming and cooling in the Antarctic Peninsula region has rapid and large effects on lichen vegetation. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Jul 24 [cited 2022 Nov 25]; 7(1): 1–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-05989-4>.
 34. Schofield SC, Campbell DA, Funk C, MacKenzie TD. Changes in macromolecular allocation in nondividing algal symbionts allow for photosynthetic acclimation in the lichen *Lobaria pulmonaria*. *New Phytol*. 2003; 159(3): 709–18.
 35. Solhaug KA, Chowdhury DP, Gauslaa Y. Short-and long-term freezing effects in a coastal (*Lobaria virens*) versus a widespread lichen (*L. pulmonaria*). *Cryobiology*. 2018; 82: 124–9.
 36. de Vera JP, Schulze-Makuch D, Khan A, et al. Adaptation of an Antarctic lichen to Martian niche conditions can occur within 34 days. *Planet Space Sci*. 2014; 98: 182–90. [Internet]. 2019 Mar 19 [cited 2022 Nov 25]; 11(3): 42. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-2818/11/3/42>.