

Vitalität und Resistenz der Flechte *Xanthoria elegans* nach Exposition unter Mars-analogen und Weltraumbedingungen auf der ISS und nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Annette Brandt

aus Düsseldorf

Düsseldorf

2016

Institut für Botanik
AG Symbiotische Interaktionen
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Prof. Dr. S. Ott
Korreferent: Prof. Dr. W. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2016

Inhaltsverzeichnis

Akronyme und Abkürzungen	7
1. Einleitung	8
1.1. Überblick	8
1.2 Flechten	8
1.2.1 <i>Xanthoria elegans</i> (Link) Th. Fr. (1860)	10
1.2.2. Anhydrobiose und Austrocknungstoleranz	10
1.2.3 Frosttoleranz	11
1.3 Astrobiologie	11
1.3.1 Extreme Umwelten: Weltraum- und Marsanaloge Standorte	12
1.3.2 Lithopanspermie-Hypothese	12
1.3.3 Terrestrische und extraterrestrische abiotische Stressoren	13
UV-Strahlung	13
Vakuum und Mars-analoge Atmosphäre	15
Simulierte Weltraumbedingungen / Experimente im Weltraum	15
1.4 Exposition auf der Internationalen Raumstation (ISS)	16
1.4.1 Astrobiologische Plattform EXPOSE-E	16
1.4.2 Flechten-Expositionsexperimente auf der ISS	17
1.4.3 Ionisierende Strahlung: LIFE-Experiment auf der ISS	18
1.5 Ionisierende Strahlung jenseits des Erdmagnetfeldes	18
1.5.1 Simulation von kosmischer Strahlung: ionisierende Strahlung in hoher Dosis	19
1.5.2 Wirkung von ionisierender Strahlung	20
1.6. Motivation und Ziele	21
1.7. Analysen zur Resistenz der Flechte <i>Xanthoria elegans</i>	22
1.7.1 Vitalitätsanalysen	22
Fluoreszenzfärbung zur Analyse metabolischer Aktivität (LIVE/DEAD <i>staining</i>)	22
Chlorophyll <i>a</i> Fluoreszenz / maximaler Quantum Yield des Photosystems II	23
Sporulationsversuche mit Apothecien (Mycobiont)	24
Kultur des Photobionten / Kultur von Photo- und Mycobiont	24
1.7.2 Anatomie und Ultrastruktur	25
Lichtmikroskopie / Rasterelektronenmikroskopie (REM)	25
Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM)	25
Austrocknung und Absorptionsvermögen	26
Absorption durch das Anthrachinon Parietin: Licht, UV- und Röntgenstrahlung	26
1.7.3 Ionisierende Strahlung: Simulation von kosmischer Strahlung	26
2. Ergebnisse und Diskussion	28

2.1 Exposition auf der ISS: Vitalität von <i>Xanthoria elegans</i>	28
2.1.1 Metabolische Aktivität (LIVE/DEAD <i>staining</i>).....	28
2.1.2 Photosynthetisches Potential (Chlorophyll a Fluoreszenz-Messung)	28
2.1.3 Wachstum und Reproduktion des Photobionten (Kultivierung)	29
2.1.4 Mission Ground Reference (MGR).....	30
2.2 Exposition auf der ISS: Anatomie und Ultrastruktur.....	31
2.2.1 Lichtmikroskopie und Raster-Elektronen-Mikroskopie	31
2.2.2 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie.....	31
2.3 Exposition auf der ISS: Resistenzen gegen extraterrestrische Stressoren	32
2.3.1 Ionisierende Strahlung.....	32
2.3.2 Anhydrobiose und extraterrestrische Stressoren	33
2.3.3 Sekundäre Metaboliten	35
2.3.4 Verdichten der protektiven Cortexpigmente	35
2.3.5 Anatomie	36
2.4 Ionisierende Strahlung: Vitalität von <i>Xanthoria elegans</i>	38
2.4.1 Ionisierende Strahlung bis 2 kGy	38
2.4.2 Röntgenbestrahlung von <i>X. elegans</i> bis 100 Gy	40
2.4.3 Gamma Strahlung bis 113 kGy	40
2.6 Besondere Fragestellungen	43
2.6.2 Mars-analoge Umweltbedingungen	43
2.6.3 Lithopanspermie	44
3.1 Zusammenfassung	45
3.2 Summary	47
4.1 Literaturverzeichnis	49
4.2 Bildtafeln.....	63
5. Publikationen	67
5.1. Extremotolerance and resistance of lichens: Comparative studies on five species used in astrobiological research I. Morphological and anatomical characteristics.....	67
5.2 Viability of the lichen <i>Xanthoria elegans</i> and its symbionts after 18 months of space exposure and simulated Mars conditions on the ISS	89
5.3 Characterisation of growth and ultrastructural effects of the <i>Xanthoria elegans</i> photobiont after 1.5 years of space exposure on the International Space Station	105
5.4 STARLIFE VI: Simulated space radiation: Impact of four different types of high-dose ionizing radiation on the lichen <i>Xanthoria elegans</i>	117
5.5 STARLIFE VIII: The effect of high-dose ionizing radiation on the isolated photobiont of the astrobiological model lichen <i>Circinaria gyrosa</i>	132

Ergebnisse aus dieser Studie wurden als folgende Beiträge präsentiert:

Publikationen

- Brandt, A.**, de Vera, J.-P., Onofri, S., Ott, S. (2015). Viability of the lichen *Xanthoria elegans* and its symbionts after 18 months of space exposure and simulated Mars conditions on the ISS. *International Journal of Astrobiology*, 14(3), 411-425. (PUBLIKATION 2)
- Brandt, A.**, Posthoff, E., de Vera, J.-P., Onofri, S., Ott, S. (2016). Characterisation of viability, growth and ultrastructural effects of the *Xanthoria elegans* photobiont after 1.5 years of space exposure on the International Space Station. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 46(2), 311-321. (PUBLIKATION 3)
- Brandt, A.**, Meeßen, J., Jänicke, R. U., Raguse, M., Ott, S.: Simulated space radiation: Impact of four different types of high-dose ionizing radiation on the lichen *Xanthoria elegans*. *Astrobiology*. In review. (PUBLIKATION 4)
- 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. (PUBLIKATION 1)
- Meeßen, J., Backhaus, T., **Brandt, A.**, Raguse, M., Böttger, U., de Vera, J.-P., de la Torre, R.: The effect of high dose ionizing radiation on the isolated photobiont of the astrobiological model lichen *Circinaria gyrosa*. *Astrobiology*. In review. (PUBLIKATION 5)

Vorträge

- Brandt, A.**, Ott, S.: Grenzen des Überlebens im Kontext der Lithopanspermie-Hypothese: *Xanthoria elegans* bei LIFE / EXPOSE-E. Einladungsvortrag zur Astrobiologie, Kirchhoff- Institut für Physik, Universität Heidelberg, Heidelberg, 5.06.2013
- Brandt, A.**, Ott, S.: Grenzen des Überlebens im Kontext der Lithopanspermie-Hypothese: *Xanthoria elegans* at LIFE / EXPOSE-E. Workshop on Astrobiology, Institute of Botany, HHU, Düsseldorf, Germany, 10.06.2013
- Brandt, A.**, de Vera, J.-P., Rabbow, E., Onofri, S., Ott, S.: Survival of the lichen *Xanthoria elegans* after 18 months of space exposure at EXPOSE-E / LIFE. 13th European Workshop on Astrobiology (EANA), Centre for Advanced Studies in Astrobiology and Related Topics, University of Szczecin, Szczecin, Poland, 23.07.2013
- Brandt, A.**, Meeßen, J.: Limits of life - Deep space exposure of lichens and associated bacterial communities as part of the Lunar polar sample return mission. Workshop on science and challenges of lunar sample return, European Space Agency (ESA), Noordwijk, Netherlands, 19.02.2014
- Brandt, A.**, de Vera, J.-P., Rabbow, E., Onofri, S., Ott, S.: Lichen resistance to extra-terrestrial conditions - Results on viability, ultrastructure and algal growth. 1th AbGradE Symposium, Astrobiology Graduates in Europe, UK Centre of Astrobiology, Edinburgh, United Kingdom, 10.10.2014
- Brandt, A.**, Meeßen, J., Jänicke, R. U., de Vera, J.-P., Onofri, S., Ott, S.: The potential of resistance of the lichen symbiosis to extra-terrestrial conditions - Exposure to space and Mars-analogue conditions on the International Space Station and exposure to simulated Galactic Cosmic Rays. 8th International Symbiosis Society Congress, University of Lisbon, Lisboa, Portugal, 17.07.2015

- Brandt, A.**, Ott, S.: Resistenz der Flechte *Xanthoria elegans* und ihrer Symbionten gegenüber extremen extra-terrestrischen Bedingungen: Weltraum und Mars-analoge Bedingungen auf der ISS (EXPOSE-E) und simulierte Weltraumstrahlung. Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR): Nationales Symposium „Forschung unter Weltraumbedingungen“, Statusseminar, Bonn, 29.10.2015
- Meeßen, J., **Brandt, A.**, Ott, S., de Vera, J.-P., Böttger, U., Sánchez Iñigo, F. J., de la Torre, R.: Stabilität und Degradation biogener Substanzen und das Resistenzpotential der Flechte *Buellia frigida* unter simulierten Marsbedingungen und nach Exposition im LEO-Weltraum. DLR-Statusseminar, GIS, Darmstadt, Germany, 19.11.2011
- Meeßen, J., **Brandt, A.**, Ott, S., Sánchez Iñigo, F. J., de la Torre, R., Balzer, E.-M., Günther, S., Triebel, L., de Vera, J.-P.: Results on the characterisation of the space-relevant lichen species *Buellia frigida*, *Aspicilia fruticulosa*, and *Xanthoria elegans*. BIOMEX Coordinative Meeting at INTA, Madrid, Spain, 22.03.2012
- Meeßen, J., **Brandt, A.**, Ott, S.: The resistance of lichens and lichen symbionts towards space exposure and simulated space conditions. 10th International Mycological Congress, Bangkok, Thailand, 6.08.2014
- Papadopoulos, A., Meeßen, J., **Brandt, A.**, Popa, O., Ott, S.: The lichen *Xanthoria elegans* and its impact on present day astrobiology. Astrobiology and Space Medicine Workshop, Medical University of Graz, Graz, Austria, 10.12.2015

Poster

- Brandt, A.**, de Vera, J.-P., Meeßen, J., Ott, S.: Lichens as a model-system for survival of eukaryotic symbiotic associations exposed to space conditions. 7th International Symbiosis Society Congress, Jagiellonian University, Kraków, Poland, 22.-28.07.2012
- Brandt, A.**, de Vera, J.-P., Meeßen, J., Onofri, S., Ott, S.: Lichens as a model-system for survival of eukaryotic symbiotic associations exposed to space conditions II. 12th European Workshop on Astrobiology (EANA), Alba Nova University Center, Stockholm, Sweden 15.-17.10.2012
- Brandt, A.**, de Vera, J.-P., Rabbow, E., Onofri, S., Ott, S.: Survival of the lichen *Xanthoria elegans* after 18 months of space exposure at EXPOSE-E / LIFE. 13th European Workshop on Astrobiology (EANA), Centre for Advanced Studies in Astrobiology and Related Topics, University of Szczecin, Szczecin, Poland, 22.-25.07.2013
- Brandt, A.**, de Vera, J.-P., Rabbow, E., Onofri, S., Ott, S.: Lichen resistance to extra-terrestrial conditions beyond Antarctica. 23th SCAR Biennial Meetings and Open Science Conference, SkyCity Convention Centre, Auckland, New Zealand, 25.-28.08.2014
- Brandt, A.**, de Vera, J.-P., Rabbow, E., Onofri, S., Ott, S.: Lichen resistance to extra-terrestrial conditions: Viability, ultrastructure and algal growth. 14th European Workshop on Astrobiology (EANA) / Astrobiology Conference, UK Centre for Astrobiology, University of Edinburgh, Edinburgh, GB, 13.-16.10.2014
- Meeßen, J., Sánchez Iñigo, F. J., **Brandt, A.**, Balzer, E.-M., de la Torre, R., Sancho, L. G., Ott, S., de Vera, J.-P.: Comparison on the morphological-anatomical and chemical characteristics of five lichen species to assess their high potential of extremotolerance. 12th European Workshop on Astrobiology (EANA), Alba Nova University Center, Stockholm, Sweden 15.-17.10.2012
- Meeßen, J., **Brandt, A.**, Backhaus, T., Ott, S., Jänicke, R. U., de la Torre, R., de Vera, J.-P., Raguse, M., Okayasu, R., Moeller, R.: The effect of ionizing radiation on two astrobiological models: The lichen *Xanthoria elegans* and the isolated photobiont of *Circinaria gyrosa*. 15th European Workshop on Astrobiology (EANA), ESTEC complex of the European Space Agency, Noordwijk, NL, 5.-9.10.2015

Akronyme und Abkürzungen

AL/ALOS	<i>activated lichen/activated lichen on substrate</i> ; aktivierte Flechten/aktivierte Flechten auf Substrat
CLSM	<i>confocal laser-scanning microscopy</i> , konfokale Laser-scanning-Mikroskopie
COSPAR	<i>Committee on Space Research</i> , globaler Dachverband in der Weltraumforschung
DLR	Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESA	<i>European Space Agency</i> , Europäische Weltraumorganisation
eV	Elektronenvolt ($1 \text{ eV} = 1,6022 \times 10^{-19} \text{ J}$)
eV/n	Elektronenvolt pro Teilchen (Ion, Elektron)
EVT	<i>experimental verification test</i> , Test des Probenmaterials unter den Bedingungen des geplanten Experimentes
Fe	Eisenionen
Fv/Fm	Quotient von variabler (Fv) und maximaler Fluoreszenz (Fm) bei der Chlorophyll <i>a</i> Fluoreszenz-Messung des Photosystems II; synonym: <i>Maximum Quantum Yield</i>
GCR	galaktisch-kosmische Strahlung
Gy	Gray, SI-Maßeinheit für absorbierte Dosis ionisierender Strahlung, [Jkg^{-1}]
He	Heliumionen
HIMAC	<i>Heavy Ion Medical Accelerator</i> , Teilchenbeschleuniger, Zyklotron am NIRS, Japan
HZE	<i>High atomic number Z and energy E</i> , schwere Ionen/Atome mit hoher Beschleunigungsenergie
ICRP	<i>International Commission on Radiological Protection</i> , Internationale Strahlenschutzkommission
ISS	<i>International Space Station</i> , Internationale Raumstation
LEO	<i>low-Earth-orbit</i> , erdnahe Umgebung/Umlaufbahn 300 bis 1500 km über der Erdoberfläche
LET	linearer Energietransfer
LIFE	<i>Lichen and Fungi Exposure</i> ; Experiment zur Exposition von Flechten und Pilzen auf der astrobiologischen EXPOSE-E Plattform
MGR	<i>Mission Ground Reference</i> , Simulation der EXPOSE Weltraumexperimente im DLR Köln, während des LIFE Experimentes
NASA	<i>National Aeronautics and Space Administration</i> , nationale Luft- und Raumfahrtbehörde der USA
NIRS	National Institute of Radiological Science in Chiba, Japan
PS II	Photosystem II
REM	Raster-Elektronen-Mikroskopie
Rö	Röntgenstrahlung
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SCR	solare kosmische Strahlung
Sv	Sievert, Maßeinheit für absorbierte Dosis ionisierender Strahlung, bei der die Strahlenqualität mittels Wichtungsfaktoren berücksichtigt ist, [Jkg^{-1}]
SVT	<i>scientific/space verification test</i> , Test der Hardware und der Proben unter den vollständigen Bedingungen des geplanten Experimentes
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
TOM 1%	<i>Trebouxia Organic Medium</i> mit 1% (w/w) Glucose
üNN	über Normal Null
UV	Ultra-Violett, UV-Strahlung

1. Einleitung

1.1. Überblick

In diesem Projekt wurden Proben der Flechte *Xanthoria elegans* analysiert, die zuvor im Rahmen eines ESA-Projektes auf der Internationalen Raumstation (ISS) 18 Monate lang unter Mars-analogen und realen Weltraumbedingungen exponiert wurden (Onofri et al. 2012, Rab-bow et al. 2012, PUBLIKATION 2, 3). Dieses Experiment ermöglichte erstmals nach einer Langzeitexposition im Weltraum, die kombinierten Einflüsse von Vakuum, Strahlung und insbesondere UV-Einstrahlung, auf die Vitalität, die photosynthetische Aktivität und die ultrastrukturelle Integrität der exponierten Flechtenproben zu analysieren. Die anatomisch-morphologischen Vergleiche in der Astrobiologie eingesetzter resistenter Flechten (u.a. *Circinaria gyrosa*, *Buellia frigida*, Sánchez et al. 2012, 2014, PUBL. 1) bildeten eine essentielle Grundlage für die Analysen und zeigten, dass Poikilohydrie und Anhydrobiose essentielle Prinzipien sind, während z.B. die UV-Resistenz auch durch unterschiedliche sekundäre Metaboliten oder anatomische Variationen erreicht werden kann (PUBL. 1, Meeßen et al. 2013b). Bedingt durch ihren erdnahen Orbit schützt das Erdmagnetfeld die ISS größtenteils vor ionisierender kosmischer Strahlung. Um die Resistenz von Flechten und ihren Symbionten gegenüber dieser Strahlung im offenen Weltraum einschätzen zu können, wurden Simulationsexperimente mit Komponenten von kosmischer Strahlung, wie sie außerhalb des schützenden Magnetfeldes auftreten können (Reitz 2008) durchgeführt. Diese zusätzlichen Experimente ergänzten die Analyse der Exposition auf der ISS um diesen, für die Einschätzung des Überlebens im Weltraum relevanten, abiotischen Faktor (PUBL. 4, 5).

1.2 Flechten

Als eine seit ca. 600 Mio. Jahren (Yuan et al. 2005) erfolgreiche Symbiose aus Pilzen (Mycobionten) und Algen und/oder Cyanobakterien (Photobionten), sind Flechten rezent in fast allen Biomen der Erde anzutreffen und weltweit mit ca. 16000-20000 Arten vertreten (Henssen & Jahns 1974, Øvstedal & Lewis Smith 2001). Viele Flechtenarten sind Pionierorganismen (Emerson 1947, Brodo et al. 2001), die mit unterschiedlichsten Anpassungen und Resistenzmechanismen Standorte besiedeln können, deren extreme Umweltbedingungen eine Besiedlung durch Kormophyten nicht oder nur in einer geringen Artendiversität erlauben (Longton 1988, Kranner et al. 2008). Die Toleranz der poikilohydrigen Flechten gegenüber abiotischen Umweltfaktoren wie Kälte, Temperaturschwankungen, extremer Trockenheit, geringer Nährstoffverfügbarkeit und starker Lichteinstrahlung zeigt sich insbesondere in alpinen Habitaten (Aubert et al. 2007, Obermeyer et al. 1992), in heißen und kalten Wüsten (Nash III et al. 1977, Nybakken et al. 2004), auf antarktischen Nunatakkern (Engelen et al. 2008), sowie in den antarktischen Dry Valleys (Friedmann et al. 1988, Perez-Ortega et al. 2012). In der Antarktis stellen Flechten die dominante Vegetation dar (Dyer & Crittenden 2008) und besitzen

mit ca. 400 Arten (Øvstedal & Lewis Smith 2001) neben Moosen die größte Diversität (Longton 1988).

Die verschiedenen Flechtenarten dieser mutualistischen Symbiose (Lewis 1991, Hawksworth et al. 1995) zwischen heterotrophen, filamentösen Mycobionten (überwiegend Ascomyceten) und photoautotrophen Photobionten, unterscheiden sich durch ihre jeweiligen Symbiosepartner, morphologisch durch verschiedene Wuchsformen des Flechtenkörpers (Thallus) und der Fruchtkörper des Pilzes (Apothecien), aber auch durch physiologische Eigenschaften (Henssen & Jahns 1974, Lange & Kappen 1972, Kappen & Friedmann 1983, Schroeter & Scheidegger 1995, Kappen 2000). Der stratifizierte Thallus heteromerer Flechten mit Cortices, Algenschicht und Medulla wird hauptsächlich von Pilzhyphen des Mycobionten gebildet, die in Pseudogewebe organisiert sind (Henssen & Jahns 1974). Die unizellulären Photobionten sind als extrazelluläre Symbionten in Schichten oder Clustern in die Struktur der Flechte eingebettet (Honegger 1991). Der symbiotische Kontakt wird über Pilzhyphen, die zu Haustorien oder Appressorien gestaltet sind, oder per Diffusion über die gebildete Gallertmatrix realisiert (Henssen & Jahns 1974). Grünalgen, insbesondere der coccalen Gattung *Trebouxia*, sind als photoautotrophe Symbionten besonders verbreitet in Habitaten, die durch Kälte und Trockenheit geprägt sind (Palmer & Friedmann 1990, Kappen 2000, Sadowsky & Ott 2012).

Strukturierte Thalli, Apothecien und sekundäre Flechteninhaltsstoffe werden von der überwiegenden Zahl der Flechtenpilze nur im symbiotischen Zustand gebildet (Henssen & Jahns 1974). Aposymbiotisch wachsen Mycobionten lediglich zu undifferenzierten Mycelien oder Stromata heran und bilden selten Apothecien aus (Henssen & Jahns 1974, Meeßen 2011), weshalb die Symbiose für den Pilz als ökologisch obligat gilt (Honegger 1991).

Sowohl die Wuchsformen, als auch die charakteristischen sekundären Metabolite sind Teil der Anpassungen an die jeweiligen Umweltbedingungen der Flechten (Jahns 1988, Scheidegger et al. 1995, Büdel & Scheidegger 1996, PUBL. 1), da sie z.B. bei der Wasseraufnahme, dem Gaswechsel, der Photosynthese-Effizienz (Honegger 1998, Kappen 2000) und der Pigmentierung (Solhaug et al. 2003, Solhaug & Gauslaa 2004) relevant sind. Verschiedene Flechtenarten finden sich an stark lichtexponierten Standorten (Kappen et al. 1998), wodurch insbesondere an alpinen oder antarktischen Standorten eine intensivere UV-Einstrahlung (vgl. 1.3.3) wirksam sein kann. Die von vielen Flechtenarten produzierten, charakteristischen, sekundären Metabolite (Rundel 1978, Huneck & Yoshimura 1996), können Licht und UV-Strahlung absorbierende Eigenschaften besitzen (Solhaug & Gauslaa 1996, McEvoy et al. 2007, Meeßen et al. 2013b, PUBL. 1) oder sie können als Fraßschutz oder Bakterizid dienen (Lawrey 1989, Huneck 1999). Zu den Anpassungsstrategien der Flechten an die Umweltbedingungen ihres Lebensraumes zählt auch die symbiotische Lebensweise, die es den Flechten ermöglicht, Habitate zu besiedeln, welche für die einzelnen Symbiosepartner langfristig nicht erschließbar wären (Honegger 2009, Grube 2010).

Im Folgenden fokussiert sich die Beschreibung auf die in dieser Arbeit eingesetzte Flechte *Xanthoria elegans*. Ein Vergleich der unterschiedlichen Anatomie, Morphologie und Adapti-

onen der astrobiologisch relevanten Flechten *Rhizocarpon geographicum*, *Circinaria gyrosa*, *Pleopsidium chlorophanum*, *Xanthoria elegans* und *Buellia frigida* wurde hingegen in PUBL. 1 erarbeitet.

1.2.1 *Xanthoria elegans* (Link) Th. Fr. (1860)

Die placoiden Krustenflechte aus der Familie Telochistaceae ist weltweit verbreitet und findet sich bevorzugt in (hoch-)alpinen und polaren Habitaten. Es gibt dokumentierte Funde aus dem Himalaya auf ca. 7000 m üNN (Obermeyer et al. 1992) und Vorkommen in der kontinentalen Antarktis (Øvstedal & Lewis Smith 2001). Die in dieser Studie verwendeten Proben wurden 2005 und 2012 am Col du Sanetsch (2140 m üNN), Wallis, Schweiz, und nahegelegenen Standorten bei Zermatt (PUBL. 2, 4) gesammelt und trocken bei -20°C gelagert.

Im heteromeren Thallus von *X. elegans* kann die Algenschicht deutlich von der sehr lockeren Medulla aus Pilzhyphen abgegrenzt werden. Der Photobiont ist eine coccale Grünalge der Gattung *Trebouxia*. Einige *Trebouxia*-Arten sind besonders kälte- und frostresistent (Hájek et al. 2012) und verfügen über ein niedriges Photosynthese-Optimum (Lange und Kappen 1972, Kappen 1993, 2000). Detaillierte Informationen zur Anatomie und Morphologie finden sich in PUBL. 1. Charakteristisch für *X. elegans* ist die Inkrustierung des oberen Cortexes mit dem Anthrachinon Parietin, einem extrazellulären, vom Mycobionten synthetisierten sekundären Metaboliten, das als licht-absorbierendes Pigment wirkt (Huneck & Yoshimura 1996, Elix 1996, Solhaug & Gauslaa 1996).

Die Synthese des vor Licht- und UV-Strahlung schützenden Parietins (Solhaug & Gauslaa 1996) ist angepasst an die Intensität der Belichtung und kann durch UV-B Einstrahlung am Standort induziert werden (Buffoni Hall 2002, Solhaug & Gauslaa 2004; Gauslaa & McEvoy 2005). Die hohe Absorptionsfähigkeit von Parietin im UV-Wellenlängenbereich von 220-300 nm (Abb. A3) reduziert somit die Bildung UV-induzierter DNA-Photoprodukte (Buffoni Hall 2002) und schützt DNA sowie Proteine vor den Wellenlängen, auf die sie besonders sensitiv reagieren (vgl. 1.3.3). Ein weiterer Absorptionspeak bei 440 nm deckt sich mit der Lichtabsorption durch Chlorophyll, wodurch Überbelichtung vermieden und die Photoinhibition verringert wird (Solhaug & Gauslaa 2004) sowie die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies minimiert (Krause & Jahns 2004). Die Verdichtung der absorbierenden Pigmente bei der Dehydration von Flechten (vgl. 2.3.4, PUBL. 1) intensiviert die protektive Wirkung und stellt damit einen effizienten Licht- und UV-Schutz für beide Symbionten im Thallus dar, insbesondere für die Photobionten (Buffoni Hall 2002, Gauslaa & Solhaug 2004).

1.2.2. Anhydrobiose und Austrocknungstoleranz

Flechten sind poikilohydre Organismen und verfügen über keine aktiven Mechanismen zur Wasserretention (Henssen & Jahns 1974). Kompensiert wird dies durch eine hohe Austrocknungstoleranz (Lange & Kappen 1972, Honegger 2003, Kranner et al. 2008). Bei der Aus-

trocknung gehen beide Symbionten in den, als Anhydrobiose bezeichneten, Zustand latenten Lebens über, wobei alle metabolischen Prozesse ruhen (Crowe et al. 1992, 1998, Kranner et al. 2008) und das Photosystem II inaktiviert ist (Wieners et al. 2012). Dies reduziert die Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS; Kranner et al. 2008, Holzinger & Karsten 2013). Beim Austrocknen werden protektive Mechanismen aktiviert, z.B. die Akkumulation von Osmotika, von ROS abfangenden Molekülen, sowie von Zuckern, welche die Membranen der Zelle während der Anhydrobiose stabilisieren (Crowe et al. 1998; Holmstrup et al. 2001, Kranner et al. 2008, Holzinger & Karsten 2013). Eine durch Trockenheit oder Luftfeuchtigkeit < 80-97% (Sigfridsson and Oquist 1980; Lange et al. 1998) induzierte Anhydrobiose stellt für trockenresistente Flechten eine Adaption dar, welche die Besiedlung von Habitaten mit geringer Wasserverfügbarkeit ermöglicht (vgl. 1.2). Beide Symbionten überdauern ungünstige äußere Bedingungen an ihrem Standort in Anhydrobiose, aber sind bei der Rehydrierung der Flechte innerhalb von wenigen Minuten wieder metabolisch aktiv (Kappen 1988, Aubert et al. 2007). Dehydrierung und Rehydrierung sind bei trockenresistenten Flechten ein normaler Vorgang, keine destruktiven Ereignisse (Ahmadjian 1965, Kappen 1988, Lange et al. 2001). Abhängig von der Dauer der Anhydrobiose, kann die maximal mögliche photosynthetische Aktivität aber erst nach einer Regenerationszeit von bis zu 24 Stunden (PUBL. 2, 3) erreicht werden. Die meisten Flechten überstehen eine Austrocknung bis zu einem Wassergehalt von 5% des Trockengewichtes und können mehrere Monate bis Jahre (max. 3 Jahre, Honegger 2003) in Anhydrobiose verbleiben, wobei das dabei degenerierte Chlorophyll nach der Rehydrierung innerhalb von 1 Stunde neu synthetisiert werden kann (Kranner et al. 2003).

1.2.3 Frosttoleranz

Physiologische Experimente mit antarktischen Flechten bestätigten deren hohe Kälte- und Frostresistenz. Photobionten können bei niedrigen Temperaturen photosynthetisch und metabolisch aktiv sein (z.T. bis -18°C ; Lange & Kappen 1972, Kappen 1993, Kappen et al. 1996) und trockene sowie hydrierte Flechten und Photobionten konnten unter Laborbedingungen nach Gefrieren bis -196°C reaktiviert werden (Lange & Kappen 1972; Barták et al. 2007, Hájek et al. 2012, Sadowsky & Ott 2012). Im eingefrorenen Zustand (unter -20°C) gelagerte Flechten können bis zu 9,5 Jahre vital und kultivierbar sein (Honegger 2003).

1.3 Astrobiologie

Die Astrobiologie ist ein interdisziplinärer Wissenschaftszweig, der Astronomie, Geologie, Biologie, Chemie und verwandte Wissenschaften integriert und aus einem sehr breiten Spektrum an Forschungsgebieten Impulse erhält. Aus biologischer Sicht ist die gemeinsame Basis die Forschung an der Wahrscheinlichkeit oder Möglichkeit für die Evolution und Präsenz von Leben auf anderen Himmelskörpern als der Erde. Die NASA definiert Astrobiologie als *“the study of the origin, evolution, distribution, and future of life in the universe. This multidisci-*

plinary field encompasses the search for habitable environments in our Solar System and habitable planets outside our Solar System, the search for evidence of prebiotic chemistry and life on Mars and other bodies in our Solar System, laboratory and field research into the origins and early evolution of life on Earth, and studies of the potential for life to adapt to challenges on Earth and in space.”

Bezugnehmend auf das obige Zitat gilt die Erde als Modellsystem für die Astrobiologie. Erforscht wird sowohl der Einfluss von extraterrestrischen Bedingungen auf organische Moleküle sowie auf Prokaryoten und Eukaryoten bis hin zum Menschen (Bertrand et al. 2012, Horneck & Mancinelli 2010, de la Vega et al. 2007, Billi et al. 2011, Sancho et al. 2007, Persson et al. 2011, Gusev et al. 2012, Reitz et al. 2011), als auch die Bedingungen, unter denen Leben entstehen (Rettberg et al. 1998, Zahnle et al. 2007, Martin et al. 2008, Lammer et al. 2009) und überdauern kann (Cockell 1998, Harrison et al. 2013). Weitere Forschungsfelder sind der Schutz von zu erforschenden Himmelskörpern sowie der Erde vor biologischen Kontaminationen (Moissl-Eichinger et al. 2011, Horneck et al. 2012) und die Detektion von Leben anhand von sogenannten *biomarkers*, womit biogene Substanzen (Böttger et al. 2014, Baqué et al. 2014) oder Relikte biologischer Aktivität, wie z.B. Eisenbänderung oder atmosphärische Gase (Kappler et al. 2005) angesprochen sind, die nicht oder nur langsam durch abiotische Faktoren (z.B. UV) degeneriert werden.

1.3.1 Extreme Umwelten: Weltraum- und Marsanalogue Standorte

Standorte mit extremen Umweltbedingungen, die wegen ihrer geringen Wasserverfügbarkeit, extremen Temperaturen oder Lichtverhältnisse, nur von besonders adaptierten Organismen besiedelt werden können, eignen sich oft auch als Testgebiet für die Hard- und Softwareplanter Weltraummissionen. Heiße und kalte Wüsten oder trockene alpine Gebiete, z.B. in den antarktischen McMurdo Dry Valleys oder der Atacama Wüste in Chile, werden als Marsanalogue Standorte bezeichnet (Doran, Lyons & McKnight 2010). Die Organismen, die an solchen Standorten leben, z.B. *Xanthoria elegans*, *Pleopsidium chlorophanum* (Atacama), *Buellia frigida* (Antarktis), *Cryomyces minteri* (antarktischer endolithischer Ascomycet; Selbmann et al. 2005, Onofri et al. 2012), Bakterien und halophile Archaeen (Leuko et al. 2010), waren die naheliegende Wahl für Experimente unter Weltraumbedingungen. Sporenbildende Bakterien wie *Bacillus subtilis*, strahlenresistente *Deinococcus radiodurans*-Stämme und diverse Arten von Cyanobakterien (Friedmann & Ocampo-Friedmann 1995) sind darüber hinaus weithin eingesetzte prokaryotische Modellorganismen in der Astrobiologie (Nicholson et al. 2000, Horneck et al. 2012, Moeller et al. 2012, Frösler et al. 2013).

1.3.2 Lithopanspermie-Hypothese

Die ursprüngliche Panspermie-Hypothese basiert auf der Idee, Leben könne von einem Himmelskörper zum anderen durch den Weltraum übertragen werden (Thomson 1871, Arrhenius

1903). Die Lithopanspermie-Hypothese postuliert als Übertragungsvektor felsige Meteoriten, die Mikroorganismen geschützt transportieren könnten (Mileikowsky et al. 2000, Nicholson 2009). Auf der Erde gefundene Meteoriten vom Mars (Kvenvolden et al. 1971, Melosh 1984; Shuster & Weiss 2005) gaben u.a. Anlass diese Hypothese neu zu überprüfen (Horneck et al. 2001) und kontrovers zu diskutieren (Clark 2001).

Die Lithopanspermie-Hypothese umfasst drei Phasen (Gargaud 2011): Die Auswurf-Phase (*impact-/eject-phase*) beginnt mit einem Meteoriteneinschlag auf einem belebten Planeten, wodurch von Mikroorganismen besiedelte Gesteinstrümmen in den Weltraum katapultiert werden. Hierbei müssten die Organismen die erheblichen Schockdrücke und Hitzeentwicklung des Meteoriteneinschlages tolerieren. Bei Experimenten mit realistischen Schockdrücken bis 45 GPa überstanden z.B. einzelne *X. elegans*-Pilzhyphen Drücke (Stöffler et al. 2007, Horneck et al. 2008, Meyer et al. 2011). Die zweite Phase der Lithopanspermie wäre der Transfer durch den Weltraum, dessen wahrscheinliche Zeitdauer unterschiedlich diskutiert wird, wobei die kürzeste belegte Zeitspanne ca. 600 000 Jahre beträgt (Clark 2001). Im Weltraum würden ionisierende Strahlung, starke Sonneneinstrahlung mit kurzweiliger UV-Strahlung, Vakuum, Temperaturschwankungen und -extreme auf die transportierten Organismen einwirken. So haben z.B. Flechtenproben von *R. geographicum*, *C. gyrosa* und *X. elegans* im Rahmen der 10-16tägigen BIOPAN Experimente (Sancho et al. 2007; Raggio et al. 2011; vgl. 1.3.3) ihre Resistenz gegenüber realen Weltraumbedingungen demonstriert. Das mit 18 Monaten Expositionsdauer deutlich längere LIFE-Experiment auf der ISS (vgl. 1.4.1) sollte auch eine bessere Einschätzung der Wahrscheinlichkeit eines Transfers von Leben durch den Weltraum gestatten. Die dritte Phase der Lithopanspermie beginnt, wenn der Fels mit dem Mikroorganismen vom Schwerkraftfeld eines Himmelskörpers eingefangen wird und dort landet. Die dritte Phase erfordert aber insbesondere eine Möglichkeit zu landen, ohne durch die Reibungshitze beim Eintritt in eine Atmosphäre thermischen Schaden zu nehmen. Experimente zum Eintritt in die rezente Erdatmosphäre (STONE, de la Torre et al. 2010) wurden an der Außenhülle des FOTON Satelliten durchgeführt. Die Reibungshitze der dichten Erdatmosphäre verglaste die getesteten Gesteine und sterilisierte damit das komplette Experiment (de la Torre et al. 2010). Wenn ein solcher Wiedereintritt jedoch gelänge und der Himmelskörper habitabel wäre, d.h. er besäße eine Umwelt, die Leben erhalten kann, dann könnten sich die übertragenen Organismen nun ansiedeln.

1.3.3 Terrestrische und extraterrestrische abiotische Stressoren

UV-Strahlung

Aufgrund der fehlenden Absorption und Reflexion durch die Erdatmosphäre ist die Sonneneinstrahlung in der erdnahen Umlaufbahn energiereicher als auf der Erdoberfläche (Rettberg & Rothschild 2002). Die gesamte elektromagnetische Strahlungsleistung der Sonne wird als eingestrahelte Leistung pro Fläche durch die Solarkonstante beschrieben. Sie beträgt gemittelt 1367 Wm^{-2} und wird oberhalb der Erdatmosphäre gemessen (Gargaud 2011). Dabei entfallen

8% der Energie auf ultraviolette Strahlung mit Wellenlängen von 200 bis 400 nm (Ghetti et al. 2006). Auf dem Erdboden schwankt die eingestrahlte Leistung um 900 Wm^{-2} (abhängig z.B. von der Bewölkung; Frey & Lössch 2004). Kurzwellige energiereiche UV-Strahlung von 10 bis 300 nm wird von der Atmosphäre absorbiert, insbesondere durch die Interaktion mit Kohlendioxid und Sauerstoffmolekülen in der Stratosphäre (Ozonschicht), sodass energiereichere Wellenlängen $< 300 \text{ nm}$ den Erdboden bei intakter Ozonschicht nicht erreichen (Rettberg & Rothschild 2002). Folglich enthält terrestrisches Sonnenlicht lediglich UV-A-Strahlung (315-380 nm) und die weniger energiereichen Anteile (300-315 nm) der UV-B-Strahlung (280-315 nm). Die Intensität dieser terrestrischen UV-A/B-Strahlung ist vom jeweiligen Standort abhängig. An alpinen Standorten wurde eine Zunahme der Intensität von $\text{UV}_{300\text{nm}}$ um 24% je 1000 m Höhenunterschied dokumentiert (Blumthaler et al. 1997) und speziell in der Antarktis erhöht sich der UV-B Anteil durch den anthropogen verursachten Verlust von atmosphärischem Ozon (Jones & Shanklin 1995), womit sich dieser abiotische Stressor verstärkt (Lud et al. 2001). Die energiereicheren Wellenlängen $< 300 \text{ nm}$ stellen hingegen einen nur oberhalb der Stratosphäre (Ozonschicht; 15 bis 50 km über dem Erdboden) vorkommenden, extraterrestrischen Stressor dar. Insbesondere gilt dies für UV-Strahlung mit Wellenlängen $< 100 \text{ nm}$, die ausschließlich im Vakuum existent ist (Horneck et al. 2010).

Die differenzierte Betrachtung der Wellenlängen ist erforderlich, da diese unterschiedliche biologische Wirksamkeit besitzen. Gemäß dem Zusammenhang für den Energiegehalt von Photonen (Energie = Plancksches Wirkungsquantum \times Frequenz, mit Frequenz = c/λ) ist die Energie kurzwelliger Photonen höher. UV-C, insbesondere mit $\lambda < 200 \text{ nm}$ und $> 8,5 \text{ eV}$ kann Atome oder Moleküle direkt ionisieren. Die biologisch relevantere, direkte Wirkung von UV-C mit $\lambda = 200\text{-}280 \text{ nm}$ und UV-B (280-315 nm; ca. 4eV) auf exponierte Zellen beruht jedoch auf der Modifikation von Bindungen funktionaler Moleküle, wodurch diese ihre spezifische, biologische Funktion einbüßen. So besitzt die Peptidbindungen ein Absorptionsmaximum bei 220 nm, die DNA bei 260 nm und viele Proteine bei 280 nm. Dadurch sind die Moleküle bei Bestrahlung mit solchen Wellenlängen anfällig für Schäden. Polychromatisches UV-Licht kann somit gleichzeitig die DNA schädigen und deren Reparaturenzyme deaktivieren (Britt 1996, Daly 2012). Zudem produziert UV-Strahlung reaktive Sauerstoff- und Hydroxyl-Radikale, die Organismen indirekt schädigen indem sie u.a. Proteine oxidieren, in ihrer Funktionalität beeinträchtigen oder DNA-Basenverluste verursachen (Keresztes & Kovács 2002, Beblo 2010, Nawkar et al. 2013).

Zu den, durch UV-C und UV-B induzierbaren, DNA-Schäden zählen auch die DNA Photoprodukte (Douki & Cadet 2001, Buffoni Hall 2002). Die häufigsten Photoprodukte sind Dimere aus Pyrimidinbasen (Thymin, T oder Cytosin, C), das Cyclobutyl-Pyrimidin-Dimer und das (6-4) Photoprodukt (Ravanat et al. 2001; Douki et al. 2003; Cadet et al. 2005). Falls diese Basendimere nicht durch Photolyasenaktivität oder DNA-Reparaturenzyme mittels Nukleotid-Exzisions-Reparatur getrennt werden, behindern sie die DNA-Replikation und Transkription oder können sogar DNA-Doppelstrangbrüche induzieren (Britt 1996).

Die Photosynthese, als essentielle Stoffwechselleistung photoautotropher Organismen, kann auf unterschiedliche Weise beeinträchtigt werden. Dies kann durch UV-induzierte Schäden ihrer Komponenten geschehen (z.B. des D1 Proteins oder des Rubisco-Enzyms), durch den Verlust photosynthetischer Pigmente, durch oxidative Membranschäden oder durch die beeinträchtigte Expression von benötigten Genprodukten (Vass 1997, Bischof et al. 2000, Lütz et al. 2005, Mackerness et al. 1999; Review-Artikel von Holzinger & Lütz 2006).

Vakuum und Mars-analoge Atmosphäre

Ein abiotischer Faktor, der das Überleben von biologischen Proben in extraterrestrischen Umwelten begrenzt, ist die extreme Austrocknung in einem Vakuum (Nussinov & Lysenko 1983, Horneck et al. 2002, 2010). Während der Exposition erfuhren die Proben ein Vakuum von 10^{-4} bis 10^{-7} Pa (10^{-9} mbar), während die Proben in der Simulation der EXPOSE-E Mission (Mission Ground Reference, MGR) im DLR Köln einem konstanten Vakuum von $1,7 \cdot 10^{-3}$ Pa ausgesetzt waren. Sowohl auf der ISS, als auch in der MGR betrug der atmosphärische Druck der Mars-analogen Exposition 10^3 Pa (10 mbar), entsprechend $\sim 1\%$ des atmosphärischen Druckes der Erde von 101300 Pa (1013 mbar). Die Mars-analoge Atmosphäre des LIFE-Experimentes unterschied sich einerseits durch den reduzierten Druck, andererseits durch die Komposition ihrer Gase (95,3% CO₂, 2,7% N₂, 1,6% Ar, 0,15% O₂, 370 ppm Wasserdampf; alle Daten gemäß Rabbow et al. 2012) von der Erdatmosphäre, die zu $\sim 78\%$ aus Stickstoff besteht und nur 0,04% CO₂ enthält. Auch die Mars-analogen atmosphärischen Bedingungen, besonders der geringe Druck unterhalb des Triplepunktes von Wasser, wirken stark austrocknend (Horneck et al. 2010). Inwiefern sich ein Unterschied zu den Vakuum-Bedingungen in der Vitalität der biologischen Proben widerspiegelt, stellt eine Fragestellung des EXPOSE-E/LIFE-Experimentes dar.

Simulierte Weltraumbedingungen / Experimente im Weltraum

Fünf verschiedene Flechtenarten (*Rhizocarpon geographicum*, *Buellia frigida*, *Xanthoria elegans*, *Pleopsidium chlorophanum* und *Circinaria gyrosa*) wurden in den bisherigen Simulationsexperimenten abiotischen Stressfaktoren unterworfen, wie sie unter extraterrestrischen Bedingungen erwartet werden. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf extraterrestrischer UV-Strahlung, aber mit Blick auf die geplanten Weltraumexperimente bestanden die Simulationen auch aus kombinierten Stressoren. Experimente mit polychromatischer UV-Strahlung ($\lambda > 160$ nm) unter Vakuum (10^{-3} Pa) zeigten, dass intakte Thalli durch 150 kJm^{-2} nicht in ihrer Vitalität beeinträchtigt wurden, während isolierte Photobionten bei 40 kJm^{-2} noch 30% ihrer Vitalität behielten (de Vera et al. 2003). Nach einem vergleichbaren Experiment mit UV-Bestrahlung bis $232,8 \text{ kJm}^{-2}$ unter einem Vakuum von $3,6 \times 10^{-5}$ Pa über 8 h zeigten 25-42% der Photobionten und 65-85% der Mycobionten metabolische Aktivität. Die Mycelien des Mycobionten zeigten einen geringen Vitalitätsverlust gegenüber der Kontrolle, allerdings konnten Photobionten nur kultiviert werden, wenn sie sich innerhalb von Clustern gegenseitig

vor UV-Strahlung beschattet hatten (de Vera et al. 2008). In diesen Simulationen zeigte sich *X. elegans* auch resistent gegenüber der energiereicheren UV-Strahlung ($\lambda < 300$ nm), die in den terrestrischen Habitaten der Flechte nicht vorkommt. Im Weiteren wurden Experimente in Kooperation mit dem Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR) durchgeführt, um die Exposition auf der ISS vorzubereiten; die sogenannten EVT (*experimental verification tests*) und der SVT (*scientific/space verification test*). In diesen Versuchsreihen wurden UV-Temperatur- und Vakuumbedingungen (bis 10^{-5} Pa; 2 Wochen maximal) in den DLR-Laboren appliziert, und anschließend die photosynthetische und metabolische Aktivität der Proben überprüft (Abb. A1.3).

Die bisher durchgeführten Experimente mit Flechtenproben im Weltraum nutzten die BIOPAN-Plattform, die außen auf einem FOTON-Satelliten montiert war. Während des 10- bzw. 16-tägigen Aufenthaltes in der Umlaufbahn war die Experimentplattform geöffnet, um die Flechtenproben dem Vakuum zu exponieren, wobei verschiedene Bestrahlungsregimes durch entsprechende Filterung realisiert wurden. Proben von *X. elegans* wurden in allen drei BIOPAN-Experimenten eingesetzt. Nach dem 16-tägigen Experiment LICHENS II (BIOPAN 5/FOTON M2) demonstrierten die Proben eine hohe metabolische Aktivität (67-75%) und regenerierten ihre Photosyntheseaktivität fast vollständig innerhalb von 72 Stunden (Sancho et al. 2007). Die BIOPAN-Experimente und die Ergebnisse über die Vitalität der Flechtenproben auch nach kurzweiliger UV-Strahlung (>110 nm) bildeten die Grundlage für die Langzeit-Expositionsexperimente auf der ISS. Einen Überblick über die Simulations- und alle Weltraumexperimente mit Flechten enthält die Tabelle 1 in der PUBLIKATION 1.

1.4 Exposition auf der Internationalen Raumstation (ISS)

1.4.1 Astrobiologische Plattform EXPOSE-E

Zum ersten Mal wurden Flechten auf der Internationalen Raumstation im Rahmen des ESA-Projektes EXPOSE-E über einen Zeitraum von 18 Monaten den besonderen Umweltbedingungen des Weltraumes und dort simulierten Mars-analogen Bedingungen ausgesetzt. Eine speziell für astrobiologische Experimente konstruierte Versuchsplattform (EXPOSE *facility*, Kayser-Threde, München) wurde außerhalb des Columbus-Modules montiert, um die astrobiologischen Proben zu exponieren (Horneck & Zell 2012, Rabbow et al. 2012). Die aus dem Weltraum erhaltenen Umweltdaten, einschließlich der Strahlungsmessung wurden im DLR Köln verarbeitet (Rabbow et al. 2012, Berger et al. 2012), wo auch die Integration der Proben in die Hardware durchgeführt wurde. Ein zweites Set von Proben wurde hier einer Simulation der EXPOSE-E Umweltbedingungen ausgesetzt (Mission Ground Reference, MGR). Entsprechend der erhaltenen und kalkulierten Daten wurden Vakuum und UV-Strahlung (Rabbow et al. 2012) simuliert, nicht aber Schwerelosigkeit noch ionisierende kosmische Strahlung. Insgesamt wurden sieben Experimente in diesem astrobiologischen Projekt durchgeführt, an deren Umsetzung und Auswertung zahlreiche wissenschaftliche Arbeitsgruppen aus Europa mit biologischen Proben und biochemischen Substanzen beteiligt waren (Rabbow et al. 2012).

Flechten in diesem Projekt zu exponieren, war sowohl durch die Toleranz von Flechten gegenüber extremen Umweltbedingungen motiviert (vgl. 1.2) als auch durch die hohe Vitalität von *X. elegans*, *Rhizocarpon geographicum* und *Circinaria gyrosa* nach den Simulations- und Expositionsexperimenten (vgl. 1.3.3). Die Umsetzung erfolgte in enger Kooperation mit dem Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR) in Köln.

1.4.2 Flechten-Expositionsexperimente auf der ISS

Flechtenthalli und isolierte Mycobionten von *Xanthoria elegans* wurden im *Lichen and Fungi Exposure* Experiment (LIFE) als Teil der EXPOSE-E Mission (Horneck & Zell 2012, Rabbow et al. 2012) auf der ISS exponiert. Im gleichen Experiment wurden ebenso Proben von *Rhizocarpon geographicum*, *Cryomyces antarctica* und *C. minteri* (Onofri et al. 2012, Scalzi et al. 2012), sowie isolierte Mycobionten von *R. geographicum* exponiert. Die insgesamt 16 Proben von *Xanthoria elegans* mit je 0,9 cm Durchmesser wurden mit ihrem Substrat (Schiefergestein) über Silicagel getrocknet und anschließend in die EXPOSE Einheit integriert. Dabei wurden die Proben mit dem oberen Cortex zur Einstrahlung hin ausgerichtet. Während des kompletten Experimentes verblieben die Proben in Anhydrobiose und wurden nach ihrer Rückkehr bei -20°C gelagert.

Nach der Montage der EXPOSE Einheit außen am Columbus-Modul wurde ein Teil der Einheit ventiliert, wodurch der atmosphärische Druck für die Dauer der Exposition dem Vakuum im erdnahen Orbit entsprach (10^{-4} bis 10^{-7} Pa). Im Vakuum exponierte Proben waren mit einem MgF₂-Fenster abgedeckt, welches alle Wellenlängen von $\lambda \geq 110$ nm passieren ließ, während unter Mars-analoger Atmosphäre (10 hPa, 95% CO₂) exponierte Proben mit einem Suprasil-quartz-Fenster versiegelt waren, um Wellenlängen von $\lambda > 200$ nm passieren zu lassen, entsprechend den Bedingungen auf der Marsoberfläche. Für beide Probensets wurden im LIFE Experiment drei Lichtregimes realisiert: ohne direkte Einstrahlung (Transmission, T = 0), mit Filterung auf 0,1% der Einstrahlung (T = 0,1%) und volle Einstrahlung (T = 100%). Die Temperatur schwankte während der Expositionszeit von -21,7 bis +43°C mit einem einmaligen Anstieg auf 61°C. Innerhalb der 18 Monate ereigneten sich 100 Tau-/Gefrierzyklen (Rabbow et al. 2012, PUBLIKATION 2).

Die Tabelle 1 in PUBL. 2 gibt die jeweiligen Strahlungsenergien für die einzelnen Probenpositionen an, sowohl für das eingestrahlte Spektrum von 110 bzw. 200 nm $< \lambda >$ 1 mm, als auch für UV-Strahlung und Licht (400-700 nm) und jeweils bezogen auf die Expositionszeit von 559 Tagen. Etwa 20% der Umweltdaten standen zur Auswertung nicht zur Verfügung (Rabbow et al. 2012), daher wurden – auf der Basis der vorhandenen Daten und mit Hilfe einer detaillierten Simulation – Datensätze kalkuliert (RedShift Report 2011), die Werte der UV-A, -B, -C und photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR) für jede einzelne Probenposition enthielten. Durch die Berücksichtigung von Beschattungszeiträumen sind die Werte der Simulation deutlich niedriger, als die Werte, die für die Bestrahlung der MGR parallel zum EXPOSE-Versuch aus der reinen Solarkonstante errechnet wurden (Rabbow et al. 2012). Da die detail-

lierte RedShift-Kalkulation Werte für jede einzelne Probenposition liefert, werden diese Daten hier verwendet. Die Werte für die UV-Bestrahlung der MGR (Rabbow et al. 2012) sind vergleichend in Tabelle 1, PUBL. 2 aufgeführt.

1.4.3 Ionisierende Strahlung: LIFE-Experiment auf der ISS

Die ISS umrundet die Erde auf einer erdnahen Umlaufbahn in 380-400 km Entfernung, innerhalb des sogenannten *low-Earth-orbit* (LEO), womit alle Entfernungen von etwa 300 km bis über 1500 km über der Erdoberfläche angesprochen werden (Montenbruck & Gill 2012). Damit bleibt sie unterhalb der Van-Allan-Strahlungsgürtel, die sich durch das Erdmagnetfeld bilden und in denen sich die abgelenkten, beschleunigten Elektronen, Protonen und schweren Ionen aus kosmischen und galaktischen Strahlenquellen sammeln (Benton & Benton 2001, Reitz 2008). Während der 18-monatigen Expositionszeit wurde die auftreffende ionisierende Strahlung mit unterschiedlichen Dosimetern detektiert (Dachev et al. 2012; Berger et al. 2012) und analysiert. Für die Proben von *X. elegans* resultierte eine akkumulierte Dosis von 216 ± 15 mGy (Berger et al. 2012). Der größte Teil dieser ionisierenden Strahlung traf die ISS beim Durchfliegen der südatlantischen Anomalie (SAA), womit die Deformation des inneren Strahlungsgürtels beschrieben wird, der über dem Südatlantik tiefer an die Erde heranreicht (Horneck et al. 2010, Berger et al. 2012). Die in der SAA akkumulierte Strahlung ging hauptsächlich auf beschleunigte Protonen (< 200 MeV) und Elektronen (< 7 MeV) zurück (Berger et al. 2012, Dachev et al. 2012). Der kleinere Anteil der gemessenen Strahlung galaktisch-kosmischen Ursprunges enthält zu 1% beschleunigte schwere Ionen (Dachev et al. 2012), sog. HZE Partikel (*High atomic number Z and energy E*), die radiobiologisch relevant sind (Horneck 1994). Um einen Dosisvergleich zur Strahlenbelastung auf der Erdoberfläche (0,3 mSv kosmische plus 0,5-2 mSv terrestrische Strahlung im Jahr) zu erhalten, dient die Äquivalenzdosis von 1,3 mSv pro Tag außerhalb der ISS (MATROSHKA-Experiment, Berger 2005). Am natürlichen Standort der Proben auf ca. 2000 m üNN beträgt die Jahresdosis kosmischer Strahlung 0,6 mSv (Berger, pers. Kom.). Die Dosis ionisierender Strahlung war somit auf der ISS ca. 300mal höher als im natürlichen terrestrischen Habitat. Ohne Berücksichtigung der Art der auftretenden ionisierenden Strahlung ist die Jahresdosis von 0,150 Gy außerhalb der ISS etwas geringer als die Jahresdosis auf der Marsoberfläche mit 0,170 Gy (Hassler et al. 2014), wodurch die Simulation der Mars-analogen Umwelt ebenfalls komplettiert wird.

1.5 Ionisierende Strahlung jenseits des Erdmagnetfeldes

Die Quellen ionisierender Strahlung (wie beschleunigte Ionen, Protonen und Elektronen) sind Supernovae, Pulsare, schwarze Löcher und Quasare (galaktisch-kosmische Strahlung, Reitz 2008), Sonnenwind und Sonnenflares (solare kosmische Strahlung, Ajello et al. 2014) sowie anomale kosmische Strahlung (Wechselwirkung von Sonnenwind mit interstellarer Materie, Reitz 2008). Viele dieser Quellen einschließlich unserer Sonne emittieren neben Teilchen-

strahlung auch γ -Strahlung, die zur kosmischen Strahlung gehört (Kraushaar et al., 1972). Durch die Wechselwirkung dieser Strahlung mit Materie, z.B. mit dem Gehäuse der EXPOSE-E Einheit, kann sekundäre, ebenfalls ionisierende Streustrahlung entstehen (Horneck et al. 2002). Sowohl die Strahlenqualität als auch ihre Intensität hängen von der Position im Raum oder der Flugbahn ab und ändern sich mit der Zeit, z.B. durch Sonnenaktivität und extrasolare Ereignisse wie *cosmic γ -ray bursts* (Klebesadel et al. 1973; Verter 1982). Die hohe Komplexität eines sich aus verschiedenen Strahlenarten und -intensitäten zusammensetzenden Strahlenumfeldes verbietet pauschalisierte Aussagen. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit quantitative Dosisraten von konkreten (Mars) bzw. erdnahen Positionen (ISS) als Bezugsgrößen verwendet.

Bei astrobiologisch motivierten Fragen nach der Habitabilität einer Planetenoberfläche (Lammer et al. 2009, Cockell 2014) oder der Wahrscheinlichkeit der Lithopanspermie-Hypothese muss das destruktive Potential ionisierender Strahlung als ein potentiell limitierender Faktor für Leben berücksichtigt werden. Die während des LIFE-Experimentes auf der ISS in der Erdumlaufbahn akkumulierte Strahlung (vgl. 1.4.3) gestattet aufgrund der relativ geringen Dosis jedoch keine Aussagen über die Resistenz der Proben gegenüber kosmischer Strahlung z.B. während eines Transfers durch den Weltraum. Daher komplettieren die Experimente mit ionisierender Strahlung die LIFE-Expositionsexperimente bezüglich der Strahlung unter Weltraumbedingungen jenseits des Erdmagnetfeldes.

1.5.1 Simulation von kosmischer Strahlung: ionisierende Strahlung in hoher Dosis

In Zusammenarbeit mit dem Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt in Köln und dem National Institute of Radiological Science (NIRS) in Chiba, Japan, wurden im Rahmen einer internationalen Kooperation von astrobiologischen Arbeitsgruppen unterschiedliche astrobiologische Modellorganismen hohen Dosen ionisierender Strahlung ausgesetzt. Die Qualitäten der Strahlung wurden bewusst so gewählt, dass sie den Komponenten der galaktisch-kosmischen und solaren kosmischen Strahlung nahe kommen und sich eine Simulation von der im All über lange Zeiträume zu erwartenden Strahlung ergibt. Die erhaltenen Ergebnisse für die unterschiedlichen Organismen (Archaeen, Bakterien, Flechten, Photobionten) können im Anschluss an die Analysen verglichen werden.

Der erste Teil des Experimentes für die vorliegende Arbeit umfasste die Bestrahlung von Flechtenproben von *Xanthoria elegans* (PUBLIKATION 4), von *Circinaria gyrosa* sowie von isolierten Photobionten aus *Circinaria gyrosa* (Gattung *Trebouxia*) mit beschleunigten Ionen bis zu einer Dosis von 2 kGy, die im *Heavy Ion Medical Accelerator* (HIMAC, Zyklotron) des NIRS getrennt für die unterschiedlichen Ionen durchgeführt wurde. Dabei wurden beschleunigte Heliumionen mit niedrigem linearem Energietransfer zur Simulation kleiner, geladener Partikel eingesetzt. Tatsächlich machen Helium-Ionen 14% der baryonischen, galaktisch-kosmischen (GCR) und 5-10% der solaren kosmischen Strahlung (SCR) aus. Hochbeschleunigte Eisen-Ionen mit hoher Ionisierungsdichte – einer hohen Zahl an Ionisierungsereignissen

auf ihrer Flugbahn – dienen als Beispiel für sehr energiereiche Teilchen mit hoher Masse, die sogenannten HZE-Partikeln. Eisenionen stellen einen kleinen Anteil der kosmischen Strahlung (0,03% der GCR und 1% der SCR), verfügen aber über hohes biologisches Schadenspotential (Horneck 1992).

Im zweiten Teil der Kampagne wurden γ -Strahlen eingesetzt, um die elektromagnetischen Komponenten extraterrestrischer Strahlung zu simulieren, die insbesondere ein relevanter Anteil der SCR sind (Reitz 2008). Durch die Applikation von γ -Strahlung bis 113 kGy sollte die Grenze der Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung ermittelt werden. Für beide Teile des STARLIFE-Experimentes wurden die Proben von *Xanthoria elegans* und die aus *Circinaria gyrosa* isolierten Photobionten getrocknet sowie in Anhydrobiose transportiert und bestrahlt (PUBL. 4, 5).

Ergänzt wurden diese Hochdosis-Bestrahlungsexperimente mit anhydrobiotischen Flechten durch Röntgenbestrahlungsexperimente (1-100 Gy) mit aktivierten, feuchten Thalli von *X. elegans*. Dabei bestand ein Probenset aus einzelnen präparierten Thalli und ein zweites aus Thalli von *X. elegans* auf ihrem natürlichen Schiefersubstrat. Die Röntgenbestrahlung wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Molekulare Radioonkologie der HHU durchgeführt (PUBL. 4).

1.5.2 Wirkung von ionisierender Strahlung

Während geladene beschleunigte Partikel (im Experiment Eisen- und Heliumionen) direkt ionisierend wirken und durch Bremsung, Anregung und Stoßionisationen Energie abgeben, wirkt Photonenstrahlung (im Experiment Röntgen- und γ -Strahlung) indirekt durch die Freisetzung von sekundären Elektronen, entweder nach Streuprozessen (elastische oder Compton-Streuung) oder Absorption (Photoeffekt oder Paarbildung). Der größere Anteil von Ionisationen wird von den sekundären Elektronen verursacht, da diese sich ihrerseits wie beschleunigte geladene Partikel verhalten (Goretzki 1987).

Wieviel Energie dabei an die Materie übertragen wird, ist von zahlreichen Faktoren abhängig wie der primären Teilchenenergie, der Dichte der Ionisationsereignisse, den durch Streuung und Absorption erzeugten sekundären Effekten und dem bestrahlten Material (sog. Bremsvermögen). Um die Wirkung von ionisierenden Teilchen oder Photonen auf biologisches Material einzuschätzen oder zu vergleichen, hat sich als Maß der lineare Energietransfer (LET) etabliert. Der LET gibt Auskunft über die Ionisationsdichte, indem er den Grad Energieabgabe und Absorption längs der Bahn eines ionisierenden Teilchens oder elektromagnetischer Strahlung angibt (Rassow 1980). Der LET berücksichtigt nicht die entstehenden Sekundärelektronen mit hoher Energie. Das bestrahlte Material, die momentane Energie des Teilchens und die Art der Strahlung oder des Teilchens beeinflussen den Wert des LET. Ein zusätzlicher Effekt ergibt sich bei beschleunigten Ionen, die ihre kinetische Energie durch Ionisationsprozesse übertragen. Sie werden dabei selbst gebremst und verlieren pro Weeinheit zunehmend Energie, wodurch sich gegen Ende dieses Vorgangs ein als Bragg-Peak bezeichnetes Maxi-

mum an Energieabgabe ergibt (Thwaites 1983). Beschleunigte Ionen verfügen über eine individuelle, aufwendig zu berechnende Reichweite, die zu ihrer Beschleunigungsenergie korreliert ist, sowie negativ korreliert ist zu ihrer Größe und Ladungszahl, aber ebenso vom bestrahlten Material abhängt (Ziegler & Biersack 1985, Ziegler et al. 2010).

In den Bestrahlungsversuchen zur galaktischen Strahlung wurden Helium- und Eisenionen verwendet, deren LET-Werte sich um den Faktor 100 unterscheiden (2,2 resp. 200 keV/μm). Für die Versuche zur maximalen Resistenz gegenüber hohen Strahlendosen wurden γ-Strahlen mit einem LET von 0,3 keV/μm eingesetzt. Allerdings beschreiben die physikalischen Größen nicht die biologische Wirkung von Strahlung, sondern nur die Energieübertragung. Der Weg von Einstrahlung über Energieübertragung und Absorption bis zur Manifestation biologischer Defekte ist bereits durch die hohe Anzahl unterschiedlicher Moleküle im Organismus ausgesprochen komplex. Dabei zählt man die Ionisation biologisch relevanter Makromoleküle zu den oben erwähnten direkten Strahlenwirkungen. Durch Ionisation können Bindungen getrennt und Enzyme inaktiviert werden. Mutagene und letale Wirkungen beruhen auf verschiedenen Schäden an der DNA, insbesondere können Basenverluste oder Einzel- und Doppelstrangbrüche (Depolymerisation) induziert werden (Krieger 2004). Eine lokale Anhäufung von Strangbrüchen und inaktivierten Enzymen (*clustered damage*) kann zu irreparablen DNA-Schäden führen (Shikazono et al. 2009). Zusätzlich induzierte Bindungen, z.B. zwischen Histonen und DNA oder DNA-Dimerisierung, behindern die Replikation und Proteinbiosynthese (Britt 1996, Daly 2012). Die indirekte Wirkung von Strahlung beruht auf der Ionenbildung bei kleineren Molekülen, dabei hat vor allem die Radiolyse von Wasser signifikanten Einfluss (Riley 1994). Hierbei werden durch Ionisation und Anregung hochreaktive Radikale erzeugt, deren Reaktionen mit den biologischen Molekülen wiederum die Integrität von Enzymen, Proteinen und DNA gefährden. Diese indirekte Form der Strahlenwirkung kann den größeren Anteil der Schäden verursachen, verglichen zur direkten Wirkung der Strahlung (Keresztes & Kovács, 2002). Durch in der Umwelt vorhandenen Sauerstoff wird die Bildung von Radikalen, Peroxiradikalen und Wasserstoffperoxid gesteigert (Epp 1968) und die Schäden durch die applizierte Strahlung deutlich gesteigert.

1.6. Motivation und Ziele

Es gehört zu den primären Zielen astrobiologischer Forschung und somit von Weltraumexpositionsexperimenten, ein verbessertes Verständnis für die Prozesse zu erzielen, welche die Entstehung, Evolution und Verbreitung von Leben im Universum antreiben; sei es auf der Erde entstanden oder auf einem anderen Himmelskörper. Expositionsexperimente im Erdorbit mit resistenten Organismen bieten die Möglichkeit die kombinierte Wirkung aller abiotischen Faktoren des Weltraumes zu untersuchen (Horneck 1998), insbesondere der extraterrestrischen Einstrahlung, die auf der Erde nicht in gleicher Weise simulierbar ist. Basierend auf den Erkenntnissen der BIOPAN-Experimente und unterschiedlicher Simulationen wurde mit LIFE auf der ISS das erste Expositionsexperiment mit Flechten über einen deutlich länge-

ren Zeitraum von 18 Monaten durchgeführt. Ebenfalls zum ersten Mal wurde eine Mars-analoge Umwelt auf der ISS simuliert, sodass ein Vergleich der parallel unter Mars- sowie *low-Earth-orbit* Bedingungen exponierten Proben möglich war. Dabei sollte die Mars-analoge Exposition nicht nur Aussagen über die Resistenz der Organismen erlauben, sondern sollte ebenso Daten für die Diskussion über die potentielle Habitabilität des Mars bereitstellen.

Die grundsätzliche Frage dieser Arbeit war, ob die auf der ISS exponierten Flechten die Langzeit-Exposition im Weltraum bzw. unter Mars-analogen Bedingungen überleben können und ob die physiologischen und anatomischen Adaptionen an die Umweltbedingungen der extremen terrestrischen Habitate auch gegenüber den extraterrestrischen Stressoren (Vakuum, UV, ionisierende Strahlung) Resistenz vermitteln. Dies schloss die Frage ein, ob die Symbiose unter diesen Bedingungen ein Schlüsselprinzip für das Überleben der Symbionten sein kann. Das Resistenzpotential von Symbionten und Flechte gegenüber den unterschiedlichen Stressoren, sowie die eventuellen Schäden und Defizite, sollten dafür möglichst exakt erfasst werden, insbesondere mit Blick auf die exklusiv in Symbiose vorhandenen Eigenschaften.

Zusätzlich sollte dieses Experiment, wie bereits die BIOPAN-Experimente, als Simulation der Transfer-Phase der Lithopanspermie-Hypothese dienen. Trotz des dafür kurz anmutenden Zeitraumes von 1,5 Jahren, ist mit Blick auf den Transport von Organismen durch den Weltraum oder ihrem Überleben in extraterrestrischen Umwelten, von relevantem Interesse, ob sich die limitierenden Faktoren für das Überleben der Flechtenproben eingrenzen lassen.

Nachdem evident war, dass die ionisierende Strahlung außerhalb der ISS kein ausreichender Test für die Resistenz von *X. elegans* gegenüber Strahlung war, und die Strahlung weder in Quantität, noch in ihrer Qualität, vergleichbar mit kosmischer und galaktischer Strahlung war, wurden die Bestrahlungsexperimente mit hohen Dosen ionisierender Strahlung unterschiedlicher Strahlenqualität in die vorliegende Arbeit integriert. Dies insbesondere, um exaktere Aussagen zur möglichen Überlebensfähigkeit von Flechtenproben jenseits der erdnahen Umlaufbahn der ISS zu erzielen.

1.7. Analysen zur Resistenz der Flechte *Xanthoria elegans*

1.7.1 Vitalitätsanalysen

Fluoreszenzfärbung zur Analyse metabolischer Aktivität (LIVE/DEAD *staining*)

Um eine Analyse der metabolischen Aktivität beider Symbionten im Thallus durchführen zu können, wurden reaktivierte Thalli mit Fluoreszenzfarbstoffen inkubiert, die eine Differenzierbarkeit von lebenden und toten Zellen ermöglichen. Der Farbstoff FUN-1[®] passiert dabei die intakte Membran, wird von metabolisch aktiven Zellen strukturell verändert und anschließend in den Zellvakuolen deponiert, wodurch die Fluoreszenzeigenschaften modifiziert werden (Millard et al. 1997). Die metabolisierten Farbstoffmoleküle emittieren dann Fluoreszenzsignale in einer anderen, längeren Wellenlänge, womit die Zelle als metabolisch aktive Zelle

markiert wird. Dieses Messprinzip lieferte in den vorbereitenden Experimenten mit Kontrollgruppen aus vitalen, sowie mit 4 Stunden lang autoklavieren, also deaktivierten Thallusproben reproduzierbare Ergebnisse. Um den FUN-1® Farbstoff für die Darstellung der metabolischer Aktivität im Flechtenthallus bei *Xanthoria elegans* in dieser Arbeit einzusetzen und eine quantitative Analyse durchzuführen, wurde das der experimentelle Verlauf und die verwendeten Protokolle (de Vera et al. 2003) in vorbereitenden Experimenten bzgl. Inkubationszeit und -temperatur, sowie Farbstoffkonzentration optimiert und neu verifiziert.

Zur Analyse der fluoreszenzgefärbten Mikrotomschnitte wurde im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510M, Zeiss) der Farbstoff mit dem Argon-Laser (488nm) angeregt und die emittierten Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Wellenlängen in differenzierten Kanälen detektiert. Das von den Zellen emittierte Fluoreszenzsignal verändert sich durch eine Metabolisierung des Farbstoffes von grün (530 nm) nach intensiv gelb und schließlich nach rot (615 nm). Untersucht wurden Proben aus Weltraum- und Mars-analoger Exposition, einschließlich der MGR und ausgewählter Simulationen, wobei von jeder Probe drei Präparate (z.B. Mitte, Rand sowie Apothecien) in die Analyse gingen. Anhand dokumentierter CLSM-Bilder ist die metabolische Aktivität von ISS- und MGR-Proben für beide Symbionten durch Auszählen der Fluoreszenzsignale quantifiziert worden (PUBL. 2).

Die Autofluoreszenz des Chlorophylls lieferte dabei zusätzliche Information über Zustand des Photobionten, daher wurde das Fluoreszenzsignal in einem zusätzlichen Kanal des CLSM dokumentiert. Für die Quantifizierung der metabolischen Aktivität nach den Bestrahlungsexperimenten bis 2000 Gy mit Eisen-Ionen, Helium-Ionen und Röntgenstrahlung wurde die Methode unverändert eingesetzt, wodurch die Ergebnisse direkt vergleichbar sind (PUBL. 4).

Chlorophyll *a* Fluoreszenz / maximaler Quantum Yield des Photosystems II

Aufgrund der essentiellen Bedeutung einer intakten Photosynthese für die photoautotrophen Algen (und damit die gesamte Flechtensymbiose) diente die Analyse der photosynthetischen Aktivität als Maß für deren Vitalität. Die Methode detektiert die Chlorophyll *a* Fluoreszenz bei zuvor dunkel-adaptierten Proben nach einem Messlichtimpuls und ermittelt die potentielle Quanteneffizienz des Photosystems II (PS II) aus dem Quotienten von variabler und maximaler Fluoreszenz (F_v/F_m ; synonym: maximaler *quantum yield* (QY) des PS II). Dieser Wert wird als Indikator für die photosynthetische Leistungsfähigkeit der Pflanze bzw. Alge angesehen (Maxwell & Johnson 2000, Jensen 2002, Sadowsky & Ott 2012). Die F_v/F_m -Werte wurden mit einem Puls-Amplituden-modulierten Messverfahren (Mini-PAM, Walz) ermittelt (PUBL. 2, 4, 5). Alternativ wurde eine FluorCam (FC 800, Photon Systems Instruments, siehe PUBL. 1, vgl. 2.4.1, A5.1) eingesetzt, die nach gleichem Prinzip den F_v/F_m Wert des PS II ermittelt, zusätzlich aber eine optische Darstellung der Werte liefert. Fast alle Proben in dieser Studie befanden sich während der Expositionsexperimente (LIFE, STARLIFE) in Anhydrobiose, somit setzte die Messung der Photosyntheseaktivität eine Reaktivierung der Photobionten durch Befeuchtung voraus.

Sporulationsversuche mit Apothecien (Mycobiont)

Eine Studie der Sporulation und Germination von *X. elegans* Sporen wurde bereits zur Vitalitätsanalyse des Mycobionten nach 16-tägiger Weltraumexposition (LICHENS II, BIOPAN 5, Sancho et al. 2007) durchgeführt. Für eine vergleichende Analyse der Sporulation und Germination nach der 18-monatigen Exposition auf der ISS wurden Apothecien präpariert und im Deckel einer Petrischale fixiert, sodass die Sporen auf einem Filter aufgefangen werden konnten, der dem Malt-Yeast-Medium auflag. Steril ausgeschnittene Filterstreifen mit Sporen konnten nach einer Lactoglycerin-Baumwollblau-Färbung lichtmikroskopisch untersucht werden. Die Analyse der Kontrollgruppen ergab bereits eine erratische, geringe und nicht reproduzierbare Sporulationsrate, wobei die Sporulation bei 8 von 12 Ansätzen komplett ausblieb und die Keimungsrate der Sporen zwischen 0-50% schwankte. Die auf der ISS und in der MGR exponierten Proben sporulierten ebenfalls nicht. Das im Institut etablierte Verfahren wurde noch zweimal mit Modifikationen durchgeführt, mit dem Ziel die Sporulation zu stimulieren. Die lichtmikroskopisch untersuchten Apothecien aus dem Expositionsexperiment enthielten Sporen in variierender Zahl, wovon sich ein Teil als unreife Sporen darstellte. Eventuell wurden die reifen Sporen während der Präparation der Proben ausgeschleudert. Das Experiment wurde aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit nicht weitergeführt.

Kultur des Photobionten / Kultur von Photo- und Mycobiont

Zur qualitativen Überprüfung der Vitalität nach LIFE wurden von den auf der ISS exponierten Flechten Photobionten isoliert und kultiviert. Ziel dieser Kultur war die Überprüfung der prinzipiellen Kultivierbarkeit aller Photobionten nach 18 Monaten unter Weltraum- sowie unter Mars-analogen Bedingungen. Als Kontrolle wurden gleichzeitig mit den exponierten Proben gesammelte, unbehandelte Thalli von *X. elegans* gewählt, welche während der Zeit des LIFE-Experimentes bei -20°C lagerten. Die Photobionten in ihren charakteristischen Clustern wurden aus der Flechte isoliert und auf das feste Kulturmedium übertragen, wahlweise *Trebouxia Organic Medium* (TOM 1%; Ahmadjian 1967) oder BG11 (Stanier et al. 1971). Die Medien enthielten zusätzlich 200 µl/g Antibiotikum (Ampicillin) und 5 µl/g Antimykotikum (Amphotericin B). Während der Kulturdauer von 200 Tagen wurden die Kulturen kontrolliert, photographisch dokumentiert und eventuelle Kontaminationen beseitigt.

Im Rahmen der Analysen zur Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung (STARLIFE) wurde ein kombinierter Kulturansatz für Photo- und Mycobionten durchgeführt (TOM 1% Agar, ohne Zugabe eines Antimykotikums). Während der Kulturdauer von 8 Wochen wurden die Kulturen mittels einer FluorCam auf Photosyntheseaktivität überprüft (sofort, nach 2 und 8 Wochen), sowie optisch kontrolliert. In jedem Ansatz wurden drei Auswertungsfelder definiert und für einen optimierten Vergleich photographisch dokumentiert (Binokular, Wild; AxioCam A1, Zeiss).

1.7.2 Anatomie und Ultrastruktur

Lichtmikroskopie / Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Für die vergleichende Studie zur Anatomie der astrobiologisch relevanten Flechten und für die Untersuchung auf anatomische Schäden der auf der ISS exponierten Proben (PUBL. 1, 3) dienten mikroskopische Präparate, sowie Gefriermikrotom-Schnitte von 15-25 µm, die zur Kontraststeigerung mit Lactophenol-Baumwollblau gefärbt wurden. Photobionten aus den Kulturassays wurden nativ mikroskopiert. Die ultrastrukturelle Analyse (Raster-Elektronen-Mikroskopie) mit vorheriger Kritischer-Punkt-Trocknung (CPD 020, Balzers Union) der Flechtenthalli ergänzte die Analyse. Die unterschiedliche Stratifikation der Flechten, sowie die Anordnung der Photobionten innerhalb der verschiedenen Flechtenthalli wurden quantitativ erfasst. Der Vergleich der Anatomie von fünf verschiedenen Flechtenarten mit hoher Resistenz gegenüber extremen Umwelteinflüssen ermöglichte es, die protektive Wirkung verschiedener anatomischer Anpassungen besser einzuordnen (PUBL. 1).

Die vergleichende anatomische Analyse diente somit als Basis für die Analyse der auf der ISS exponierten Proben. Hier wurde zum Vergleich der Cortex-Oberfläche eine Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM) von *Xanthoria elegans* ohne Kritischer-Punkt-Trocknung ausgeführt, da während der Präparation das Parietin vom Lösungsmittel Aceton gelöst würde. Eine zweite Präparation zur Darstellung der Strukturen im Flechtenthallus schloss eine Kritischer-Punkt-Trocknung ein. Die REM-Analyse von Flechten und ihren Symbionten stellt ein in der Lichenologie etabliertes Verfahren dar (Hale 1976, Schuster et al. 1985, Honegger 1986, Brown et al. 1987), das bereits für weltraum-exponierte Flechten Anwendung fand (Sancho et al. 2007, Raggio et al. 2011). Intakte Thalli und Mikrotomschnitte wurden nach der Kritischer-Punkt-Trocknung auf speziellen Probenhaltern fixiert, mit Gold gesputtert (ca. 200 Å, 180 s) und mittels Raster-Elektronen-Mikroskop (LEO1430VP, LEO-Electron Microscopy Ltd.) untersucht.

Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM)

Die ultrastrukturelle Analyse von Flechten bzw. ihren Symbionten nach einer Exposition im Vakuum oder unter Mars-analogen Bedingungen wurde in diesem Projekt erstmalig ausgeführt (PUBL. 3). Proben von *Xanthoria elegans* aus allen Expositionsbedingungen des LIFE Experimentes auf der ISS und der MGR sowie Kontrollen aus tiefgefrorener und trockener Lagerung über den Experimentzeitraum wurden fixiert, kontrastiert, entwässert und nach der Kritischer-Punkt-Trocknung in ein Epoxid-Kunstharzmedium eingebettet. Von ultradünnen Schnitten (100 nm) der Proben wurden im Transmissions-Elektronen-Mikroskop (Zeiss E902) Aufnahmen dokumentiert. Für die Analyse wurden die ultrastrukturellen anatomischen Merkmale der exponierten Flechtenproben mit denen der bei -20°C tiefgefrorenen und der über 5 Jahre trocken gelagerten Kontrollgruppen verglichen (PUBL. 3). Die trocken bei Raumtemperatur gelagerte Probe diente als Referenz für die Effekte langer Austrocknung (Honeg-

ger 2003). Vor dem Hintergrund der Ergebnisse aus den Vitalitätsanalysen lag der Fokus dabei auf den Photobionten. Sie wurden als der gegenüber abiotischen Einflüssen empfindlichere Symbiont charakterisiert (de Vera & Ott 2010). Zu den qualitativ erfassten ultrastrukturellen Markern zählten Veränderungen an den für die Photosynthese relevanten Strukturen, wie die Auflösung von Thylakoidmembranen und Grana, die Veränderung des Pyrenoides, sowie die Präsenz und Lokalisation von Pyrenoglobuli. Quantitativ erfasst und ausgewertet (PUBL. 3) wurde die Zahl der Zusammenbrüche des Protoplasten sowie der partielle oder vollständige Kollaps von Zellen einschließlich Zellwand.

Austrocknung und Absorptionsvermögen

Zu den Untersuchungen der Anatomie im weiteren Sinne gehört auch die Verdichtung des UV-Strahlung und Licht absorbierenden Pigmentes Parietin während der Austrocknung des Thallus. Somit werden im trockenen bzw. anhydrobiotischen Zustand alle Zellen und insbesondere die empfindlichen Photobionten verstärkt vor Einstrahlung geschützt. Das Schrumpfen des Thallus während der Trocknung wurde fortlaufend photographisch dokumentiert und zweidimensional vermessen (vgl. 2.3.5).

Absorption durch das Anthrachinon Parietin: Licht, UV- und Röntgenstrahlung

Die für Licht und UV belegten Absorptionseigenschaften dieses Stoffes wurden mit aus *Xanthoria elegans* extrahiertem Parietin im UV/VIS-Spektrometer (Eppendorf) überprüft, wobei sich die Absorptionspeaks um 230, 260 und 430 nm bestätigten (Abb. A3, Meeßen et al. 2013b). Die protektive Wirkung bezieht sich allerdings nicht auf ionisierende Strahlung. Die sehr geringe Absorption von Röntgenstrahlung durch Parietin wurde experimentell verifiziert. Röntgenaufnahmen mit 40 keV Beschleunigungsspannung (2 mAs; Philips Diagnost) von trockenen Parietin-Auflagerungen (0,1 bis 0,4 mm) auf Deckgläschen (18x18 mm, 0,13-0,17 mm Höhe) demonstrierten die fehlende Absorption bereits bei dieser geringen Grenzenergie der angewandten Röntgenstrahlung.

1.7.3 Ionisierende Strahlung: Simulation von kosmischer Strahlung

Die unterschiedlichen Komponenten von galaktisch-kosmischer Strahlung und solarer kosmischer Strahlung wurden im zweiteiligen STARLIFE-Experiment simuliert, um die Resistenz von *Xanthoria elegans* (PUBL. 4) und den aus *Circinaria gyrosa* isolierten Photobionten (PUBL. 5) gegenüber ionisierenden Strahlen experimentell zu analysieren. Da auch diese Experimente in Anhydrobiose durchgeführt wurden, wurden sie ergänzt durch eine Versuchsreihe mit hydrierten und somit aktiven Proben von *X. elegans*.

Für beide Teile des STARLIFE-Experimentes wurden die Proben von *Xanthoria elegans* und die aus *Circinaria gyrosa* isolierten Photobionten (PB) im Exsikkator getrocknet und in geschlossenen 0,2 ml Mikroreaktionsgefäßen aus Polypropylen transportiert und bestrahlt, um

die durch die Trocknung induzierte Anhydrobiose möglichst über das ganze Experiment zu erhalten. Ergänzend zu den Hochdosis-Bestrahlungsexperimenten mit anhydrobiotischen Flechten und PB wurde ein Röntgenbestrahlungsversuch bis 100 Gy mit *X. elegans* im hydrierten, aktivierten Zustand durchgeführt. Dieser umfasste ein Probenet mit *X. elegans* Thalli auf ihrem natürlichen Schiefersubstrat (ALOS: *activated lichens on substrate*) und ein zweites aus präparierten Thalli (AL: *activated lichens*). Die Bestrahlungsparameter aller Experimente sind in Tabelle 1.7.3 zusammengefasst (siehe auch PUBL. 4, 5). Der Qualitätsfaktor findet Anwendung bei der Umrechnung einer Dosis in die Äquivalenzdosis, welche das spezielle Potential einer Strahlenqualität zur Energieübertragung an die bestrahlte Materie berücksichtigt. Der Faktor wird von der Internationalen Strahlenschutzkommission (ICRP) festgelegt.

Tabelle 1.7.3: Simulierte Weltraumstrahlung in den STARLIFE Experimenten

Qualität	Linearer Energie-transfer (LET)	(Beschleunigungs-) Energie	Applizierte Dosis	Qualitätsfaktor*
Eisenionen (STARLIFE I)	200 keV/μm	500 MeV/n	50-2000 Gy	20
Heliumionen (STARLIFE I)	2.2 keV/μm	150 MeV/n	50-1000 Gy	1
Röntgenstrahlen (STARLIFE I)	1-2 keV/μm	200 keV/15 mA	50-2000 Gy	1
Gammastrahlen (STARLIFE II)	0.3 keV/μm	1.17/1.33 MeV	6-113 kGy	1
Röntgenstrahlen (AL/ALOS)	1-2 keV/μm	175 keV/15 mA	1-100 Gy	1

eV: Elektronenvolt ($1 \text{ eV} = 1,6022 \times 10^{-19} \text{ J}$); eV/n: Elektronenvolt pro Teilchen

* nach ICRP (1991) ICRP 60. Ann. ICRP 21 (1-3); ICRP 2007 Ann. ICRP 37(2-4).

Nach der Röntgenbestrahlung, sowie den Bestrahlungen mit beschleunigten Eisen- und Heliumionen (STARLIFE I) wurde die metabolische Aktivität von *X. elegans* mittels FUN-1® (1.7.1) quantifiziert und die photosynthetische Aktivität per Chlorophyll *a* Fluoreszenz-Messung analysiert (PUBL. 4, 5). Die Auswirkungen der Hochdosis-γ-Strahlung auf *X. elegans* und die PB von *C. gyrosa* wurde mittels Chlorophyll *a* Fluoreszenz-Messung untersucht, wobei die verlängerte Experimentdauer (4 bzw. 14 Tage) auch mit zeitlicher Verzögerung auftretende Effekte auf die PB erfassen konnte. Für den *C. gyrosa*-PB erfolgte zusätzlich ein LIVE/DEAD *staining* (PUBL. 4, 5). Die Resistenz der im aktiven Zustand röntgenbestrahlten Probenets von *X. elegans* wurde ebenfalls per Chlorophyll *a* Fluoreszenz-Messung analysiert. Zusätzliche Kulturassays der PB von *C. gyrosa* nach γ-Bestrahlung (PUBL. 5), sowie von *X. elegans* nach Röntgenbestrahlung ergänzten die Analyse der Vitalität (Abb. A5).

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Exposition auf der ISS: Vitalität von *Xanthoria elegans*

2.1.1 Metabolische Aktivität (LIVE/DEAD staining)

Die Analyse der metabolischen Aktivität erfolgte mittels einer vorab validierten Fluoreszenz-basierten diskriminierenden Färbung (vgl. 1.7.1). Alle Proben lieferten reproduzierbare Ergebnisse bezüglich Farbstoffaufnahme, metabolischer Umsetzung und Qualität des Fluoreszenzsignals. Nach der Exposition auf der ISS sowie in der MGR wurden Proben aus den jeweils sechs experimentellen Bedingungen untersucht (volle Einstrahlung, 0,1% Einstrahlung und ohne direkte Einstrahlung unter Vakuum- als auch oder Mars-analogen Bedingungen, detaillierte Ergebnisse in Tab. 2 der PUBLIKATION 2). Beide Symbionten von *Xanthoria elegans* demonstrierten eine bemerkenswert hohe metabolische Aktivität nach allen experimentellen Bedingungen der Weltraumexposition mit 61-83% für die Photobionten (PB) und 76-89% für den Mycobionten (MB). Insgesamt waren die PB deutlicher in ihrer Aktivität beeinträchtigt als der MB. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten zudem metabolisch aktive PB, die deformiert oder kollabiert erschienen. Sie können somit als beeinträchtigt bzw. geschädigt interpretiert werden (Abb. A1.1). Die auf der ISS unter Mars-analogen Bedingungen exponierten MB zeigten eine um 5% höhere metabolische Aktivität als die unter Vakuum exponierten MB. Diese höhere metabolische Aktivität nach Mars-analoger Exposition fand sich nicht bei den Proben der MGR. Auch der Vergleich der metabolischen Aktivität des MB bei den ohne direkte Einstrahlung exponierten Proben zeigte keinen Einfluss von Mars-analogen Bedingungen verglichen zu Vakuumbedingungen (Fig. 5, PUBL. 2). Die UV-Einstrahlung während des LIFE-Experimentes akkumulierte sich bei voller Exposition (T = 100%) auf ca. 300 MJm⁻² und bei Exposition unter Filterung (T = 0,1%) auf ca. 0,3 MJm⁻² (vgl. RedShift Report 2011; Tab. 1, PUBL. 2). Diese Analyse zeigte jedoch keine Korrelation zwischen der metabolischen Aktivität und der unterschiedlich intensiven Einstrahlung oder Exposition ohne Einstrahlung während des LIFE Experimentes (Fig. 4, PUBL. 2).

2.1.2 Photosynthetisches Potential (Chlorophyll a Fluoreszenz-Messung)

Als Indikator für die Vitalität des Photobionten (PB) wurde die Aktivität des Photosystems II gemessen. Die photosynthetische Aktivität von Photobionten in kurzzeitig trockenen Flechten lässt sich durch Befeuchtung innerhalb von 1-15 min. reaktivieren (vgl. 1.2.2). Für die Flechtenthalli aus dem LIFE-Experiment, die über 18 Monate eine extreme Austrocknung erfahren hatten, war diese erste Reaktivierung nicht erfolgreich (Fig. 6, PUBL. 2). Während einer mehr-tägigen Reaktivierung mit einer zusätzlichen Austrocknungsphase, die den Befeuchtungs-/Trockenheitswechsel im natürlichen Habitat simulierte, konnten jedoch alle eingesetzten ISS-Proben prinzipiell ihre photosynthetische Aktivität regenerieren (Fig. 7c, PUBL. 2). Das auf insgesamt sechs Tage verlängerte Protokoll wurde als Standard für astrobiologische Proben etabliert.

Ein Vergleich von Reaktivierungszeit und Regeneration der Fv/Fm-Werte (die als Maß der photosynthetischen Aktivität dienen; vgl. Fig. 7, PUBL. 2) zwischen den exponierten Proben zeigte eine deutlich höhere Aktivität der unter Mars-analogen Bedingungen exponierten PB. Bei diesen PB war eine reguläre photosynthetische Aktivität nach 48 bis 72 Stunden erreicht (Fv/Fm-Wert bei ca. 0,6; Fig. 7a). Die Regenerationszeit von der Anhydrobiose bis zu den maximal erreichten Fv/Fm-Werten war gegenüber der Kontrollgruppe um 24 h verlängert. Die Regenerationszeit der unter Vakuum exponierten Proben hingegen war mit 6 Tagen deutlich verlängert (Fig. 7c). Die unter Vakuum bei voller Einstrahlung exponierten Proben zeigten zudem deutlich reduzierte Fv/Fm-Werte (Fig. 7c, ISS 116). Von den Proben der MGR konnten lediglich zwei Proben ihre photosynthetische Aktivität regenerieren (Fig. 7b, d). Die Ergebnisse der Chlorophyll *a* Fluoreszenz-Messung korrelieren für drei der vier Experimentbedingungen zu den Ergebnissen der metabolischen Aktivität der PB (Fig. 9, PUBL. 2). Allerdings zeigten die unter Vakuum bei voller Einstrahlung exponierten PB eine geringe photosynthetische Aktivität, aber eine hohe metabolische Aktivität. Dies könnte durch die Wirkung der UV-Strahlung auf die Komponenten der Photosynthese erklärt werden (vgl. 1.3.3). Lütz et al. (1997) beschreiben strukturelle Defekte an Chloroplasten der grünen Alge *Micrasterias denticulata* nach UV_{<280nm}-Bestrahlung und zeigen, dass der Photosyntheseapparat durch UV-Strahlung beeinträchtigt wird. Ebenso können einzelne Komponenten z.B. das D1-Protein durch UV-Strahlung beschädigt werden (Holzinger & Lütz 2006). Eine Beeinträchtigung speziell der Photosynthese durch die UV-C_{110-200nm}-Strahlung, welche nur auf die Vakuum-Proben einwirkte, wäre eine mögliche Interpretation. Diese Wellenlängen sollten aber, aufgrund ihrer sehr geringen Eindringtiefe (Jasinghe & Perera 2005), bereits im Cortex absorbiert werden (vgl. 2.3.5). Zu den Effekten der extremen Austrocknung im Vakuum lagen für Flechten bisher ausschließlich Ergebnisse von Simulationsexperimenten ($\geq 10^{-5}$ Pa) und den BIOPAN-Experimenten ($\leq 10^{-5}$ Pa) vor. Diese zeigten, dass die relativ kurzen Zeiträume unter Vakuum in der Erdumlaufbahn (10-16 Tage; Sancho et al. 2007, Raggio et al. 2011) oder einer Simulation (14 Tage, 10^{-5} Pa; Abb. A1.3) von beiden Flechtensymbionten toleriert wurden.

2.1.3 Wachstum und Reproduktion des Photobionten (Kultivierung)

Von den als Algencluster isolierten und inokulierten Photobionten (PB), entwickelten sich die aus Mars-analog exponierten Flechten in großer Häufigkeit (77-100%) zu Algenkolonien und formten größere Kolonien, verglichen zu den Algen, die aus unter Vakuum exponierten Flechten isoliert wurden. Diese wuchsen langsamer und nur 13-50% der isolierten PB-Cluster wuchsen zu Kolonien heran (Tab. 1, PUBL. 3). Eine Beeinträchtigung der Wachstums- und Teilungsfähigkeit zeigte sich insbesondere bei den Algen, die unter Vakuum in Kombination mit voller Einstrahlung exponiert worden sind. Die drei unterschiedlichen Licht- und UV-Intensitäten des LIFE-Experimentes zeigten keinen Effekt auf das Wachstum der Algen, die aus unter Mars-analogen Bedingungen exponierten Flechten isoliert wurden. Die Beobachtung, dass nur in Kombination mit Vakuum die Licht-/UV-Intensität einen erkennbaren Einfluss auf die Vitalität der exponierten PB hatte, stimmt mit den Ergebnissen der Chlorophyll *a*

Fluoreszenz überein (vgl. 2.1.2). Das Kulturexperiment zeigte auch, dass sowohl die Chlorophyll *a* Fluoreszenz als auch das LIFE/DEAD *staining* quantitative Daten über Photosynthesaktivität und metabolische Aktivität bereitstellen. Beide Methoden können somit als Indikatoren für die PB-Vitalität gelten, was aber nicht gleichbedeutend mit reproduktionsfähigen Zellen sein muss.

Keine der experimentellen Bedingungen des LIFE-Experimentes konnte die Proliferation der PB komplett inaktivieren. Auch nach 1,5 Jahren unter Weltraum-Vakuum und insgesamt 4,9 GJm⁻² (Tab. 1, PUBL. 2) Einstrahlung wuchsen Algenkolonien heran und blieben über die 200 Tage des Kulturexperimentes vital (PUBL. 3). Dies konnte für andere umweltresistente Organismen im LIFE-Experiment nicht gezeigt werden (Horneck et al. 2012, Vaishampayan et al. 2012). Für die ebenfalls im LIFE Experiment exponierten antarktischen crypto-endolithischen Mikroorganismen (z.B. *Cryomyces* sp) ließ sich zwar mittels qPCR-Assay unbeschädigte DNA nachweisen (Onofri et al. 2012), aber nur ein geringes Kulturwachstum ausschließlich für die Proben nachweisen, die ohne Einstrahlung unter Vakuum bzw. mit T=0,1% unter Mars-analogen Bedingungen exponiert worden sind (Scalzi et al. 2012). Verglichen zu diesen crypto-endolithischen Organismen, ist *X. elegans* als epilithischer Organismus gut adaptiert an sonnenexponierte Standorte (Nybakken et al. 2004) und verfügt mit dem parietinhaltigen Cortex über einen vom Substrat unabhängigen UV-Schutz (Solhaug & Gauslaa 1996, Nybakken et al. 2004).

2.1.4 Mission Ground Reference (MGR)

Verglichen mit den auf der ISS exponierten Proben zeigten die Proben der MGR insgesamt eine signifikant geringere metabolische Aktivität beider Symbionten (PB: 43-67%, MB: 60-87%; PUBL. 2) insbesondere bei den Mars-analogen MGR-Proben (Tab. 2, PUBL. 2) sowie eine stark reduzierte Photosyntheseaktivität. Eine spezielle Korrelation zu einem oder mehreren der experimentellen Bedingungen (atmosphärischer Druck oder UV-Strahlung) konnte allerdings nicht hergestellt werden. Da die Temperaturzyklen sehr genau und die ionisierende Strahlung gar nicht simuliert wurden, scheiden diese Parameter als Ursache aus. Die während des LIFE-Experimentes für die MGR berechnete und applizierte UV-Strahlung war zwar für jede Position 1,5 bis 3fach höher (Tab. 1, PUBL. 2, letzte Zeile) als die nach der RedShift Kalkulation für die ISS Exposition ermittelte UV-Einstrahlung (Tab. 1, PUBL. 2), dennoch erscheint dies als Erklärung für die Reduktion der metabolischen Aktivität unzureichend. Vergleicht man die Raten der metabolischen Aktivität der ISS Proben miteinander, so zeigten sich z.B. nach Mars-analoger Exposition für die PB Aktivitätsraten von 68% nach Exposition ohne Einstrahlung, 79% nach 0,26 MJm⁻² UV-Einstrahlung sowie 73% nach 314 MJm⁻² (Tab. 2, PUBL. 2). Weder die Exposition ohne Strahlung, noch die mehr als 1000fach höhere Exposition zeigten hier einen ausgeprägten Effekt auf die Raten der metabolischen Aktivität der PB. Aber bei Mars-analog exponierten Proben mit auf 0,1% gefilterter Strahlung erhielten die ISS-Proben 0,26 MJm⁻² und die MGR-Proben 0,63 MJm⁻², dennoch lag die metabolische Ak-

tivität der PB in den Proben bei 79% (ISS) gegenüber 43% (MGR). Eventuell gab es weitere, die Vitalität beeinträchtigende Einflüsse in der Probenbehandlung in der MGR. Eine in der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie beobachtete, starke Bakterienbesiedlung der MGR Proben könnte sich ebenso negativ auf die Vitalität ausgewirkt haben.

2.2 Exposition auf der ISS: Anatomie und Ultrastruktur

2.2.1 Lichtmikroskopie und Raster-Elektronen-Mikroskopie

Lichtmikroskopische Bilder von Photobionten aus dem Kulturversuch (vgl. 2.1.3, Abb. A2.1), Mikrotom-Schnitte der Flechtenthalli nach der Exposition auf der ISS (Abb. 2.3.5), sowie die Raster-Elektronen-Mikrographien von nativen oder Kritischer-Punkt-getrockneten Thalli wurden mit Kontrollgruppenproben verglichen. In beiden Analysen zeigten sich zwischen den exponierten Proben und den Kontrollen keine durch die Exposition auf der ISS hervorgerufenen anatomischen und strukturellen Unterschiede.

2.2.2 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

Aufgrund der teilweise reduzierten photosynthetischen Aktivität (vgl. 2.1.2) und den Ergebnissen der Photobionten-Kultur (vgl. 2.1.3), lag der Schwerpunkt der Analyse der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) auf möglichen ultrastrukturellen Schäden des Photobionten (PB). Bei der Analyse der TE-Mikrographien wurden ultrastrukturelle Veränderungen an den PB und deren Chloroplasten erkennbar (vgl. 1.7.2, TEM; Fig. 3, 4, PUBL. 3). Diese ähneln im Besonderen ultrastrukturellen Schäden, die auch unter irdischen Bedingungen durch Austrocknung induziert werden (Honegger et al. 1996; Honegger 2003; de los Ríos et al. 2004, 2010, Brown et al. 1987). Dazu gehören die Degradation oder der Abbau von Thylakoidstrukturen, welche häufiger in der bei Raumtemperatur trocken gelagerten Kontrollgruppe und bei im Vakuum ausgetrockneten Photobionten auftrat. Auch zeigten auf der ISS exponierte PB häufiger ein zentrales, vergrößertes Areal ohne Chloroplasten-Membranen im Bereich des Pyrenoides als die PB der tiefgefrorenen Kontrolle. Als nicht regenerierbarer struktureller Schaden und eindeutiger Marker wurden die in Folge einer geschädigten Membrantegrität kollabierten Protoplasten mit bzw. ohne Deformation der Zellwand quantifiziert (Tab. 2, PUBL. 3). Diese Marker fanden sich nach Mars-analoger Exposition deutlich seltener (48-57% bzw. 16-35%), als bei unter Vakuum exponierten Photobionten (61-97% bzw. 25-85%). Die Mars-analoge Exposition verursachte weniger Defekte als die trockene Lagerung, aber eine erhöhte Anzahl gegenüber der tiefgefrorenen Lagerung. Die höchste Anzahl kollabierter Protoplasten sowie deformierter Zellwände wurde nach 18 Monaten Vakuumexposition beobachtet (Tab. 2, PUBL. 3). Analog zu den Vitalitätsanalysen zeigte sich auch hier keine Korrelation zur Einstrahlung, allerdings finden sich bei den unter Vakuum exponierten Proben weniger fatale Strukturschäden bei den dunkel ($T = 0$) exponierten Proben (Tab. 2, PUBL. 3),

wodurch auch die Beobachtungen aus der Chlorophyll *a* Fluoreszenzanalyse und (vgl. 2.1.2) dem Kulturversuch (vgl. 2.1.3) unterstützt werden, dass hohe Einstrahlung in Kombination mit extremer Austrocknung die Photobionten besonders schädigen konnte. Die Analyse der MGR-Proben unterstützte diese Ergebnisse: Proben aus Mars-analogen Simulationsbedingungen wiesen 40-42% kollabierte Protoplasten auf, für die im Vakuum exponierten MGR-Proben ergaben sich jedoch 52-86%. Insgesamt wiesen die MGR-Proben deutlich mehr ultrastrukturelle Schäden auf als die ISS-Proben. Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass trocken gelagerte Flechtenalgen nach sechs Jahren ihre Vitalität verlieren können und die Häufigkeit permanenter ultrastruktureller Schäden mit der Zeit zunimmt, während tiefgefrorene PB auch nach über neun Jahren vital und kultivierbar blieben (Honegger et al. 1996, Honegger 2003). Auch die Anhydrobiose des PB unter den Bedingungen in ihren terrestrischen Habitaten kann zu sichtbaren Veränderungen der zellulären Ultrastruktur des Photobionten führen (Honegger et al. 1996; Honegger 2003; de los Ríos et al. 2004, 2010). Dies schließt temporäre Kollapse des Protoplasten bei der Dehydratation ein (Brown et al. 1987). Allerdings regenerieren die PB schnell bei Befeuchtung und erlangen ihre runde Form zurück (Honegger et al. 1996, Honegger 2003). Solche temporären ultrastrukturellen Veränderungen werden bei der verwendeten Präparationstechnik regeneriert und zeigen sich daher nicht oder nur sehr eingeschränkt in den TE-Mikrographien (Honegger et al. 1996, Honegger 2003) Daher müssen die beobachteten, also nicht regenerierbaren, strukturellen Zellschäden als dauerhafte Schädigung den Expositionsparametern während des LIFE Experimentes zugeordnet werden, am wahrscheinlichsten der starken Austrocknung unter beiden Expositionsbedingungen.

Auch die Hyphen des Mycobionten wiesen kollabierte Protoplasten auf, allerdings fast keine Deformation der Zellwände. Eine Ursache für diese Stabilität könnte in der sehr kompakten Anordnung der Hyphenzellen bzw. ihrer Einbettung in Gallerte zu finden sein, wodurch mechanische Stabilität vermittelt wird. Honegger (1995) beschreibt intrazelluläre Lufträume der Hyphenzellen, die sich ausdehnen, um während der Dehydration von Ascomyceten den Kontakt zwischen Protoplast und der rigiden, sich nicht verformenden Zellwand zu gewährleisten. Die Haustorien des MB, die den symbiotischen Kontakt zwischen Hyphen und PB darstellen, blieben strukturell erhalten (Abb. A2.2).

2.3 Exposition auf der ISS: Resistenzen gegen extraterrestrische Stressoren

2.3.1 Ionisierende Strahlung

Während der 18 Monate des EXPOSE-E/LIFE Experimentes wurden außerhalb der Internationalen Raumstation von den *Xanthoria elegans*-Proben 216 ± 15 mGy ionisierende Strahlung akkumuliert (Berger et al. 2012; vgl. 1.4.3). Diese Dosis von ca. 150 mGy/a ist deutlich geringer als die in der Literatur beschriebenen Dosiswerte für die Strahlenresistenz von Asco-

myceten und Flechten bzw. Flechtensymbionten (Shields & Rickard 1961, Woodwell et al. 1967, Gannutz 1972, Zhdanova et al. 2000). Da in Bestrahlungsexperimenten 50% der Flechtenalgen nach 90-480 Gy (10-54 kR) vital blieben und sich strahlensensitiver zeigten als Pilzhyphen (Gannutz 1972), ist die ionisierende Strahlung während des LIFE Experimentes eine unwahrscheinliche Ursache für Vitalitätseinbußen der Flechtensymbionten.

2.3.2 Anhydrobiose und extraterrestrische Stressoren

Die Anhydrobiose (vgl. 1.2.2) hat sich als relevanter Faktor für das Überleben unter extremen Umweltbedingungen erwiesen (Crowe et al. 1992, Kranner et al. 2008) und ist von entscheidender Bedeutung für die Resistenz gegenüber extraterrestrischen Bedingungen, nicht nur für Flechten (Kranner et al. 2008), sondern auch für Tradigraden (Rebecchi et al. 2007) oder Bakterien (Horneck 2003, Bauermeister et al. 2011). Der durch die Anhydrobiose gewährte Schutz umfasst die Reduzierung der ROS-Bildung und die Produktion von ROS abfangenden Molekülen, die das System schützende Unterbrechung der Photosynthese und die Stabilisierung von Membranen durch Polyole. Anhydrobiose gewährt hohe Frost- und Austrocknungstoleranz (vgl. 1.2.3) sowie sehr schnelle Regeneration bei Rehydrierung (vgl. 1.2.2; Kranner et al. 2008).

Die Temperaturen während der ISS-Exposition von -21,3 bis 43°C mit der im Vergleich zu terrestrischen Habitaten nicht ungewöhnlichen Zahl von 100 Tau-/Gefrierzyklen (Rabbow et al. 2012) stellten insbesondere im anhydrobiotischen Zustand keinen Stressor für die Flechtenproben von *X. elegans* dar, die an Frost und Temperaturschwankungen in alpinen oder antarktischen Habitaten gut adaptiert sind (Kappen 1993, Dyer & Crittenden 2008). Verlängerte Regenerationszeiten nach wochenlanger Trockenheit oder Tieffrieren wurden bereits beschrieben (Kranner et al. 2003, Gasulla et al. 2009, Backhaus et al. 2015) und wurden in dieser Studie bei den tiefgefrorenen Kontrollgruppen des LIFE-Experimentes und den ebenfalls anhydrobiotischen Proben in der STARLIFE-Kampagne beobachtet (Fig. 1, PUBL. 4). Die verlängerte Zeit bis zur Regeneration der maximalen Photosynthesaktivität wird durch Reparatur- und Regenerationsprozesse verursacht (Kranner et al. 2008, Gasulla et al. 2009), sowie einer z.T. reversiblen Degeneration des Chlorophylls bei wochenlanger Trockenheit (Honegger 2003, Kranner et al. 2003).

Die Grenzen der durch Anhydrobiose vermittelten Resistenz zeigten sich unter der stark austrocknenden Wirkung des Vakuums im LEO. Schäden können während der Anhydrobiose nicht repariert werden, sondern akkumulieren sich stattdessen. So können nicht reparierte Schäden, z.B. an der DNA, die Vitalität beeinträchtigen (vgl. 1.3.3 und 1.5.2). Ein Zusammenhang von Vakuumexposition und gehäuften DNA-Doppelstrangbrüchen wurde für *Bacillus subtilis* Sporen gezeigt (Dose & Gill 1995). Zudem erscheinen die in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Schäden (irreversibler Kollaps) der Photobiont-Protoplasten und der Zellwand geeignet, die Reduktion der photosynthetischen Aktivität und die verlangsamte Proliferation der Photobionten nach der Exposition im Vakuum zu erklären. Die Ergebnisse dieser Studie

weisen auf die lange und extreme Austrocknung im Vakuum als den entscheidenden Stressor während der Exposition auf der ISS hin, insbesondere für die Photobionten-Zellen. Neben den hier beschriebenen Veränderungen bzw. Schäden kann die Austrocknung im Vakuum sowie unter Marsatmosphäre zu einer Veränderung der Zellmembranen führen und Makromoleküle z.T. irreversible polymerisieren lassen (Maillard-Reaktionen), wodurch Membranpermeabilität, Energiegewinnung und Enzymaktivität funktional gestört werden (Cox 1993). Dies wird unterstützt durch den Vergleich der Zahl der kollabierten Protoplasten nach Vakuumexposition ISS (61-97%) zu der über 5 Jahre bei -20°C gelagerten Kontrolle (44%). Die starke Austrocknung im Vakuum gilt auch für andere biologische Proben als relevanter Stressor. An Sporen von *Bacillus* sp konnten bereits unter Mars-analogen atmosphärischen Druck der oberen Erdatmosphäre durch Austrocknung induzierte Schäden beobachtet werden (Horneck & Baumstark-Khan 2001, Horneck et al. 2010). Bei Sporen von *Bacillus subtilis* zeigten sich nach Vakuumexposition 10-fach erhöhte Mutationsraten (Horneck et al. 1984), bei Cyanobakterien reduzierten sich die Raten der Stickstoff- und Kohlenstoff-Fixierung (Mancinelli et al. 1998), bei Konidien des Pilzes *Aspergillus ochraceus* wurden DNA-Strangbrüche und zahlreiche DNA-Protein-Verbindungen detektiert (Bieger-Dose et al. 1992). Entsprechend finden sich auch bei den unter Mars-analogen Druck exponierten Proben erhöhte ultrastrukturelle Schäden. Bei der Exposition unter Vakuum mit Licht/UV-Einstrahlung hingegen findet sich ein höherer Anteil deformierter Zellwände, auch anteilig bezogen auf die PB-Zellen mit kollabiertem Protoplasten.

In der Kultur der Photobionten zeigt sich, dass die kombinierte Einwirkung von Vakuum (10^{-4} bis 10^{-7} Pa) und einer Einstrahlung von ca. $4,9 \text{ GJm}^{-2}$ die Vitalität und Teilungsfähigkeit der exponierten PB erkennbar reduziert hat, sowohl im Vergleich zur Mars-analogen Exposition als auch zu den Kontrollgruppen. Dort entwickelten sich nur 13% der inokulierten PB-Cluster zu Kolonien. Dies kann auf fatale Beschädigungen der DNA oder des Replikationsapparates hinweisen, die durch eine zu hohe Anzahl von in der Anhydrobiose akkumulierten Schäden verursacht worden sein könnten. Neben der direkten oder indirekten Wirkung von UV (vgl. 1.3.3) als destruktives Agens, wurden auch unter Vakuumeinwirkung DNA-Strangbrüche und eine mutagene Wirkung an *Bacillus* sp Sporen nachgewiesen (Bieger-Dose et al. 1992). Bereits eine Mars-analoge Atmosphäre, experimentell simuliert durch die oberste Schicht der Erdatmosphäre, kombiniert mit UV-Strahlung erzeugte dabei einen synergistischen Effekt bezogen auf die DNA-Schäden (Horneck & Baumstark-Khan 2001). Eine kombinierte Wirkung von langer Zeit unter Vakuum und intensiver UV-Einstrahlung kann zu einer Anhäufung von Schäden an Enzymen, DNA und Membranen (Nussinov & Lysenko 1983, Sinha & Häder 2002, Horneck et al. 2002, 2010, Daly 2012) geführt haben, die keine Regeneration mehr ermöglichten.

2.3.3 Sekundäre Metaboliten

Die hohe UV-Resistenz von *Xanthoria elegans* unterscheidet die Flechte von anderen exponierten Organismen, bei denen die Intensität der UV-Einstrahlung einen entscheidenden Faktor für die Vitalität darstellte. Die sehr umweltresistenten Sporen von *Bacillus subtilis* sind durch $UV_{>190\text{ nm}}$ mit 1 kJm^{-2} fast vollständig inaktiviert worden (Horneck 1993) und die im Experiment PROTECT auf der EXPOSE-E Plattform exponierten Sporen von *Bacillus pumilis* überstanden die volle UV-Exposition nicht (Vaishampayan et al. 2012).

Die Resistenz intakter Thalli von *X. elegans* gegenüber UV wurde bereits in Bestrahlungsexperimenten beobachtet (vgl. 1.3.3) und bestätigte sich auch bei den EVT des LIFE-Experimentes ($UV_{200-400\text{ nm}} \leq 150\text{ MJm}^{-2}$). Sie kann für beide Symbionten u. a. auf die UV-absorbierenden Eigenschaften des Cortexpigmentes Parietin zurückgeführt werden (vgl. 1.2.1, Abb. A3, Nybakken et al. 2004). Parietin findet sich auch auf der Oberfläche von einzelnen MB-Hyphen, wodurch auch die isoliert gewachsenen Mycelien einen begrenzten UV-Schutz erfahren. Experimente mit UV-Bestrahlung nach Präparation der Cortices führten zu einer Beeinträchtigung der Vitalität insbesondere der Photobionten (de Vera 2003, de Vera & Ott 2010). Die Vermeidung intensiver Einstrahlung in lichtexponierten alpinen Habitats durch die protektive Wirkung des Parietins wurde für *X. elegans* bzw. *X. parietina* bereits beschrieben (Solhaug & Gauslaa 1996, Wynn-Williams et al. 2002, Nybakken et al. 2004) und für photosynthetisch aktive Strahlung (400-700 nm) quantifiziert (Solhaug et al. 2010, PUBL. 2). Die Menge des gebildeten Parietins wird durch UV-B Einstrahlung stimuliert (Solhaug et al. 2003, Gauslaa & McEvoy 2005). Eine 20-65 μm mächtige Parietin-haltige Schicht auf dem Cortex absorbiert insbesondere bei trockenen Thalli von *X. elegans* UV und Blaulicht effizient (Gauslaa & Solhaug 2004, Solhaug et al. 2010, Meeßen et al. 2013b). Die hohe protektive Wirkung bei einer Bestrahlung mit bis zu $4,9\text{ GJm}^{-2}$, einschließlich $14\text{ MJm}^{-2}\text{ UV}_{>110\text{ nm}}$ -Strahlung (ISS, Vakuum) bzw. $18\text{ MJm}^{-2}\text{ UV}_{>200\text{ nm}}$ -Strahlung (ISS, Mars-analog), wurde in dieser Studie erstmalig getestet. Dabei zeigte sich, dass Parietin auch in diesem Experiment nicht von der Einstrahlung degradiert wurde, womit sich seine Relevanz als möglicher *Bio-marker* bestätigte.

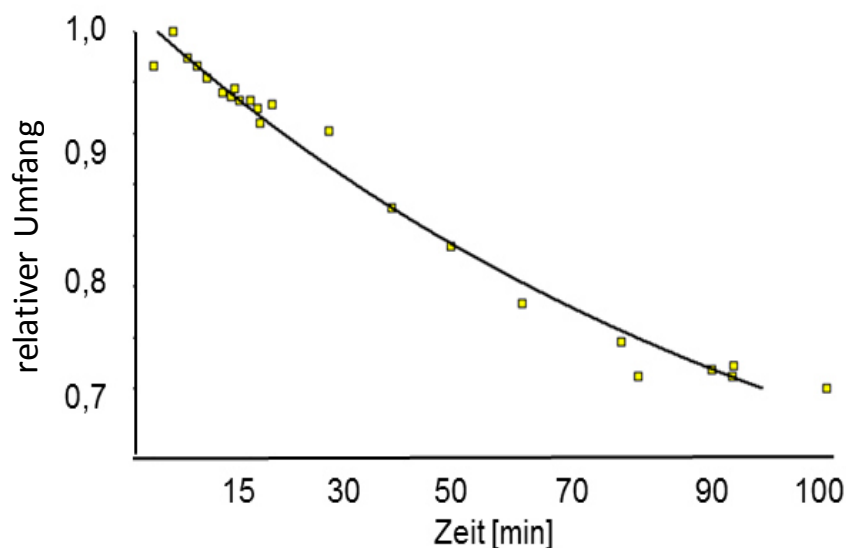
2.3.4 Verdichten der protektiven Cortexpigmente

Die sich verdichtende Inkrustierung mit Parietin (Solhaug et al. 2010) während der Austrocknung des Thallus verhindert effizient Lichtstress des Photobionten (Solhaug & Gauslaa 2004) und verringert erheblich eine Penetration energiereicher kurzwelliger UV-Strahlung (Buffoni Hall 2002, Abb. A3). Bei diesem Vorgang ergänzen sich die protektiven Wirkungen von Anhydrobiose und sekundären Inhaltsstoffen. Die Schrumpfung von Thallusloben mit einer Verdichtung der sekundären Inhaltsstoffe auf und im Cortex wird in PUBL. 1, Fig. 4 für *Buellia frigida* und in Abb. 2.3.5 für *X. elegans* dargestellt. Die Größenänderung während der unbeeinflussten Austrocknung von *X. elegans* unter Laborbedingungen wurde quantitativ erfasst, wobei sich eine stetige Verkürzung von Länge und Breite (je 12-20%) mit einer deutlichen

Verkleinerung der Oberfläche zeigte (Graph 2.3.5). Die Verdichtung des Parietins bzw. des Cortexes ist auch an der Maskierung der im hydrierten Zustand sichtbaren grünen Färbung (PB) optisch erkennbar.



Abb. 2.3.5: Thallus von *X. elegans*, Dehydration unter Laborbedingungen: Der Cortex wird im Verlauf der Dehydration dichter, wodurch die grüne Färbung durch das Chlorophyll nicht mehr wahrnehmbar ist. **A** hydrierter Thallus, photosynthetisch aktive PB. **B** nach ca. 30 min.: Thallus ist teilweise getrocknet. **C** trockener, geschrumpfter Thallus, Photosyntheseaktivität ruht, Parietin verdichtet.



Graph 2.3.5: Umfang von *X. elegans*-Loben bei Trocknung unter Laborbedingungen. Die relative Schrumpfung des Umfanges (t_0 = volle Hydratation = 1) einzelner Loben wurde mit einer Exponentialkurve der allgemeinen Form $N(t) = N(t_0) \cdot e^{-a \cdot t} + y$ modelliert.

2.3.5 Anatomie

Auch im hydrierten Thallus ist die Stratifikation der Flechte für den UV-Schutz relevant. UV-Strahlung besitzt eine Eindringtiefe von ca. 35-50 μm für UV-C (Jasinghe & Perera 2005) und von ca. 40 μm für UV-B_{280 nm} bei hydrierten Thalli (Buffoni Hall 2002). Der Cortex von *X. elegans* aus Epinekralschicht, Hyphen des Cortex und einer weiteren dichten plectenchymatischen Hyphenschicht oberhalb der Algenschicht ist meist ca. 50 μm hoch (Abb. 2.3.5; PUBL. 1). Dadurch können die PB auch im hydrierten Zustand weitgehend vor kurzwelliger UV-Strahlung geschützt werden. Die Beobachtung hoher metabolischer Aktivität von MB und PB

unterhalb kompakter anatomischer Strukturen wie z.B. einem Apothecium (Fig. 3, PUBL. 2), oder im Zentrum der für die Gattung *Trebouxia* typischen Algenclustern, bestätigte die schützende Wirkung der Stratifikation (Abb. A1). Eine UV-protective Wirkung der extrazellulären Gallerte, die von den Flechtensymbionten ausgeschieden wird, diese umhüllt und eine Matrix für den Stoffaustausch zwischen den Symbionten darstellt (Honegger 1992), wird für Flechten, aber auch für Algen und Bakterien in sogenannten Biofilmen diskutiert (Lütz et al. 1997, Belnap et al. 2001, de Vera et al. 2003, 2010, Flemming et al. 2007, Ortega-Retuerta et al. 2009, Baqué et al. 2013, PUBL. 1).

Die im Vergleich zum MB höhere Sensitivität des PB gegenüber abiotischen Umwelteinflüssen wurde bereits in Simulationsexperimenten mit UV-Strahlung (de Vera 2003, 2008, de Vera & Ott 2010; 1.3.3) und auch bei Austrocknungsexperimenten beobachtet (Honegger 2003). Die dennoch hohe UV- und Lichtresistenz der PB im intakten Thallus von *X. elegans* zeigt auf, dass die Symbiose hierbei einen relevanten Überlebensvorteil gewährt: Der Schutz des PB stellt die wichtigste Funktion der besonders ausgebildeten Cortices dar (Jahns 1988, Kappen 1988). Die photoautotrophen Algen werden innerhalb der stratifizierten Flechtenstruktur (Honegger 2009) und durch die sekundäre Inhaltsstoffe, die lichenisierte Mycobionten in erhöhter Quantität bilden können (Brunauer & Stocker-Wörgötter 2005) vor abiotischen Umwelteinflüssen geschützt, insbesondere vor Schäden am Photosyntheseapparat (vgl. 1.3.3) durch eine auf die Einstrahlung abgestimmte Morphologie des Cortexes (Büdel & Scheidegger 1996, Solhaug et al. 2003, Solhaug & Gauslaa 2004).

Bei Chlorophyll *a* Fluoreszenz-Messung nach dem LIFE Experiment konnten PB von *Xanthoria elegans* 45-75% des Ausgangswertes ihrer photosynthetischen Aktivität regenerieren (Onofri et al. 2012), übereinstimmend mit den in dieser Studie durchgeführten Messungen (PUBL. 2). PB der ebenfalls im LIFE Experiment exponierten Flechte *Rhizocarpon geographicum* regenerierten lediglich $2.5 \pm 1.4\%$ ihrer vor der Exposition gemessenen Fv/Fm-Werte (T=0, Vakuum exponierte Probe; Onofri et al. 2012). *Rhizocarpon geographicum* wird durch Rhizocarpsäure und Melanin vor Licht- und UV-Strahlung geschützt (Gauslaa & Solhaug 2001, Nybakken et al. 2004, Meeßen et al. 2013b), allerdings ist der protektive Cortex oberhalb der PB im Durchschnitt von geringerer Höhe (PUBL. 1). Obwohl die Licht und UV absorbierende Wirkung sekundärer Inhaltsstoffe effizienter ist, als ein verdickter Cortex (Dietz et al. 2000, Gauslaa & Solhaug 2004) zeigte sich die Relevanz von Hyphenschichten für den Schutz der PB am Beispiel von *Circinaria gyrosa* (PUBL. 1): ein massiver, bis 150 µm hoher Subcortex aus möglicherweise gering Melanin-haltigen Hyphen (Meeßen et al. 2013b) und extrazellulärer Gallerte kompensiert den Mangel an UV-absorbierenden sekundären Inhaltsstoffen im Cortex (Raggio et al. 2011), sodass die PB von *Circinaria gyrosa* nach 10tägiger Exposition (BIOPAN 5) nur 0-4,5% Photosyntheseaktivität einbüßten (de la Torre et al. 2010). Eine Ursache für die höhere Resistenz von *X. elegans* könnte somit in der unterschiedlichen Thallusanatomie zu finden sein, möglich wäre aber auch eine leicht unterschiedliche Austrocknungsresistenz der PB, wie sie für unterschiedliche *Trebouxia*-PB gezeigt werden konnte (Sadowsky & Ott 2012).

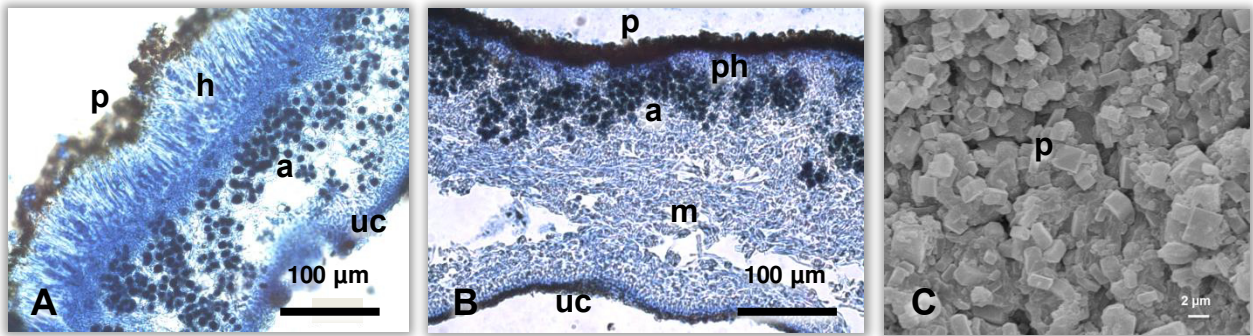


Abb. 2.3.5:

A *Xanthoria elegans*, Thallus mit Apothecium, nach ISS-Exposition unter Vakuum mit 291 MJm^{-2} UV

B Thallus, unbehandelte Kontrolle, kompakter oberer Cortex, plectenchymatische Cortexschicht, Photobionten in Clustern organisiert, lockere Medulla

A, B Querschnitte kontrastiert mit Lactophenol-Baumwollblau

C Aufsicht auf den Cortex von *X. elegans*, unbehandelte Kontrolle, Raster-Elektronen-Mikroskopie: Das Bild zeigt die dichte Auflagerung von Parietinkristallen auf dem Cortex.

p Parietin **h** Hymenium **c** oberer Cortex, **ph** plectenchymatische Hyphenschicht, **a** Algen (PB), **uc** unterer Cortex

2.4 Ionisierende Strahlung: Vitalität von *Xanthoria elegans*

2.4.1 Ionisierende Strahlung bis 2 kGy

Nach Eisenionen- und Röntgenbestrahlung zeigten die aus der Anhydrobiose reaktivierten Proben in der Chlorophyll *a* Fluoreszenzmessung unabhängig von der eingestrahlten Dosis keinen erkennbaren Effekt (Fig. 1b, 1f, PUBLIKATION 4). Die Proben regenerierten innerhalb von 24 h konform zu den Kontrollgruppen und behielten diese Aktivität über die folgenden drei Tage bei. Nach der Bestrahlung mit Heliumionen (He) zeigten sich reduzierte Fv/Fm Werte bei den mit 100 Gy bestrahlten Thallusproben von *X. elegans*, während mit 500 und 1000 Gy bestrahlte Thalli im Durchschnitt höhere Fv/Fm-Werte produzierten (Fig. 1d, PUBL. 4). Ein eventueller Effekt der Heliumionen-Bestrahlung ließe sich nicht zur Dosis korrelieren. Die Fv/Fm-Werte der *Circinaria gyrosa*-Photobionten wurden durch die Bestrahlung mit He bis 1 kGy, Eisenionen (Fe) bis 2 kGy und Röntgenstrahlung (Rö) bis 5 kGy nicht beeinträchtigt, jeweils verglichen zu den Werten vor der Bestrahlung (de la Torre et al. *in review*). Während die metabolische Aktivität des Mycobionten von *Xanthoria elegans* in der Fluoreszenzbasierten Färbung (LIVE/DEAD staining) zwischen 44% (Fe, 250 Gy) und 83% (He, 100 Gy) variierte, erreichten die Photobionten nur Werte von 10% (Rö, 500 Gy) bis 57% (Fe und He, 100 Gy) und zeigten bei allen Bestrahlungen bis 2 kGy eine stärker reduzierte metabolische Aktivität als der Mycobiont. Obwohl die metabolische Aktivität beeinträchtigt war, wurden die Proben von keiner der Bestrahlungen bis 2 kGy komplett inaktiviert. Bei Eisenionen- und Röntgenbestrahlung war die metabolische Aktivität ab ≥ 100 Gy beeinträchtigt. Die Analyse der Heliumionen-Bestrahlung mit insgesamt weniger Messpunkten offenbarte zusätzlich eine auffällige Heterogenität in der Vitalität der Proben, die sich bei der Chlorophyll *a* Fluoreszenz-Messung bestätigte. Um zu klären, ob die He-Bestrahlung dafür ursächlich ist, sollte

diese Kampagne mit zusätzlichen Messpunkten wiederholt werden. Insgesamt ergab sich aus diesem Experiment keine (Fe) oder eine sehr vage Korrelation von Dosis und Reduktion der metabolischen Aktivität (Rö). Tabelle 2.4.1 zeigt die Daten der metabolischen Aktivität, welche auch in Fig. 1a, 1c und 1e, PUBL. 4 dargestellt sind.

Tabelle 2.4.1:
Metabolische Aktivität [%] nach Bestrahlung (STARLIFE I; LIFE/DEAD *staining*)

Strahlung	Symbiont	Kontrollen		Dosis [Gy]				
		Lab-Kon.	Trnsp-Kon.	100	250	500	1000	2000
Fe-Ionen	Photobiont	72 ± 7	51 ± 11	57 ± 7	32 ± 14	44 ± 3	43 ± 12	37 ± 18
	Mycobiont	84 ± 3	69 ± 7	67 ± 6	44 ± 3	67 ± 10	55 ± 5	66 ± 4
He-Ionen	Photobiont	72 ± 7	48 ± 10	57 ± 14	n.d.	22 ± 19	27 ± 9	n.d.
	Mycobiont	84 ± 3	65 ± 12	83 ± 3	n.d.	62 ± 15	49 ± 17	n.d.
Röntgen	Photobiont	72 ± 7	59 ± 2	47 ± 9	35 ± 2	10 ± 3	34 ± 1	27 ± 10
	Mycobiont	84 ± 3	78 ± 4	67 ± 2	56 ± 12	56 ± 10	63 ± 5	53 ± 8

Lab-Kon.: unbehandelte bei -20°C gelagerte Kontrolle; Trnsp-Kon.: Transport-Kontrolle.

Die Werte geben den Anteil metabolisch aktiver Zellen in [%] der gezählten Zellen an, gefolgt von der Standardabweichung.

Die Energie, der LET (vgl. 1.5.2) und die relative biologische Wirksamkeit (RBE) variieren erheblich für die applizierte Strahlung (Tab. 1.7.3), aber diese Unterschiede werden nicht in den Werten der metabolischen oder photosynthetischen Aktivität erkennbar. Die wesentlich höhere Ionisationsdichte der beschleunigten Eisenionen (LET 200 keV/μm) kann zu dem als *overkill effect* bezeichneten Phänomen führen (Zirkle et al. 1953, Mehnati et al. 2005). Dabei steigt die schädigende Wirkung der Strahlung mit höheren LET- Werten (also mehr Ionisationsereignissen/μm) nicht weiter an, wenn mehr Ionisationsereignisse in einer Zelle stattfinden, als für deren Tod ausreichend sind. Die Höhe des LET ist zwar abhängig vom bestrahlten Material, aber seine Aussagekraft ist auf die akuten Phasen der Bestrahlung beschränkt (Dertinger & Jung 1969). Demgegenüber berücksichtigt die relative biologische Wirksamkeit im Besonderen den bestrahlten Organismus. Die erzielte Wirkung durch unterschiedliche Strahlungsarten wird dabei bezogen auf die Wirkung von Röntgenstrahlung mit gleicher Dosis. Ausgedrückt wird der empirisch ermittelte Wert durch den Qualitätsfaktor (QF). Für elektromagnetische Strahlung (γ- und Röntgenstrahlung) ist der QF als 1 definiert und für die in diesem Versuch eingesetzten Eisenionen gilt ein QF von 20 (ICRP 1991, 2007). Die Wirkung der Eisenionen lag in diesem Experiment nicht um den Faktor 20 höher (Fig. 1, PUBL. 4, 5). Erklärbar ist dies durch die Voraussetzungen, unter denen der QF ermittelt wird: Die Wirksamkeit der Strahlung wird in hydrierten biologischen Geweben beobachtet, die über eine ausreichende Dicke verfügen, um beschleunigte Ionen zu bremsen (vgl. 1.5.2). Sowohl die

Schäden durch die hohen Energieübertragungen gebremster Ionen (Bragg-peak), die Radiolyse von Wasser mit der Bildung von Radikalen (Riley 1994), als auch die induzierten Apoptosen in den bestrahlten Geweben tragen zu den hohen QF Werten von beschleunigten Ionen bei. Um die Wirkung von Strahlung auf trockene Flechten mit wenigen Millimetern Höhe scheint der QF daher nicht anwendbar zu sein.

Ein Kulturassay nach der Röntgen-Exposition (1 und 2 kGy) zeigte für beide Symbionten innerhalb von acht Wochen kein Wachstum (Abb. A5.2). Die anfänglich zu detektierende Chlorophyll-Fluoreszenz (Abb. A5.1) war nach der Kulturdauer nicht mehr nachweisbar, was auf eine Degradation des Chlorophylls und den Tod der Zellen infolge der applizierten Röntgenstrahlung hinweist. Während die Kulturansätze erst am Ende der Kulturzeit vereinzelt Aufwüchse von Pilzen zeigten, waren die Kontrollen mit nicht bestrahlten Proben bereits nach acht Tagen komplett von Mycelien bedeckt. Die wachstumshemmende Wirkung der Röntgenstrahlung betraf auch die Flechten-assoziierten Pilze.

2.4.2 Röntgenbestrahlung von *X. elegans* bis 100 Gy

Die Applikation von Röntgenstrahlung ≥ 100 Gy verursachte bei anhydrobiotischen Flechtenthalli in der STARLIFE Kampagne stets eine Reduktion der metabolischen Aktivität (Tab. 2.4.1, Fig. 1e, PUBL. 4). Ein daraus folgender experimenteller Ansatz mit metabolisch und photosynthetisch aktiven Flechtenthalli prüfte die Reaktion der sensitiveren Photobionten (Gannutz 1972) auf eine akute, einmalige Röntgenstrahlung mit 1-100 Gy anhand von Chlorophyll *a* Fluoreszenz-Messungen vor und nach der Bestrahlung (Fig. 4, PUBL. 4). Zusätzlich wurden in diesem Experiment präparierte Proben mit Thalli auf dem natürlichen Schiefersubstrat verglichen, um einen möglichen Einfluss durch die im felsigen Untergrund generierte Streustrahlung zu erkennen. Die über 96 h erfassten Fv/Fm Werte zeigten, dass sich die Photosyntheseaktivität völlig konform zu den unbehandelten Kontrollgruppen verhielt, unabhängig von der Röntgenbestrahlung. Eine Ausnahme stellte die kurzzeitige dosisabhängige Reduktion der Fv/Fm Werte dar, die nur bei den Proben auf Schiefersubstrat innerhalb von 5-60 Minuten nach der Bestrahlung auftrat. Nach dieser signifikanten Beeinträchtigung (100 Gy, Fig. 4, PUBL. 4) regenerierten die Schieferproben im weiteren Zeitverlauf zu ihren vorherigen Fv/Fm Werten.

2.4.3 Gamma Strahlung bis 113 kGy

Die Applikation von γ -Strahlung mit Dosen von 6-113 kGy zeigte bei *X. elegans* deutlich eine dosisabhängige Reduktion der photosynthetischen Aktivität oberhalb von 12 kGy (Fig. 3, PUBL. 4). Dies galt für alle Photobionten in diesem Experiment unabhängig davon, ob sie isoliert (PUBL. 5, PB aus *C. gyrosa*, Genus *Trebouxia*) oder im Flechtenthallus (PUBL. 4, *X. elegans*; de la Torre et al. *in review*, *C. gyrosa*) bestrahlt wurden. Die Photobionten (PB) von *X. elegans* regenerierten nach einer Dosis von 6 kGy analog zur unbehandelten Kontrolle innerhalb von 24 h nach dem Beenden der Anhydrobiose durch Befeuchtung ihre Fv/Fm Werte,

welche die folgenden zwei Tage auf diesem Niveau blieben. Bei γ -Strahlung ab 12 kGy wurde die photosynthetische Aktivität beeinträchtigt: Die Fv/Fm Werte regenerierten nicht auf das Kontrollgruppenniveau und fielen im Verlauf der nächsten zwei Tage, besonders deutlich nach 18 kGy γ -Strahlung (Fig. 3, PUBL. 4). Alle Dosen ≥ 24 kGy ließen die Regeneration scheitern oder inaktivierten die messbare Photosynthese-Aktivität sofort. Einen nahezu identischen Verlauf offenbarten die Chlorophyll *a* Fluoreszenz-Messungen der PB von *C. gyrosa* (de la Torre et al. *in review*) und der isolierten PB aus *C. gyrosa*. Auch hier blieb ein leichtes Aktivitätsdefizit nach 12 kGy sichtbar und die Regeneration scheiterte oder unterblieb völlig nach Dosen ≥ 18 kGy (Fig. 1d, PUBL. 5). Über einen Zeitraum von zwei Wochen bestätigten sich die Resultate der ersten drei Tage. Die obere Grenze der Photosyntheseaktivität gegenüber akuter γ -Strahlung läge für die PB von *X. elegans* und *C. gyrosa* demnach zwischen 12 und 18 kGy. Die nach 6 und 12 kGy γ -Strahlung in Kultur genommenen PB von *C. gyrosa* blieben grün und photosynthetisch aktiv, zeigten aber kein Wachstum. Entsprechend den Ergebnissen der Chlorophyll *a* Fluoreszenz-Messung degradierte das Chlorophyll der kultivierten PB nach ≥ 12 kGy schneller in Abhängigkeit von der applizierten Dosis (Fig. 2b-d, PUBL. 5, *chlorophyll bleaching*) und die Zellen starben ab. Die Analyse der metabolischen Aktivität (Fig. 2d, PUBL. 5) zeigte eine zur Dosis korrelierende Abnahme der aktiven Zellen und ab ≥ 47 kGy eine stark zunehmende Zahl degenerierter PB-Zellen (Fig. 3, PUBL. 5). Mit Blick auf das fehlende Wachstum waren die Photobionten bereits ab 6 kGy langfristig nicht vital, als einzelne Ausnahme wuchs eine Kolonie nach 72 kGy γ -Strahlung.

2.5 Ionisierende Strahlung: Resistenz von *Xanthoria elegans* und *Circinaria gyrosa* Photobionten

Die besondere Anatomie und die sekundären Inhaltsstoffe, die Flechten und ihren Symbionten UV-Protektion gewähren, beruhen auf der Absorption oder Vermeidung von z.B. UV-Strahlung (1.3.3). Um die Energie der beim Zerfall von $^{60}\text{Cobalt}$ emittierten Strahlung um die Hälfte abzuschwächen, wären 1,1 cm Blei erforderlich (Krieger 2004), für Röntgenstrahlung wurde die fehlende Absorptionsfähigkeit des Parietins experimentell überprüft (vgl. 1.7.2) und die Reichweite der eingesetzten beschleunigten Ionen übersteigt den Durchmesser der Flechtenproben (vgl. 1.5.2, pers. Kom. Berger). In der Konsequenz zeigten sich daher keine Unterschiede in der Strahlenresistenz von Photobionten innerhalb der intakten Flechte (PUBL. 4; de la Torre *in review*) und isolierten Photobionten (PUBL. 5). Die metabolische Aktivität ist beeinträchtigt, wobei die Verteilung der inaktivierten MB oder PB keinen anatomischen Gegebenheiten folgt, sondern es finden sich aktive und inaktive PB z.B. innerhalb eines Clusters (Fig. 2C, PUBL. 4; Abb. A4). Die Diskussion in PUBL. 4 nimmt Bezug auf die unterschiedliche Qualität der verschiedenen Komponenten der simulierten kosmischen Strahlung. Die biologische Wirkung der unterschiedlichen Qualitäten der applizierten ionisierenden Strahlung ist im Einzelnen diskutiert in PUBL. 5. Die Bestrahlungsversuche zeigen, dass das obere Limit

der PB gegenüber akuter γ -Strahlung zwischen 12 und 18 kGy liegt, aber bereits bei 1 kGy Röntgenstrahlung beiden Symbionten kein Wachstum und keine Teilung mehr möglich war. Eine Dosis von 100 Gy ionisierender Strahlung würde z.B. auf der Marsoberfläche in ca. 500 Jahren akkumuliert werden (Hassler et al. 2013). Alle im Versuch getesteten Strahlenqualitäten konnten ab 100 Gy auch die metabolische Aktivität beider Symbionten reduzieren, und zwar in einem höherem Maße, als dies durch die Exposition auf der ISS geschehen ist. Während auf der ISS die PB hauptsächlich durch die Wirkung des Vakuums geschädigt wurde (vgl. 2.1.3 und 2.2.2) und Anhydrobiose, Thallusanatomie und sekundäre Inhaltsstoffe die Wirkung der extraterrestrischen UV Strahlung gemindert haben, beruht die relativ hohe Strahlenresistenz auf der protektiven Wirkung der Anhydrobiose. Die durch die Bestrahlung verursachten Schäden an Proteinen und DNA (vgl. 1.5.2) erklären die fehlende Teilungsfähigkeit und reduzierte metabolische Aktivität (PUBL. 4, 5), wenn man bedenkt, dass nicht nur die DNA, sondern ebenso Reparatursysteme und Enzyme von der Strahlenwirkung betroffen sind (*clustered damage*; Goodhead 1994; vgl. 1.5.2). Auch nach γ -Strahlung bis 113 kGy zeigten *C. gyrosa* noch metabolische Aktivität, die wahrscheinlich von PB ausgeht, die noch nicht den nächsten Zellzyklus induziert haben. Die hohe photosynthetische Aktivität der STARLIFE Proben zeigt, dass das PS II bis 12 kGy regeneriert werden kann. Im Gegensatz zur Vakuumwirkung auf der ISS, hohen UV-Intensitäten (Lütz et al. 1996) sowie ionisierender Strahlung ≥ 18 kGy waren die Photobionten nicht in ihrer strukturellen Integrität beschädigt (PUBL. 5). Die PS II Aktivität ist allerdings nicht gleichbedeutend mit langfristiger Vitalität und Teilungsfähigkeit, die wesentlich von intakter DNA oder der effizienten Reparatur entstandener Schäden abhängt (Esnault et al. 2009). Ein großer Anteil der destruktiven Wirkung ionisierender Strahlung beruht auf der Radiolyse von Wasser und der Induktion von ROS, die dann Enzyme, DNA und Membranen schädigen (Riley 1994, Keresztes & Kovács 2002). Daher ist die Anhydrobiose ein relevanter Mechanismus der Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung. Die Austrocknung verringert den Wassergehalt, wodurch sich die Radiolyse von Wasser reduziert und weniger Radikale induziert werden. Zudem werden im Rahmen der Anhydrobiose ROS abfangenden Moleküle bereitgestellt und nach der Rehydrierung Reparaturvorgänge durchgeführt (Kranner et al. 2008). Die Koinzidenz von Strahlungs- und Austrocknungsresistenz sowie Frostresistenz, die sich für zahlreiche Organismen aus ariden und kalten Regionen zeigte (Dose et al. 1992, Billi et al. 2000, Gusev et al. 2010), beruht vermutlich auf den gleichen zellulären Resistenzmechanismen u.a. zur Vermeidung von oxidativem Stress und wird aktuell erforscht (Esnault et al. 2009, Musilova et al. 2015).

Die Mycobionten zeigten auch in diesem Experiment eine höhere metabolische Aktivität als die PB und somit eine höhere Resistenz gegenüber akuter Strahlung. Mycobionten demonstrierten ihre auch im hydrierten Zustand hohe Resistenz gegenüber chronischer und akuter γ -Strahlung bereits in früheren Experimenten (Gannutz 1972, Nifontova et al. 1995). Diese Resistenz beruht wahrscheinlich auf dem synzytialen Charakter des Myceliums (Gow & Gadd 1995). Im Mycel aus verbundenen Zellen können Zellkerne, Organellen und Genprodukte über die Zellverbindung ausgetauscht werden. Genprodukte oder Organellen können so sub-

stituiert werden (Gow & Gadd 1995). Fatal beschädigte Zellsegmente können zudem abgetrennt werden. Unter terrestrischen und auch extraterrestrischen Bedingungen ist somit die Vitalität des PB entscheidend für die Vitalität der gesamten Flechte.

2.6 Besondere Fragestellungen

2.6.1 Symbiose

Bereits in den terrestrischen Habitaten ist die mutualistische Symbiose ein Schlüsselprinzip für die Besiedelung von Habitaten mit extremen Umweltbedingungen, in denen die beiden Symbionten aposymbiotisch langfristig nicht lebensfähig wären (1.2). Für die Resistenz der einzelnen Symbionten gegenüber Weltraumbedingungen gilt dies umso mehr, da z.B. isolierte Photobionten eine deutlich geringere UV-Resistenz aufweisen (1.3.3).

Die Antwort auf die umgekehrte Frage, ob die Symbiose einen Vorteil unter Weltraumbedingungen darstellt, kann sich einerseits aus der Belastbarkeit der protektiven Strukturen und Charakteristika der speziellen Flechte ergeben, und andererseits aus dem Vergleich mit der Überlebensfähigkeit anderer Organismen. In den bisherigen Expositionsexperimenten waren die anhydrobiotischen Flechten UV-resistenter als getestete *Bacillus subtilis* Endosporen (Wassmann et al. 2012) und vitaler als antarktische Mikropilze (*Cryomyces* sp, 2.1.3, Onofri et al. 2012). Anhydrobiose und Trockenresistenz scheinen eine relevante Basis der Umweltresistenz aller im Weltraum exponierten Organismen (Endosporen, Cyanobakterien, Tardigraden, Ascomyceten, Archaeaen, Invertebraten; Horneck et al. 1994, Mancinelli et al. 1998, Billi et al. 2011, Persson et al. 2011, Onofri et al. 2012, Gusev & Okuda 2012), aber die zusätzliche Resistenz von *X. elegans* kann auf der speziellen dreidimensionalen Thallusstruktur, der Unabhängigkeit vom Substrat und den UV-absorbierenden Metaboliten des Mycobionten begründet sein. Somit ist die symbiotische Assoziation ein Überlebensvorteil.

2.6.2 Mars-analoge Umweltbedingungen

Das Experiment zeigte insbesondere die hohe Vitalität nach der Exposition unter Mars-analogen Bedingungen. Die metabolische Aktivität des Mycobionten und die Vitalität des Photobionten wurden durch die Mars-analogen Expositionsbedingungen einschließlich der Mars-analogen Dosis ionisierender Strahlung im LEO (vgl. 1.4.3) nur gering beeinträchtigt. Auch der Effekt auf die Zellintegrität des Photobionten war geringer als nach 5 Jahren trockener Lagerung unter terrestrischen Bedingungen. Die Grenze für das Überleben von anhydrobiotischen Flechten unter Mars-analogen Bedingungen sind im LIFE-Experiment nicht erreicht worden.

2.6.3 Lithopanspermie

Die astrobiologischen Versuche auf der EXPOSE-Plattform zeigten, dass die Flechte *Xanthoria elegans* die Simulation der zweiten Phase eines Transfers (vgl. 1.3.2) über 18 Monate tolerieren kann. Die Expositionszeit des LIFE-Experimentes limitiert dabei die Aussagekraft bezüglich eines interplanetaren Transfers auf den getesteten Zeitraum. Die STARLIFE-Bestrahlungskampagnen simulierten Komponenten ionisierender kosmischer Strahlung in hohen Dosen (vgl. 1.5). Allerdings ist die Intensität und Art der Strahlung sowie die akkumulierte Dosis für einen Transfer durch den Weltraum bei einem Lithopanspermie-Ereignis abhängig von der speziellen Flugbahn und der Dauer des Transfers (Reitz 2008, Clark 2001). Die Transitzeit gefundener Meteoriten vom Mars wird von Clark (2001) mit 2,6 bis 15 Mio. Jahren angegeben, andere Autoren sehen im Vakuum den limitierenden abiotischen Faktor (Nussinov & Lysenko 1983), was bedeutet, dass die Simulation der Transferphase deutlich verlängert werden müsste, um entsprechende Aussagen zu gestatten.

3.1 Zusammenfassung

Der Fokus dieser Studie lag auf der Vitalität der Flechte *Xanthoria elegans* nach der Exposition außerhalb der Internationalen Raumstation (ISS). Die untersuchten Proben von *X. elegans* waren zuvor im LIFE/EXPOSE-E-Experiment über 18 Monate den extremen abiotischen Einflüssen des erdnahen Weltraumes sowie dort simulierten Mars-analogen Umweltbedingungen ausgesetzt. LIFE war in Art und Dauer ein für symbiotische Organismen erstmalig durchgeführtes Experiment. In die Auswertung einbezogen wurden vorangegangene Simulationsexperimente und die *Mission Ground Reference* (einer parallel zur ISS-Exposition im DLR Köln durchgeführten Simulation). Weitere laborbasierte Experimente und die Analyse der ultrastrukturellen Schäden komplettierten die Charakterisierung des Resistenzpotentials von *X. elegans* gegenüber Weltraumbedingungen. Eingebunden in diese Studie waren die ebenfalls erstmalig durchgeführten Experimente zur Resistenz von Flechten gegenüber hohen Dosen ionisierender Strahlung, welche die außerhalb des Erdmagnetfeldes vorkommende kosmische Strahlung simulierten.

Die Analyse der im LIFE-Experiment exponierten Proben mit LIVE/DEAD-*staining* und Chlorophyll *a* Fluoreszenz-Messungen zeigte eine hohe metabolische Aktivität aller exponierten Proben von *X. elegans*, während die photosynthetische Aktivität nach Vakuumexposition beeinträchtigt war. Wachstum und Fortpflanzungsfähigkeit als wesentlicher Aspekt der Überlebensfähigkeit konnten nach der Weltraumexposition über Kulturen der PB qualitativ nachgewiesen werden. Die Kultivierbarkeit nach 18 Monaten unter Weltraumbedingungen bestätigte *X. elegans* als relevanten astrobiologischen Modellorganismus. Die auf der ISS simulierten Mars-analogen Bedingungen beeinträchtigten die Vitalität deutlich geringer als die Exposition unter Vakuum. Eine Analyse der Ultrastruktur mittels Transmission-Elektronen-Mikroskopie zeigte, dass die PB unter Weltraumvakuum vermehrt Schäden erlitten hatten, wie sie für eine viele Jahre andauernde Austrocknung charakteristisch sind. In 61-97% der unter Vakuum exponierten PB war der Protoplast irreversibel kollabiert. Der limitierende Faktor für das Überleben unter Weltraumbedingungen war für *X. elegans* der lange Zeitraum unter Vakuum bis 10^{-9} mbar.

X. elegans wurde nicht beeinträchtigt durch die intensive Licht- und UV_{200-400nm}-Strahlung im LIFE-Experiment. Hinweise auf einen synergistischen Effekt kombinierter extraterrestrischer Stressoren konnten ausschließlich nach Exposition unter Vakuum mit intensiver UV_{100-400nm}-Strahlung von ca. 300 MJm⁻² beobachtet werden. Die hohe UV-Resistenz beruht hauptsächlich auf den UV-absorbierenden Eigenschaften des vom Mycobionten (MB) synthetisierten Cortex-Pigments Parietin. Der Schutz der Licht/UV-sensitiveren PB bestand auch unter Weltraumbedingungen und bestätigte zudem die Relevanz der Symbiose als Überlebensstrategie. Hohe Trockenresistenz und die Fähigkeit zur Anhydrobiose sind für die poikilohydrinen Flechten von besonderer Relevanz für die Besiedlung von ariden, alpinen oder polaren Habitaten. Die Analysen zeigten, dass diese Eigenschaften bei *X. elegans* auch unter Weltraumbedingungen und z.T. gegenüber ionisierender Strahlung protektiv wirkten.

Die Bestrahlungsexperimente mit beschleunigten Eisen- und Helium- Ionen sowie Röntgen- und γ - Strahlung wurden mit Proben in Anhydrobiose durchgeführt. Es zeigte sich, dass die photosynthetische Aktivität durch die Bestrahlungen bis 2 kGy nicht beeinträchtigt wurde. Die metabolische Aktivität wurde durch Strahlendosen ab 100 Gy reduziert, dies deutlicher bei den PB, als bei den resistenteren MB. Für die eingesetzten Strahlenarten bestehen starke Unterschiede in ihrer Wirkung auf hydrierte Zellen, die sich hier nicht wiederfanden. Ebenso zeigte sich keine Korrelation zwischen Dosis und reduzierter Aktivität. Auch bei Flechten, die im feuchten, aktiven Zustand Röntgenstrahlen bis 100 Gy ausgesetzt wurden, zeigte sich keine anhaltende Beeinträchtigung der photosynthetischen Aktivität. Die γ -Bestrahlung trockener *X. elegans*-Thalli und isolierter *Circinaria gyrosa*-PB zeigte eine einheitliche Grenze für die Regeneration der photosynthetischen Aktivität bei ≤ 17 kGy. Ein Kulturexperiment zeigte aber, dass die PB ihre Reproduktionsfähigkeit bereits 6 kGy bei eingebüßt hatten.

Insgesamt zeigten die Experimente eine bemerkenswerte Strahlenresistenz bezogen auf Photosynthese- und metabolische Aktivität. Dies kann durch Trockenheit der Proben erklärt werden, die indirekte Strahlenschäden durch Radiolyse von Wasser deutlich verringert. Zusätzlich aber ist die Anhydrobiose charakterisiert durch Mechanismen zur Reduktion von Radikalen und oxidativem Stress. Dies könnte bedeuten, dass Trockenresistenz und Strahlenresistenz gemeinsame Mechanismen besitzen.

Die Studie lieferte Ergebnisse zur Überlebensfähigkeit der untersuchten Flechten unter Welt- raum- bzw. Mars-analogen Bedingungen sowie erste Erkenntnisse über ihre Resistenz gegenüber simulierter kosmischer Strahlung. Die eingesetzten Methoden wurden im Rahmen dieser Studie zum Teil modifiziert und weiter etabliert.

3.2 Summary

The current study focuses on the viability of the lichen *Xanthoria elegans* after being exposed outside the International Space Station (ISS). During the 18 months of the LIFE/EXPOSE-E-experiment *X. elegans* samples were exposed to the hazardous conditions of space in low-Earth-orbit or to on-site simulated Mars-analogue conditions. LIFE was the first long-term exposure experiment on the ISS testing symbiotic organisms. The analysis of the returned samples was complemented by previous simulations and the Mission Ground Reference (a close simulation of the ISS-exposure performed in parallel at DLR, Cologne). Further lab-based experiments and an analysis of ultrastructural damages completed the characterization of *X. elegans*' resistance towards space conditions. Included in the current study are experiments on the resistance of lichens towards high doses of ionizing radiation. The applied ionizing radiation resembled components of the cosmic radiation occurring outside Earths' magnetic shielding. These, too, were the first experiments.

X. elegans samples exposed in LIFE were analysed by LIVE/DEAD-staining and chlorophyll *a* fluorescence-measurements. Analyses showed a high amount of metabolically active cells in all exposed samples, but the photosynthetic activity was impaired after the vacuum exposure. Growth and reproduction – as the most relevant proofs of vitality – were shown qualitatively by photobiont culture assays. Being cultivable after 18 months in low-Earth-orbit conditions confirmed *X. elegans* is a relevant astrobiological model organism. However, the Mars-analogue exposure had much less of an effect on viability, compared to the space vacuum. Ultrastructural analyses by transmission-electron-microscopy revealed that photobionts exposed to vacuum suffered damages, resembling the damages shown typically after several years of dry storage. These damages appeared in significantly higher amount after vacuum exposure, including irreversibly collapsed protoplasts in 61-97% of the vacuum-exposed photobionts. Concerning *X. elegans*, the limiting factor for survival under space conditions was the long-term vacuum exposure at 10^{-9} mbar.

X. elegans was not affected by the intense light- and UV_{200-400nm}-irradiation throughout the LIFE-experiment. Only the exposure to vacuum and UV_{100-400nm}-irradiation of c. 300 MJm⁻² gave a hint on a possible synergistic effect of these extra-terrestrial stressors. The observable high UV-resistance is conferred mainly by the UV-absorbing properties of the cortex-bound pigment parietin which is synthesized by the mycobiont, protecting the light- and UV-sensitive photobiont from insolation. The protection stayed fully functional in space conditions and by that also proved the importance of symbiosis as a valid survival strategy.

A high desiccation tolerance and the ability for anhydrobiosis are crucial for the colonization of arid, alpine or polar habitats by the poikilohydric lichens. Analyses indicated that these traits also protected *X. elegans* under space conditions. In addition, these traits conferred a certain resistance towards ionizing radiation.

Ionization radiation experiments employed accelerated helium- and iron ions as well as X-rays and γ -radiation. All samples were in anhydrobiosis for the whole duration of the experiment. After radiation up to 2 kGy the photosynthetic activity remained unimpaired. All radiation > 100 Gy was capable of reducing the metabolic activity. The reduction was more pronounced in the photobiont while the mycobiont showed its notable resistance. If applied to hydrated cells the applied types of radiation are known to induce effects of very different severity. However, no differences were observed in the current study. As well, there was no correlation of applied doses to the reduction of metabolic activity. An additional experiment exposed wetted, active lichen thalli to X-rays from 1-100 Gy. Still, the photosynthetic activity showed no sustained effect. The γ -radiation of dry *X. elegans* thalli and isolated photobionts of *Circinaria gyrosa* showed a consistent limit for the recovery of photosynthetic activity at ≤ 17 kGy. But, additional culture assay revealed that the photobiont lost its reproductive ability already at 6 kGy.

Concerning metabolic and photosynthetic activity, a remarkable radiation-resistance was shown. It might be caused by the dramatically reduced radiolysis of water, sparing the dry samples the indirect effects of radiation. In addition, anhydrobiosis is characterised by several counter-mechanisms against radicals and oxidative stress. By that, one could conclude that that desiccation resistance and resistance towards radiation invoke the same mechanisms.

The present study provided results on the viability and resistance of lichens, especially *X. elegans*, under space and Mars-like conditions. As well it provided first in-sights to lichens' resistance towards ionizing radiation resp. simulated cosmic rays. Methods used in the framework of this study were partly modified and well-established to astrobiological experiments.

4.1 Literaturverzeichnis

- Ahmadjian, V. (1965). Lichens. *Annual Reviews in Microbiology*, 19(1), 1-20.
- Ahmadjian, V. (1967). A guide to the algae occurring as lichen symbionts: isolation, culture, cultural physiology, and identification. *Phycologia* 6(2), 127-160.
- Ajello, M., Albert, A., Allafort, A., Baldini, L., Barbiellini, G., Bastieri, D., ..., Bregeon, J. (2014). Impulsive and long duration high-energy gamma-ray emission from the very bright 2012 March 7 solar flares. *The Astrophysical Journal* 789(1), 20-35.
- Arrhenius, S. (1903). Die Verbreitung des Lebens im Weltenraum. *Die Umschau* 7, 481-485.
- Aubert, S., Juge, C., Boisson, A.M., Gout, E., Bligny, R. (2007). Metabolic processes sustaining the reviviscence of lichen *Xanthoria elegans* (Link) in high mountain environments. *Planta* 226(5), 1287-1297.
- Backhaus, T., de la Torre, R., Lyhme, K., de Vera, J.-P., Meeßen, J. (2015). Desiccation and low temperature attenuate the effect of UVC 254 nm in the photobiont of the astrobiologically relevant lichens *Circinaria gyrosa* and *Buellia frigida*. *International Journal of Astrobiology* 14(03), 479-488.
- Baqué, M., Scalzi, G., Rabbow, E., Rettberg, P., Billi, D. (2013). Biofilm and planktonic lifestyles differently support the resistance of the desert cyanobacterium *Chroococcidiopsis* under space and Martian simulations. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 43(4-5), 377-389.
- Baqué, M., Verseux, C., Böttger, U., Rabbow, E., Billi, D., de Vera, J.-P. (2015) Preservation of cyanobacterial biomarkers after Martian ground-based simulation exposure. EANA 2014, 13.-16. Okt. 2014, Edinburgh, UK.
- Barták, M., Váczi, P., Hájek, J., Smykla, J. (2007). Low-temperature limitation of primary photosynthetic processes in Antarctic lichens *Umbilicaria antarctica* and *Xanthoria elegans*. *Polar Biology* 31(1), 47-51.
- Bauermeister, A., Moeller, R., Reitz, G., Sommer, S., Rettberg, P. (2011). Effect of relative humidity on *Deinococcus radiodurans*' resistance to prolonged desiccation, heat, ionizing, germicidal, and environmentally relevant UV radiation. *Microbial ecology* 61(3), 715-722.
- Beblo, K. (2010). Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit thermophiler und hyperthermophiler Mikroorganismen nach Trocknung und Strahlenexposition. Dissertation an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III Biologie und vorklinische Medizin der Universität Regensburg .
- Belnap, J., Büdel, B., Lange, O.L. (2001). Biological soils crusts: characteristics and distribution. *Ecological Studies* 150, 3-31.
- Benton, E.R., Benton, E.V. (2001). Space radiation dosimetry in low-Earth orbit and beyond. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 184(1), 255-294.
- Berger, T., Reitz, G., Burmeister, R., Beaujean, R., Zapp, N. (2005). MATROSHKA - Overview of 2004-2005. WRMIS 2005, NIRS, Japan
- Berger, T., Hajek, M., Bilski, P., Körner, C., Vanhavere, F., Reitz, G. (2012). Cosmic radiation exposure of biological test systems during the EXPOSE-E mission. *Astrobiology* 12(5), 387-392.

- Bertrand, M., Chabin, A., Brack, A., Cottin, H., Chaput, D., Westall, F. (2012). The PROCESS experiment: exposure of amino acids in the EXPOSE-E experiment on the International Space Station and in laboratory simulations. *Astrobiology* 12(5), 426-435.
- Bieger-Dose, A., Dose, K., Meffert, R., Mehler, M., Risi, S. (1992). Extreme dryness and DNA-protein cross-links. *Advances in Space Research* 12(4), 265-270.
- Billi, D., Potts, M. (2000). Life without water: responses of prokaryotes to desiccation. *In: Storey, K.B., Storey, J. (Eds) Environmental stressors and gene responses. Elsevier Science B.V.*, pp 181-192.
- Billi, D., Viaggiu, E., Cockell, C. S., Rabbow, E., Horneck, G., Onofri, S. (2011). Damage escape and repair in dried *Chroococcidiopsis* spp. from hot and cold deserts exposed to simulated space and Martian conditions. *Astrobiology* 11(1), 65-73.
- Bischof, K., Hanelt, D., Wiencke, C. (2000). Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. *Planta* 211 (4), 555–562.
- Blumthaler, M., Ambach, W., Ellinger, R. (1997). Increase in solar UV radiation with altitude. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 39(2):130-134.
- Böttger, U., Meessen, J., Martinez-Frias, J., Hübers, H.W., Rull, F., Sánchez, F.J., ... , de Vera, J. P. (2014). Raman spectroscopic analysis of the calcium oxalate producing extremotolerant lichen *Circinaria gyrosa*. *International Journal of Astrobiology* 13(1), 19-27.
- Brandt, A., de Vera, J.-P., Onofri, S., Ott, S. (2015). Viability of the lichen *Xanthoria elegans* and its symbionts after 18 months of space exposure and simulated Mars conditions on the ISS. *International Journal of Astrobiology* 14(3), 411-425. (PUBL. 2)
- Brandt, A., Posthoff, E., de Vera, J.-P., Onofri, S., Ott, S. (2016). Characterization of viability, growth and ultrastructural effects of the *Xanthoria elegans* photobiont after 1.5 years of space exposure on the International Space Station. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 46(2), 311-321. (PUBL. 3)
- Brandt, A., Meeßen, J., Jänicke, R., Ott, S. Simulated deep space radiation: Impact of four different types of high-dose ionizing radiation on the lichen *Xanthoria elegans*. *Astrobiology* (in review). (PUBL. 4)
- Britt, A.B. (1996). DNA damage and repair in plants. *Annual review of plant biology* 47(1), 75-100.
- Brodo, I.M., Sharnoff, S.D., Sharnoff, S. (2001). Lichens of North America. Yale University Press, New Haven, London.
- Brown, D.H., Rapsch, S., Beckett, A., Ascaso, C. (1987). The effect of desiccation on cell shape in the lichen *Parmelia sulcata* Taylor. *New Phytologist* 105(2), 295-299.
- Brunauer, G., Stocker-Wörgötter, E. (2005). Culture of lichen fungi for future production of biologically active compounds. *Symbiosis* 38(2), 187-201.
- Büdel, B., Scheidegger, C. (1996). Thallus morphology and anatomy. *In: Nash, T.H. III (Ed.): Lichen biology. Cambridge University Press, Cambridge*, pp 37-64.
- Buffoni Hall, Roberta (2002). Buffoni Hall, R. (2002). Effects of increased UV-B radiation on the lichen *Cladonia arbuscula* spp. *mitis*: UV-absorbing pigments and DNA damage. Department of Cell and Organism Biology, Lund University.
- Cadet, J., Sage, E., Douki, T. (2005). Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 571(1), 3-17.

- Clark, B.C. (2001). Planetary interchange of bioactive material: probability factors and implications. *Origins of Life and Evolution of the Biospheres* 31(1), 185-197.
- Cockell, C. S. (1998). Biological effects of high ultraviolet radiation on early Earth - a theoretical evaluation. *Journal of theoretical biology* 193(4), 717-729.
- Cockell, C.S. (2014). Trajectories of Martian habitability. *Astrobiology* 14(2), 182-203.
- Cooper, R. (1953). The Role of Lichens in Soil Formation and Plant Succession. *Ecology* 34(4), 805-807.
- Cox, C.S. (1993). Roles of water molecules in bacteria and viruses. *Origins of Life and Evolution of the Biospheres* 23(1), 29-36.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. (1992). Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 54(1), 579-599.
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 60, 73–103.
- Dachev, T., Horneck, G., Häder, D.-P., Schuster, M., Richter, P., Lebert, M., Demets, Rene (2012) Time profile of Cosmic Radiation exposure during the EXPOSE-E mission: The R3DE instrument. *Astrobiology* 12(5), 403-411.
- Daly, M.J. (2012). Death by protein damage in irradiated cells. *DNA repair* 11(1), 12-21.
- de la Torre, R., Sancho, L.G., Horneck, G., de los Ríos, A., Wierzchos, J., Olsson-Francis, K., Cockell, C., Rettberg, P., Berger, T., de Vera, J.-P., Ott, S., Frías, J.M., Gonzalez, P.M., Lucas, M.M., Reina, M., Pintado, A., Demets, R., (2010). Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions—Results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus* 208(2), 735-748.
- de la Torre, R., Miller, A.Z., Cubero, B., Raguse, M., Meeßen, J.: The effect of high-dose ionizing radiation on the astrobiological model lichen *Circinaria gyrosa*. *Astrobiology, in review*
- de la Vega, U.P., Rettberg, P., Reitz, G. (2007). Simulation of the environmental climate conditions on Martian surface and its effect on *Deinococcus radiodurans*. *Advances in Space Research* 40(11), 1672 - 1677.
- de los Ríos, A., Wierzchos, J., Sancho, L.G., Ascaso, C. (2004). Exploring the physiological state of continental Antarctic endolithic microorganisms by microscopy. *FEMS Microbiological Ecology* 50(3), 143 - 152.
- de los Ríos, A., Ascaso, C., Wierzchos, J. (2010). Study of lichens with different state of hydration by the combination of low temperature scanning electron and confocal laser scanning microscopies. *International Microbiology* 2(4), 251–257.
- de Vera, J.-P., Horneck, G., Rettberg, P., Ott, S. (2003). The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *International Journal of Astrobiology* 1(4), 285-293.
- de Vera, J.-P. (2005). Grenzen des Überlebens: Flechten als Modellorganismen für das Potential von Adaptations-mechanismen unter Extrembedingungen. Dissertation Heinrich-Heine University, ULB Düsseldorf, 1-180

- de Vera, J.-P., Rettberg, P., Ott, S. (2008). Life at the limits: capacities of isolated and cultured lichen symbionts to resist extreme environmental stresses. *Origins of Life and Evolution of the Biospheres* 38(5), 457-468.
- de Vera, J.-P., Ott, S. (2010). Resistance of symbiotic eukaryotes. Survival to simulated space conditions and asteroid impact cataclysms. *In: Seckbach J, Grube M (Eds.) Symbioses and stress: Joint ventures in biology. Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology* 17, 595-611.
- de Vera, J.-P., Möhlmann, D., Butina, F., Lorek, A., Wernecke, R., Ott, S. (2010). Survival potential and photosynthetic activity of lichens under Mars-like conditions: a laboratory study. *Astrobiology* 10(2), 215-227.
- Dietz, S., Büdel, B., Lange, O.L. Bilger, W. (2000). Transmittance of light through the cortex of lichens from contrasting habitats. *Bibliotheca Lichenologica* 75, 171-182.
- Doran, P.T., Lyons, W.B., McKnight, D.M. (Eds.) (2010). Life in Antarctic deserts and other cold dry environments: astrobiological analogs (Vol. 5). Cambridge University Press, Cambridge, GB.
- Dose, K., Bieger-Dose, A., Labusch, M., Gill, M. (1992). Survival in extreme dryness and DNA-single-strand breaks. *Advances in Space Research* 12(4), 221-229.
- Dose, K., Gill, M. (1995). DNA stability and survival of *Bacillus subtilis* spores in extreme dryness. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 25(1-3), 277-293.
- Douki, T., Cadet, J. (2001). Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolyses. *Biochemistry* 40(8), 2495-2501.
- Douki, T., Reynaud-Angelin, A., Cadet, J., Sage, E. (2003). Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry* 42(30), 9221-9226.
- Dyer, P., Crittenden, P. (2008). Antarctic lichens: life in the freezer. *Microbiology Today* 35(2), 74-77.
- Elix, J.A. (1996), Biochemistry and secondary metabolites. *In: Nash, T.H. III (Ed.): Lichen biology.* Cambridge University Press, Cambridge, pp 154-180.
- Emerson, F.W. (1947). Basic botany. The Blakiston Co., Philadelphia
- Engelen, A., Buschbom, J., Convey, P., Ott, S. (2008). Specificity and selectivity of algal partners in lichen symbioses at coastal and inland sites in Antarctica. *In: Antarktische Nunatakker als Modell-Ökosystem für initiale Besiedlungsprozesse und Artendiversität in nacheiszeitlichen Perioden.* Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, pp 75-96.
- Epp, E.R., Weiss, H., Santomasso, A. (1968). The oxygen effect in bacterial cells irradiated with high-intensity pulsed electrons. *Radiation research* 34(2), 320-325.
- Flemming, H.C., Neu, T.R., Wozniak, D.J. (2007). The EPS matrix: the house of biofilm cells. *Journal of Bacteriology* 189, 7945-7947.
- Frey, R.L.W., Lösch, R. (2004). Lehrbuch der Geobotanik. Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH, München .
- Friedmann, E.I., Hua, M., Ocampo-Friedmann, R. (1988). Cryptoendolithic lichen and cyanobacterial communities of the Ross Desert, Antarctica. *Polarforschung* 58(2/3), 251-259.
- Friedmann, E.I., Ocampo-Friedmann, R. (1995). A primitive cyanobacterium as pioneer microorganism for terraforming Mars. *Advances in Space Research* 15(3), 243-246.

- Frösler, J., Flemming, H.C., Wingender, J. (2013). The influence of extracellular polymeric substances on the desiccation tolerance of *Deinococcus geothermalis* biofilms. EANA Astrobiology Conference, 22 - 25 July, 2013, Szczecin, Poland.
- Frohnmeier, H., Staiger, D. (2003). Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant physiology* 133(4), 1420-1428.
- Gamutz, T.P. (1972). Effects of gamma radiation on lichens—i. acute gamma radiation on lichen algae and fungi. *Radiation Botany* 12(5), 331-338.
- Gargaud, M. (Ed.) (2011). Encyclopedia of astrobiology (Vol. 1). Springer Science & Business Media, Berlin.
- Gasulla, F., de Nova, P.G., Esteban-Carrasco, A., Zapata, J.M., Barreno, E., Guéra, A. (2009). Dehydration rate and time of desiccation affect recovery of the lichenic algae *Trebouxia erici*: alternative and classical protective mechanisms. *Planta*, 231(1), 195-208.
- Gauslaa, Y., Solhaug, K. A. (2001). Fungal melanins as a sun screen for symbiotic green algae in the lichen *Lobaria pulmonaria*. *Oecologia* 126(4), 462-471.
- Gauslaa, Y., Solhaug, K.A. (2004). Photoinhibition in lichens depends on cortical characteristics and hydration. *The Lichenologist*, 36(2), 133-143.
- Gauslaa, Y., McEvoy, M. (2005). Seasonal changes in solar radiation drive acclimation of the sun-screening compound parietin in the lichen *Xanthoria parietina*. *Basic and Applied Ecology* 6(1), 75-82.
- Ghetti, F., Checcucci, G., Bornman, J.F. (Eds.). (2006). Environmental UV radiation: Impact on ecosystems and human health and predictive models. NATO Science Series IV: Proceedings of the NATO Advanced Study Institute on Environmental UV Radiation, Pisa, Italy, June 2001 (Vol. 57). Springer Science & Business Media, Springer Netherlands.
- Goodhead, D.T. (1994). Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International Journal of Radiation Biology* 65(1), 7-17.
- Goretzki, G. (1987). Medizinische Strahlenkunde – Physikalisch-technische Grundlagen. Urban und Schwarzenberg, München.
- Gow, N.A., Gadd, G.M. (Eds.) (1995). The growing fungus. Chapman & Hall, London
- Grube, M. (2010). Die hard: lichens. In: Seckbach, J., Grube, M. (Eds.) Symbioses and Stress. Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology 17. Springer Science & Business Media, Springer Netherlands, pp. 509-523.
- Gusev, O., Nakahara, Y., Vanyagina, V., Malutina, L., Cornette, R., Sakashita, T., ..., Okuda, T. (2010). Anhydrobiosis-associated nuclear DNA damage and repair in the sleeping chironomid: linkage with radioresistance. *PLoS One* 5(11), e14008.
- Gusev, O., Okuda, T. (2012). “Life Without Water”: The sleeping chironomid and other anhydrobiotic invertebrates and their utilization in Astrobiology. In: *Life on Earth and Other Planetary Bodies* (pp. 121-138). Springer Netherlands.
- Hájek, J., Váczi, P., Barták, M., Jahnová, L. (2012). Interspecific differences in cryoresistance of lichen symbiotic algae of genus *Trebouxia* assessed by cell viability and chlorophyll fluorescence. *Cryobiology* 64(3), 215-222.
- Hale, M. E. (1976). Lichen structure viewed with the scanning electron microscope. In: Brown, D.H., Hawksworth, D.L., Bailey, B.H. (Eds.) *Lichenology: Progress and Problems; Proceedings of an international Symposium*. Academic Press, London

- Harrison, J.P., Gheeraert, N., Tsigelnitskiy, D., Cockell, C.S. (2013). The limits for life under multiple extremes. *Trends in microbiology* 21(4), 204-212.
- Hassler, D. M., Zeitlin, C., Wimmer-Schweingruber, R. F., Ehresmann, B., Rafkin, S., Eigenbrode, J. L., ..., Burmeister, S. (2013). Mars' surface radiation environment measured with the Mars Science Laboratory's Curiosity rover. *Science* 343(6169), DOI: 10.1126/science.1244797.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N. (1995). Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. CAB Wallingford, GB.
- Henssen, A., Jahns, H.M., Santesson, J. (1974). Lichenes: eine Einführung in die Flechtenkunde. Verlag G. Thieme, Stuttgart.
- Holmstrup, M., Sjørnsen, H., Ravn, H., Bayley, M. (2001). Dehydration tolerance and water vapour absorption in two species of soil-dwelling *Collembola* by accumulation of sugars and polyols. *Functional Ecology* 15(5), 647-653.
- Holzinger, A., Lütz, C. (2006). Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron* 37(3), 190-207.
- Holzinger, A., Karsten, U. (2013). Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 4.
- Honegger, R. (1986). Ultrastructural studies in lichens. *New Phytologist* 103(4), 785-795.
- Honegger, R. (1991). Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annual Review of Plant Biology* 42(1), 553-578.
- Honegger, R. (1992). Lichens: Mycobiont-photobiont relationships. In: Reisser, W. (Ed.) Algae and symbioses. Biopress Limited, Bristol, pp 255-276.
- Honegger, R. (1995). Experimental studies with foliose macrolichens: fungal response to spatial disturbance at the organismic level and to spatial problems at the cellular level during drought stress events. *Canadian Journal of Botany* 73 (Suppl. I), S569-S578.
- Honegger, R. (1996). Experimental studies of growth and regenerative capacity in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. *New Phytologist* 133, 573-581.
- Honegger, R. (1998). The lichen symbiosis - what is so spectacular about it? *The Lichenologist* 30(3), 193-212.
- Honegger, R. (2003). The impact of different long-term storage conditions on the viability of lichen-forming ascomycetes and their green algal photobiont, *Trebouxia* spp. *Plant Biology* 5(3), 324-330.
- Honegger, R. (2009). Lichen-forming fungi and their photobionts. In: Deising, H.B. (Ed.) Plant relationships, The Mycota 5. Springer Berlin Heidelberg, pp 307-333.
- Horneck, G., Bücker, H., Reitz, G., Requardt, H., Dose, K., Martens, K.D., Mennigmann, H.D., Weber, P. (1984). Life Sciences Microorganisms in the Space Environment. *Science* 225(4658), 226-228.
- Horneck, G. (1992). Radiobiological experiments in space: a review. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part D. Nuclear Tracks and Radiation Measurements* 20(1), 185-205.
- Horneck, G. (1993). Responses of *Bacillus subtilis* spores to space environment: Results from experiments in space. *Origins of Life and Evolution of the Biospheres* 23(1), 37-52.
- Horneck, G. (1994). HZE particle effects in space. *Acta Astronaut* 32(11), 749-755.

- Horneck, G., Bücker, H., Reitz, G. (1994). Long-term survival of bacterial spores in space. *Advances in Space Research* 14(10), 41-45.
- Horneck, G. (1998). Exobiological experiments in Earth orbit. *Advances in Space Research*, 22(3) 317-326.
- Horneck, G., Rettberg, P., Reitz, G., Wehner, J., Eschweiler, U., Strauch, K., Panitz, C., Starke, V., Baumstark-Khan, C. (2001). Protection of bacterial spores in space, a contribution to the discussion on Panspermia. *Origins of Life and Evolution of the Biospheres* 31(6), 527-547.
- Horneck, G., Mileikowsky, C., Melosh, H.J., Wilson, J.W., Cucinotta, F.A., Gladman, B. (2002). Viable transfer of microorganisms in the solar system and beyond. In: Horneck, G., Baumstark-Khan, C. (Eds.) *Astrobiology - The quest for the conditions of life*. Chap 4, pp. 57-76. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Horneck, G. (2003). Anhydrobiosis, a capacity for longterm survival of hostile environmental conditons. *Geochimica et Cosmochimica Acta Supplement* 67(18), 157.
- Horneck, G., Stöffler, D., Ott, S., Hornemann, U., Cockell, C.S., Moeller, R., Meyer, C., de Vera, J.-P., Schade, S., Artemieva, N.A. (2008). Microbial rock inhabitants survive hyper-velocity impacts on Mars-like host planets: first phase of Lithopanspermia experimentally tested. *Astrobiology* 8(1), 17-44.
- Horneck, G., Klaus, D.M., Mancinelli, R.L. (2010). Space microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(1), 121-156.
- Horneck, G., Zell, M. (2012). Introduction to the EXPOSE-E Mission. *Astrobiology* 12(5), 373-373.
- Horneck, G., Moeller, R., Cadet, J., Douki, T., Mancinelli, R.L., Nicholson, W.L., Vaishampayan, P., Venkateswaran, K.J., Stackebrandt, E. (2012). Resistance of bacterial endospores to outer space for planetary protection purposes - experiment PROTECT of the EXPOSE-E mission. *Astrobiology* 12(5), 445-456.
- Huneck, S., Yoshimura, I. (1996). Identification of lichen substances. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Huneck, S. (1999). The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 86(12), 559-570.
- ICRP, 1991. 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 60. Ann. ICRP 21 (1-3).
- ICRP, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. Ann. ICRP 37(2-4).
- Jahns, H.M. (1988). The lichen thallus. In: Galun, M. (Ed.) *CRC handbook of lichenology*, Vol. I., CRC Press, Boca Ranton, pp 95-143.
- Jasinghe, V.J., Perera, C O. (2005). Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D 2 by UV irradiation. *Food chemistry* 92(3), 541-546.
- Jensen, M. (2002). Measurement of chlorophyll fluorescence in lichens. In: Kranner, I., Beckett, R.P., Varma, A.K. (Eds.) *Protocols in Lichenology*. Springer Laboratory Manuals, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp 135-151.
- Jones, A.E., Shanklin, J.D. (1995). Continued decline of total ozone over Halley, Antarctica, since 1985. *Nature* 376, 409-411.

- Kappen, L., Friedmann, E.I. (1983). Ecophysiology of lichens in the dry valleys of Southern Victoria Land, Antarctica. *Polar Biology* 1(4), 227-232.
- Kappen, L. (1988) Ecophysiological relationships in different climatic regions. *In: Galun, M. (Ed.) CRC Handbook of Lichenology (Vol. 2), CRC Press, Boca Raton, USA. pp 37 - 100*
- Kappen, L. (1993). Plant activity under snow and ice, with particular reference to lichens. *Arctic* 46(4), 297-302.
- Kappen, L., Schroeter, B., Scheidegger, C., Sommerkorn, M., Hestmark, G. (1996). Cold resistance and metabolic activity of lichens below 0° C. *Advances in Space Research* 18(12), 119-128.
- Kappen, L., Schroeter, B., Green, T.G.A., Seppelt, R D. (1998). Chlorophyll *a* fluorescence and CO₂ exchange of *Umbilicaria aprina* under extreme light stress in the cold. *Oecologia* 113(3):325-331.
- Kappen, L. (2000). Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. *Antarctic Science* 12(03), 314-324.
- Kappler, A., Pasquero, C., Konhauser, K.O., Newman, D.K. (2005). Deposition of banded iron formations by anoxygenic phototrophic Fe(II)-oxidizing bacteria. *Geology* 33(11), 865-868.
- Keresztes, E., Kovács, Á. (2002). Effect of gamma and UV-B/C radiation on plants cells. *Micron* 33(2), 199-210.
- Klebesadel, R.W., Strong, I.B., Olson, R.A. (1973). Observations of gamma-ray bursts of cosmic origin. *The Astrophysical Journal* 182, L85-L88.
- Kminek, G., Rummel, J.D. (2015). Research Highlights: COSPAR's planetary protection policy. *Space Research Today* 193, 7-19.
- Kranner, I., Zorn, M., Turk, B., Wornik, S., Beckett, R. P., Batič, F. (2003). Biochemical traits of lichens differing in relative desiccation tolerance. *New Phytologist* 160(1), 167-176.
- Kranner, I., Cram, W.J., Zorn, M., Wornik, S., Yoshimura, I., Stabentheiner, E., Pfeifhofer, H.W. (2005). Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(8), 3141-3146.
- Kranner, I., Beckett, R., Hochman, A., Nash III, T.H. (2008). Desiccation-tolerance in lichens: a review. *The Bryologist* 111(4), 576-593.
- Krause, G.H., Jahns, P. (2004). Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. *In Chlorophyll a Fluorescence, Springer Netherlands, 463-495.*
- Kraushaar, W.L., Clark, G.W., Garmire, G.P., Borken, R., Higbie, P., Leong, V., Thorsos, T. (1972). High-energy cosmic gamma-ray observations from the OSO-3 satellite. *Astrophysical Journal* 177, 341-363.
- Krieger, H. (2004, 2012): *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes.*
- Kvenvolden, K.A., Lawless, J.G., Ponnampereuma, C. (1971). Non-protein amino acids in the Murchison meteorite. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 68(2), 486-490.
- Lammer, H., Bredehöft, J.H., Coustenis, A., Khodachenko, M.L., Kaltenecker, L., Grasset, O., ..., Rauer, H. (2009). What makes a planet habitable? *The Astronomy and Astrophysics Review* 17(2), 181-249.

- Lange, O.L., Kappen, L. (1972). Photosynthesis of lichens from Antarctica. *In*: Llano, G.A. (Ed.) Antarctic Terrestrial Biology. American Geophysical Union., Washington, D. C., pp 83-95.
- Lange, O. L., S. C. Hahn, A. Meyer, and J. D. Tenhunen. (1998). Upland tundra in the foothills of the Brooks Range, Alaska, U.S.A.: Lichen long-term photosynthetic CO₂ uptake and net carbon gain. *Arctic and Alpine Research* 30:252–261.
- 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.
- Lawrey, J.D. (1989). Lichen secondary compounds: evidence for a correspondence between antiherbivore and antimicrobial function. *Bryologist* (92)3, 26-328.
- Leuko, S., Rothschild, L.J., Burns, B.P. (2010). Halophilic archaea and the search for extinct and extant life on Mars. *Journal of Cosmology* 5, 940-950
- Lewis, D.H. (1991). Mutualistic symbioses in the origin and evolution of land plants. *In*: Margulis, L., Fester, R. (Eds.) Symbiosis as an Evolutionary Innovation in Speciation and Morphogenesis, MIT Press, Cambridge, USA, pp 288–300.
- Longton, R.E. (1988). Studies in polar research: Biology of polar bryophytes and lichens. Cambridge University Press, Cambridge, GB.
- Lud, D., Huiskes, A.H.L., Moerdijk, T.C.W., Rozema, J. (2001). The effects of altered levels of UV-B radiation on an Antarctic grass and lichen. *In*: Rozema, J., Manetas, Y., Björn, L.O. (Eds.) Advances in vegetation science 18. Responses of plants to UV-B radiation. Springer Science and Business Media, pp 87-99.
- Lütz, C., Seidlitz, H.K., Meindl, U. (1997). Physiological and structural changes in the chloroplast of the green alga *Micrasterias denticulata* induced by UV B simulation. *Plant Ecology* 128,55-64.
- Lütz, C., Schönauer, E., Neuner, G. (2005). Physiological adaptation to early spring conditions in green overwintering leaves of some alpine plants. *Phyton* 45(3), 139–156.
- Mackerness, S.A-H., Jordan, B.R., Thomas, B. (1999). Reactive oxygen species in the regulation of photosynthetic genes by ultraviolet-B radiation (UV-B: 280–320 nm) in green and etiolated buds of pea (*Pisum sativum* L.). *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* 48 (2), 180 - 188.
- Mancinelli, R.L., White, M.R., Rothschild, L.J. (1998). Biopan-survival I: exposure of the osmophiles *Synechococcus* sp.(Nageli) and *Haloarcula* sp. to the space environment. *Advances in Space Research* 22(3), 327-334.
- Martin, W., Baross, J., Kelley, D., Russell, M.J. (2008). Hydrothermal vents and the origin of life. *Nature Reviews Microbiology* 6(11), 805-814.
- Maxwell, K., Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of experimental botany*, 51(345), 659-668.
- McEvoy, M., Solhaug, K. A., Gauslaa, Y. (2007). Solar radiation screening in usnic acid-containing cortices of the lichen *Nephroma arcticum*. *Symbiosis (Rehovot)* 43(3), 143-150.
- Meeßen, J. (2011). Erkennungsmechanismen in der Flechtensymbiose. Präkontakt-Studien und molekulare Analyse. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Meeßen, J., Sánchez, F.J., Brandt, A., Balzer, E.M., de la Torre, R., Sancho, L.G., de Vera, J.-P., Ott, S. (2013a). 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. (PUBL. 1)
- Meeßen, J., Sánchez, F. J., Sadowsky, A., de la Torre, R., Ott, S., de Vera, J.-P. (2013b). Extremotolerance and resistance of lichens: comparative studies on five species used in astrobiological research II. Secondary lichen compounds. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 43(6), 501-526.
- Meeßen, J., Backhaus, T., Brandt, A., Raguse, M., de Vera, J.-P., de la Torre, R.: STARLIFE 2: The effect of high dose ionizing radiation on the isolated photobiont of the astrobiological model lichen *Circinaria gyrosa*. *Astrobiology* (in review). (PUBL. 5)
- Melosh, H.J. (1984). Impact ejection, spallation, and the origin of meteorites. *Icarus* 59(2), 234-260.
- Meyer, C., Fritz, J., Misgaiski, M., Stoeffler, D., Artemieva, N.A., Hornemann, U., Moeller, R., de Vera, J.-P., Cockell, C.S., Horneck, G., Ott, S., Rabbow, E. (2011). Shock experiments in support of the Lithopanspermia theory: the influence of host rock composition, temperature, and shock pressure on the survival rate of endolithic and epilithic microorganisms. *Meteoritics and Planetary Science* 46(5), 701-718.
- Mileikowsky, C. (2000) Natural Transfer of Microbes in space, part I: from Mars to Earth and Earth to Mars. *Icarus* 145(2), 391-427.
- Millard, P.J., Roth, B.L., Thi, H.P., Yue, S.T., Haugland, R.P. (1997). Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 63(7), 2897-2905.
- Moeller, R., Schuerger, A.C., Reitz, G., Nicholson, W.L. (2012). Protective role of spore structural components in determining *Bacillus subtilis* spore resistance to simulated Mars surface conditions. *Applied Environmental Microbiology* 78 (24), 8849-8853.
- Moissl-Eichinger, C. (2011). Archaea in artificial environments: their presence in global spacecraft clean rooms and impact on planetary protection. *The ISME journal* 5(2), 209-219.
- Montenbruck, O., Gill, E. (2012). Satellite orbits: models, methods and applications. Springer Science & Business Media, Berlin.
- Musilova, M., Wright, G., Ward, J.M., Dartnell, L.R. (2015). Isolation of radiation-resistant bacteria from Mars analog antarctic dry valleys by preselection, and the correlation between radiation and desiccation resistance. *Astrobiology* 15(12), 1076-1090.
- NASA, Jet Propulsion Laboratory, California Institute of Technology: Exoplaneten, aktuelle Zahlen online: <http://planetquest.jpl.nasa.gov/>
- NASA, Definition Astrobiology: <https://astrobiology.nasa.gov/about-astrobiology/>
- Nash III, T.H., White, S.L., Marsh, J.E. (1977). Lichen and moss distribution and biomass in hot desert ecosystems. *The Bryologist* 80(3), 470-479.
- Nawkar, G.M., Maibam, P., Park, J.H., Sahi, V.P., Lee, S.Y., Kang, C.H. (2013). UV-induced cell death in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14(1), 1608-1628.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64(3), 548-572.
- Nicholson, W.L. (2009) Ancient micronauts: interplanetary transport of microbes by cosmic impacts. *Trends in Microbiology* 17(6) 243-250.

- Nifontova, M.G., Ravinskaya, A.P., Shapiro, I.A. (1995) Effect of acute gamma radiation on some physiological features of lichens. *Lichenologist* 27(3), 215-224.
- Nussinov, M.D., Lysenko, S.V. (1983). Cosmic vacuum prevents radiopanspermia. *Origins of life* 13(2), 153-164.
- Nybakken, L., Solhaug, K. A., Bilger, W., Gauslaa, Y. (2004). The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats. *Oecologia* 140(2), 211-216.
- Obermayer, W., Poelt, J. (1992). Contributions to the knowledge of the lichen flora of the Himalayas III. On *Lecanora somervellii* Paulson (Lichenized Ascomycotina, *Lecanoraceae*). *The Lichenologist* 24(2), 111-117.
- Onofri, S., de la Torre, R., de Vera, J.-P., Ott, S., Zucconi, L., Selbmann, L., Scalzi, G., Vanakateswaran, K.J., Rabbow, E., Sánchez Iñigo, F.J., Horneck, G. (2012). Survival of rock-colonizing organisms after 1.5 years in outer space. *Astrobiology* 12(5), 508-516.
- Ortega-Retuerta, E., Passow, U., Duarte, C.M., Reche, I. (2009). Effects of ultraviolet B radiation on (not so) transparent exopolymer particles. *Biogeoscience Discussions* 6, 7599-7625
- Øvstedal, D.O., Lewis Smith, R.I. (2001). Lichens of Antarctica and South Georgia: a guide to their identification and ecology. Cambridge University Press, Cambridge, pp 66-365.
- Palmer Jr, R.J., Friedmann, E.I. (1990). Water relations and photosynthesis in the cryptoendolithic microbial habitat of hot and cold deserts. *Microbial Ecology* 19(1), 111-118.
- Perez-Ortega, S., Ortiz-Álvarez, R., Green, T.A., de los Rios, A. (2012). Lichen myco- and photobiont diversity and their relationships at the edge of life (McMurdo Dry Valleys, Antarctica). *FEMS Microbiology Ecology* 82(2), 429-448.
- Persson, D., Halberg, K.A., Jørgensen, A., Ricci, C., Møbjerg, N., Kristensen, R.M. (2011). Extreme stress tolerance in tardigrades: surviving space conditions in low earth orbit. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 49(s1), 90-97.
- Rabbow, E., Rettberg, P., Barczyk, S., Bohmeier, M., Parpart, A., Panitz, C., Horneck, G., von Heise-Rotenburg, R., Hoppenbrouwers, T., Willnecker, R., Baglioni, P., Demets, R., Dettmann, J., Reitz, G. (2012). EXPOSE-E: an ESA astrobiology mission 1.5 years in space. *Astrobiology* 12(5), 374-386.
- Raggio, J., Pintado, A., Ascaso, C., de la Torre, R., de los Ríos, A., Wierzchos, J., ..., Sancho, L.G. (2011). Whole lichen thalli survive exposure to space conditions: results of Lithopanspermia experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* 11(4), 281-292.
- Rassow, J. (1980). Physikalisch-methodische Grundlagen der Strahlentherapie. In: Scherer, E. (Ed.) Strahlentherapie. Radiologische Onkologie. 2. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Ravanat, J.L., Douki, T., Cadet, J. (2001) Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 63(1), 88-102.
- Rebecchi, L., Altiero, T., Guidetti, R. (2007). Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance. *Invertebrate Survival Journal* 4, 65-81.
- RedShift Report (2011). van Bavinchove, C., Beuselinck, T. (Reviewers) EXPOSE: Environmental history by calculation - EXPOSE-E simulation results. Ref: EXP-RP-017-RS ISS. A(2). RedShift Design and Engineering BVBA (125 pp).

- Reitz, G. (2008). Characteristic of the radiation field in low Earth orbit and in deep space. *Zeitschrift für Medizinische Physik* 18(4), 233-243.
- Reitz, G., Berger, T., Hajek, M., Burmeister, S., Labrenz, J., Pálfalvi, J.K., Kató, Z., Bilski, P., Puchalska, M., Sihver, L., Hager, L., Tanner, R. (2011). Human model MATROSHKA for radiation exposure determination of astronauts. In: "Let's embrace space - Space Research achievements under the 7th Framework Programme" European Commission, DG Enterprise and Industry; European Union, Brussels, pp 300-310.
- Rettberg, P., Horneck, G., Strauch, W., Facius, R., Seckmeyer, G. (1998). Simulation of planetary UV radiation climate on the example of the early Earth. *Advances in Space Research* 22(3), 335-339.
- Rettberg, P., Rothschild, L. J. (2002). Ultraviolet radiation in planetary atmospheres and biological implications. In: Horneck, G., Baumstark-Khan, C. (Eds.) *Astrobiology: the quest for the conditions of life*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 233-243.
- Riley, P.A. (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International journal of radiation biology* 65(1), 27-33.
- Rundel, P. W. (1978). The ecological role of secondary lichen substances. *Biochemical Systematics and Ecology* 6(3), 157-170.
- Sadowsky, A., Ott, S. (2012). Photosynthetic symbionts in Antarctic terrestrial ecosystems: the physiological response of lichen photobionts to drought and cold. *Symbiosis* 58(1-3), 81-90.
- Sánchez, F.J., Mateo-Martí, E., Raggio, J., Meeßen, J., Martínez-Frías, J., Sancho, L. G., Ott, S., de la Torre, R. (2012). The resistance of the lichen *Circinaria gyrosa* (nom. provis.) towards simulated Mars conditions - a model test for the survival capacity of an eukaryotic extremophile. *Planetary and Space Science* 72(1), 102-110.
- Sánchez, F.J., Meeßen, J., Ruiz, M.G., Sancho, L., Ott, S., Vílchez, C., Horneck, G., Sadowsky, A., de la Torre, R. (2014). UV-C tolerance of symbiotic *Trebouxia* sp. in the space-tested lichen species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: role of the hydration state and cortex/screening substances. *International Journal of Astrobiology* 13(1), 1-18.
- Sancho, L.G., de la Torre, R., Horneck, G., Ascaso, C., de los Rios, A., Pintado, A., ..., Schuster, M. (2007). Lichens survive in space: results from the 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology* 7(3), 443-454.
- Scalzi, G., Selbmann, L., Zucconi, L., Rabbow, E., Horneck, G., Albertano, P., Onofri, S. (2012). LIFE Experiment: isolation of cryptoendolithic organisms from Antarctic colonized sandstone exposed to space and simulated Mars conditions on the International Space Station. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* 42(2), 253-262
- Scheidegger, C., Schroeter, B., Frey, B. (1995). Structural and functional processes during water vapour uptake and desiccation in selected lichens with green algal photobionts. *Planta* 197(2), 399-409.
- 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 (2), 273-285.
- Schuster, G., Ott, S., Jahns, H. M. (1985). Artificial cultures of lichens in the natural environment. *Lichenologist* 17(3), 247-253.

- Selbmann, L., De Hoog, G.S., Mazzaglia, A., Friedmann, E.I., Onofri, S. (2005). Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. *Studies in Mycology* 51, 1-32.
- Sinha, R. P., Häder, D.P. (2002). UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences* 1(4), 225-236.
- Shikazono, N., Noguchi, M., Fujii, K., Urushibara, A., Yokoya, A. (2009). The yield, processing, and biological consequences of clustered DNA damage induced by ionizing radiation. *Journal of radiation research* 50(1), 27-36.
- Shuster, D.L., Weiss, B.P. (2005). Martian surface paleo-temperatures from thermo-chronology of meteorites. *Science* 309(5734), 594–600.
- Shields, L. M., Rickard, W. H. (1961). A preliminary evaluation of radiation effects at the Nevada test site. *In: Recent Advances in Botany*, University of Toronto Press New York, 1387-1390.
- Sigfridsson, B., Oquist, G. (1980). Preferential distribution of excitation energy into photosystem I of desiccated samples of the lichen *Cladonia impexa* and the isolated lichen-alga *Trebouxia pyriformis*. *Physiologia Plantarum*, 49(4), 329-335.
- Solhaug, K.A., Gauslaa, Y. (1996). Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina*. *Oecologia*, 108(3), 412-418.
- Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., Nybakken, L., Bilger, W. (2003). UV-induction of sun-screening pigments in lichens. *New Phytologist* 158(1), 91–100.
- Solhaug, K.A., Gauslaa, Y. (2004). Photosynthates stimulate the UV-B induced fungal anthraquinone synthesis in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. *Plant, Cell & Environment* 27(2), 167-176.
- Solhaug, K.A., Larsson, P., Gauslaa, Y. (2010). Light screening in lichen cortices can be quantified by chlorophyll fluorescence techniques for both reflecting and absorbing pigments. *Planta* 231(5),1003–1011.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., Cohen Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular bluegreen algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Reviews* 35(2), 171-205.
- Stöffler, D., Horneck, G., Ott, S., Hornemann, U., Cockell, C.S., Moeller, R., ..., Artemieva, N.A. (2007). Experimental evidence for the potential impact ejection of viable microorganisms from Mars and Mars-like planets. *Icarus* 186(2), 585-588.
- Thomson, W. (1871). Presidential address to the British Association for the Advancement of Science. *Nature* 4, 262-270.
- Thwaites, D.I. (1983). Bragg's rule of stopping power additivity: a compilation and summary of results. *Radiation Research* 95(3), 495-518.
- Vaishampayan, P.A., Rabbow, E., Horneck, G., Venkateswaran, K.J. (2012). Survival of *Bacillus pumilus* spores for a prolonged period of time in real space conditions. *Astrobiology* 12(5), 487-497.
- Vass, I. (1997). Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus. *In: Pessaraki, M. (Ed.), Handbook of Photosynthesis*. Dekker, New York, pp 931–949.
- Verter, F. (1982). Cosmic gamma-ray bursts. *Physics Reports* 81(4), 293-349.

- Wassmann, M., Moeller, R., Rabbow, E., Panitz, C., Horneck, G., Reitz, G., ... , Rettberg, P. (2012). Survival of spores of the UV-resistant *Bacillus subtilis* strain MW01 after exposure to low-Earth orbit and simulated martian conditions: data from the space experiment ADAPT on EXPOSE-E. *Astrobiology* 12(5), 498-507.
- Wieners, P.C., Mudimu, O., Bilger, W. (2012). Desiccation-induced nonradiative dissipation in isolated green lichen algae. *Photosynthesis Research* 113(1), 239-247.
- Woodwell, G.M., Gannutz, T.P. (1967). Effects of chronic gamma irradiation on lichen communities of a forest. *American Journal of Botany* 54(10), 1210-1215.
- Wynn-Williams, D.D., Edwards, H.G.M., Newton, E.M. Holder, J.M. (2002). Pigmentation as a survival strategy for ancient and modern photosynthetic microbes under high ultraviolet stress on planetary surfaces. *International Journal of Astrobiology* 1(1), 39-49.
- Ziegler, J.F., Biersack, J.P. (1985). The stopping and range of ions in matter. In: (Bromley, A. (Ed) *Treatise on Heavy-Ion Science*, Springer US. pp 93-129.
- Ziegler, J.F., Ziegler, M.D., Biersack, J.P. (2010). SRIM–The stopping and range of ions in matter (2010). *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 268(11), 1818-1823.
- Yuan, X., Xiao, S., Taylor, T. N. (2005). Lichen-like symbiosis 600 million years ago. *Science* 308(5724):1017-1020.
- Zahnle, K., Arndt, N., Cockell, C., Halliday, A., Nisbet, E., Selsis, F., Sleep, N.H. (2007). Emergence of a habitable planet. In: Fishbaugh, K.E., Lognonné, P., Raulin, F., des Marais, D.J., Korablev, O. (Eds.) *Geology and Habitability of Terrestrial planets*, Springer New York, pp 35-78.
- Zhdanova, N.N., Zakharchenko, V.A., Vember, V.V., Nakonechnaya, L.T. (2000). Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycological Research* 104(12), 1421-1426.

4.2 Bildtafeln

Metabolische Aktivität von *X. elegans* nach der Exposition auf der ISS

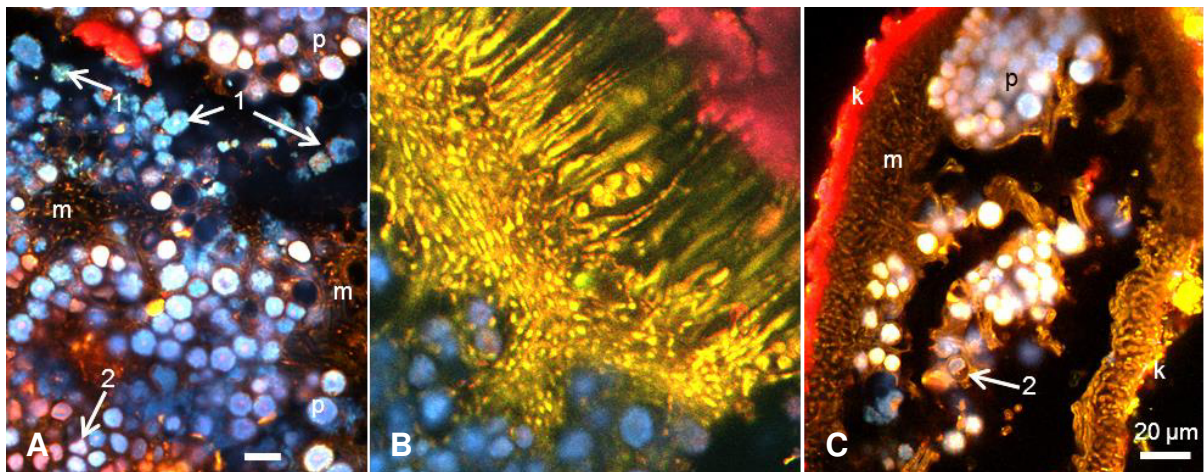


Abb. A1.1: Metabolische Aktivität von *X. elegans* nach Exposition auf der ISS unter Vakuum und 291 MJ/m² UV. CLSM Aufnahmen, LIVE/DEAD staining mit FUN-1®. Rotes/leuchtend gelbes Signal von metabolisch aktiven PB/MB, grünes Signal von metabolisch inaktiven PB/MB. Blau dargestellt ist die Chlorophyll-Autofluoreszenz, der parietinhalte Cortex fluoresziert intensiv rot. Maßstabsbalken entsprechen 20 µm. **p** Photobionten, **m** Mycobionten, **s** Sporen, **k** Cortex

A Aktive PB und MB in der Algenschicht, inaktive und deformierte PB (Pfeil 1), metabolisch aktive, jedoch deformierte PB (Pfeil 2), die als beschädigt angesehen werden können.

B Apothecium, kompakte Struktur aus metabolisch aktiven MB.

C Thalluslobe, PB im Inneren aktiv, PB-Cluster im oberen Drittel des Bildes.

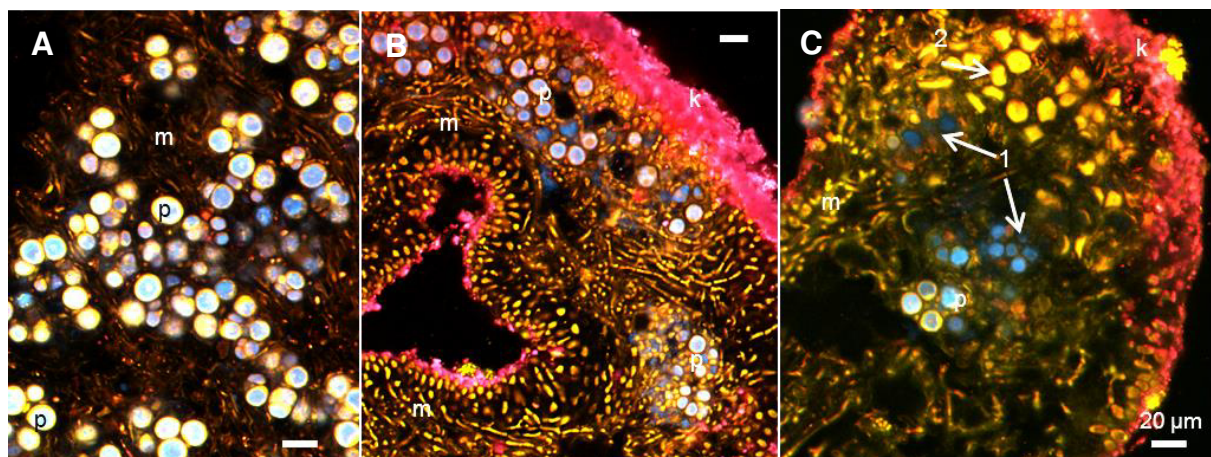


Abb. A1.2: Metabolische Aktivität von *X. elegans* nach Exposition auf der ISS unter Mars-analogen Bedingungen. CLSM Aufnahmen, LIVE/DEAD staining mit FUN-1®. Rotes/leuchtend gelbes Signal von metabolisch aktiven PB/MB, grünes Signal von metabolisch inaktiven PB/MB. Blau dargestellt ist die Chlorophyll-Autofluoreszenz, der parietinhalte Cortex fluoresziert intensiv rot. Maßstabsbalken entsprechen 20 µm. **p** Photobionten, **m** Mycobionten, **s** Sporen, **k** Cortex

A Metabolisch aktive PB und MB unterhalb eines Apotheciums, nach Exposition ohne Einstrahlung.

B Thallus mit oberem und unterem Cortex, hohe metabolische Aktivität. Exposition ohne Einstrahlung.

C Thalluslobe, PB im Inneren aktiv; inaktivierte PB (Pfeil 1), PB-Cluster, degenerierte PB (Pfeil 2), die auch in unbehandelten Proben auftreten, wahrscheinlich im Rahmen eines normalen Thalluswachstums mit Bildung einer epinekralen Schicht aus Zellüberresten.

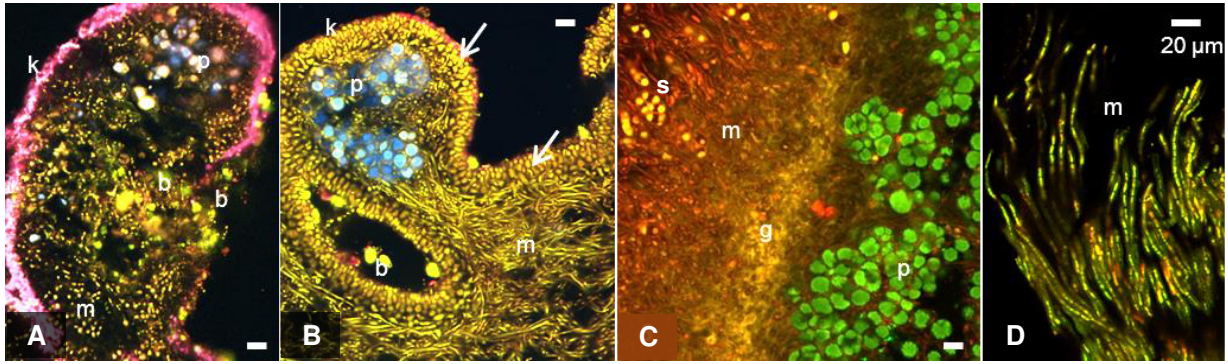


Abb. A1.3: Metabolische Aktivität von *X. elegans*, CLSM Aufnahmen, LIVE/DEAD staining mit FUN-1®. Rotes/leuchtend gelbes Signal von metabolisch aktiven PB/MB, grünes Signal von metabolisch inaktiven PB/MB. Blau (A, B) dargestellt ist die Chlorophyll-Autofluoreszenz, der parietinhaltige Cortex fluoresziert intensiv rot. Maßstabsbalken entsprechen 20 µm. **p** Photobionten, **m** Mycobionten, **s** Sporen, **k** Cortex, **g** Gallerte, **b** Bakterien

A MGR, Mars-analog, ohne Einstrahlung; Thalluslobe mit metabolisch aktiven PB/MB, Bakterien besiedeln den unteren Cortex.

B Thallus nach 14 Tagen unter Vakuum (10^{-5} Pa; EVT). Keine deformierten PB nach kurzzeitiger Vakuum-Exposition. Gut erkennbar ist die perikline Hyphenschicht unterhalb des Cortexes (Pfeil).

C Kontrolle nach 30 min. Farbstoff-Inkubation. Apothecium mit Sporen, Hyphen mit Gallerte. Die PB haben den Fluoreszenzfarbstoff noch nicht metabolisiert und stellen sich daher grün dar.

D Myzelium, nicht lichenisierter *X. elegans* MB, Vakuum (wie B), metabolisch aktive Hyphenabschnitte während der Farbstoff-Inkubation

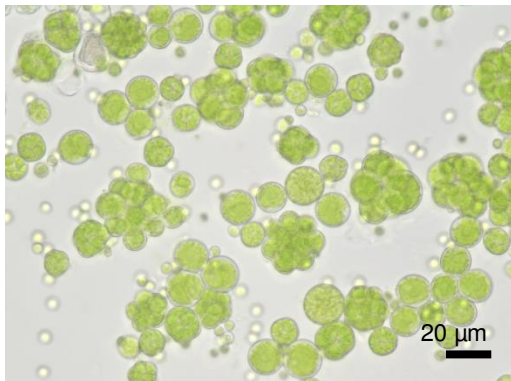


Abb. A2.1: Lichtmikroskopische Aufnahme. Teilungsaktive Photobionten aus der Kultur nach Exposition auf der ISS unter *low-Earth-orbit* Vakuum und voller Einstrahlung (mit 291 MJ/m^2 UV-Anteil/18 Monate)

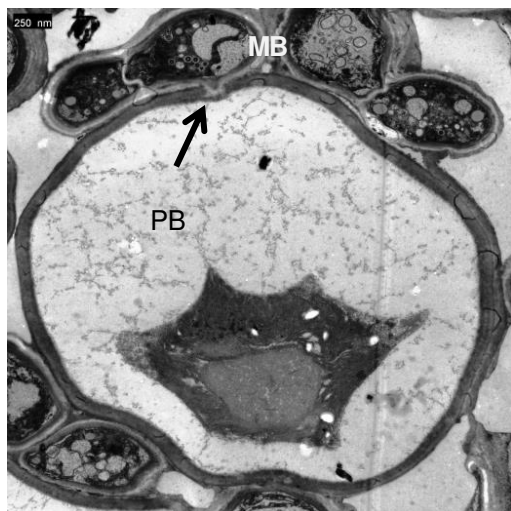


Abb. A2.2: REM-Aufnahme. *X. elegans*, Photobiont mit kollabiertem Protoplasten umgeben von strukturell intakten Hyphen (MB). Haustorien, die den symbiotische Kontakt zwischen MB und PB darstellen, wurden nicht durch die Exposition unter *low-Earth-orbit* Vakuum auf der ISS gelöst (Pfeil).

MB

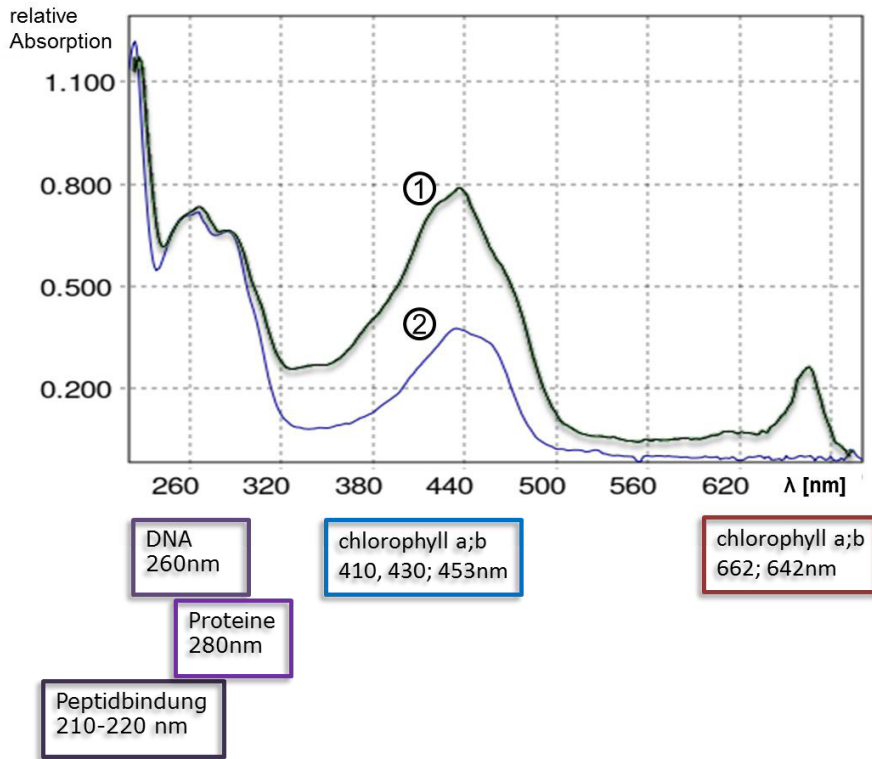


Abb. A3: UV/VIS-Absorptionsspektrum von Parietin-Extrakten aus *Xanthoria elegans*

(Biospektrometer, Eppendorf)

Graph 1: Parietin und co-extrahiertes Chlorophyll (Flechtenextrakt, roh, in Ethanol resuspendiert)

Graph 2: Parietin (pur, in Ethanol)

Kästen: Absorptionsmaxima der Makromoleküle

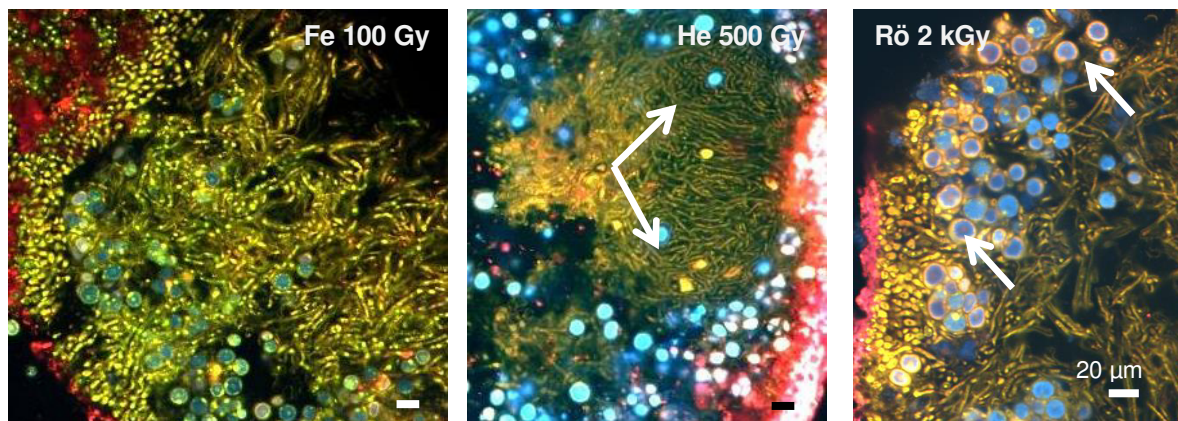


Abb. A4: Metabolische Aktivität von *X. elegans* nach ionisierender Strahlung

CLSM, gefärbt mit FUN-1®. Rotes/leuchtend gelbes Signal von metabolisch aktiven PB/MB, grünes Signal von metabolisch inaktiven Zellen, blau dargestellt ist die Autofluoreszenz des Chlorophylls, der parietinhaltige Cortex fluoresziert rot. Maßstabsbalken entsprechen 20 µm.

Fe 100 Gy: Signale von metabolisch aktiven und inaktiven PB und MB sind über den Thallus verteilt, wobei von 100 Gy bis 2 kGy die Reduktion der metabolischen Aktivität nicht Dosis zur korrelierte.

He 500 Gy: Kompakte metabolisch inaktive Struktur nach He-Bestrahlung (Pfeile).

Rö 2 kGy: Metabolisch aktive MB an der Oberseite des Thallus (gelb-orange), inaktive MB im Inneren (grün); zahlreiche metabolisch aktive PB (Pfeile) nach 2000 Gy Röntgenstrahlung. Die PB zeigen ebenfalls kein (räumliches) Verteilungsmuster von metabolisch aktiven/inaktiven Zellen.

Kulturassay nach 1000 und 2000 Gy Röntgenbestrahlung (STARLIFE I)

Beide Symbionten wurden gemeinsam präpariert und auf TOM1% Agar kultiviert, wobei sofort, nach 14 Tagen und nach 8 Wochen eine photographische Dokumentation (Binokular Wild, Axio Imager A1) definierter Messareale und eine Fluoreszenz-Aufnahme (FluorCam) erfolgten.

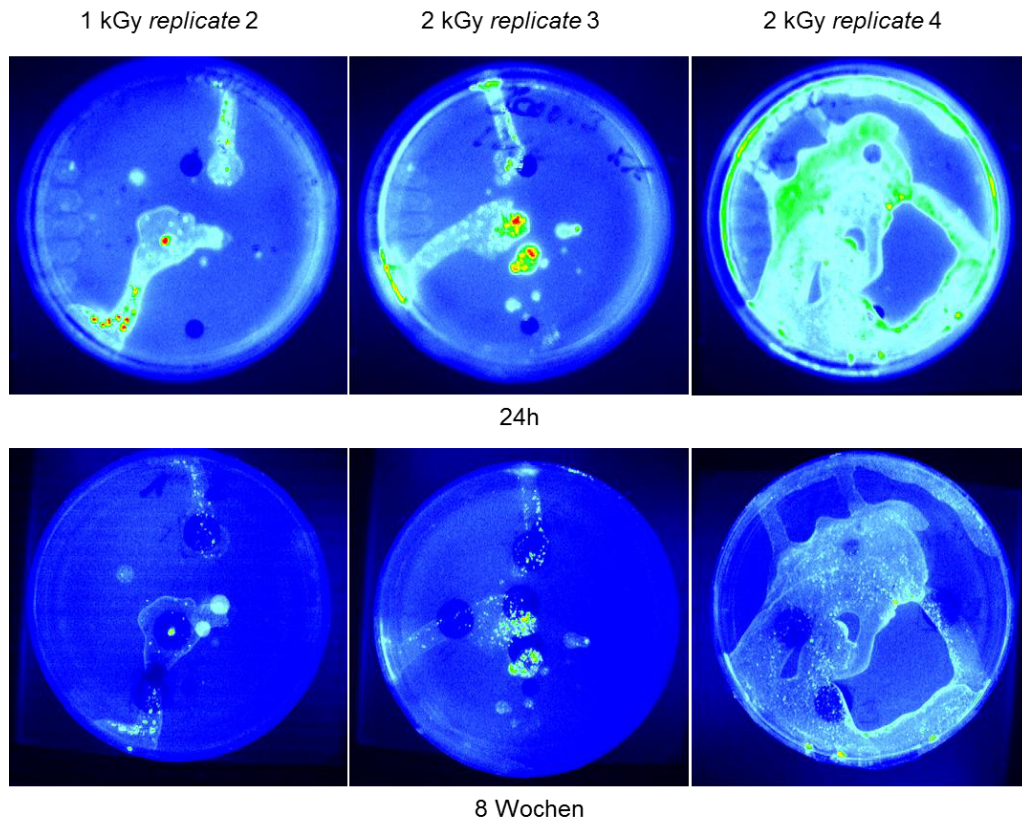


Abb. A5.1: Chlorophyll-Fluoreszenz der Kulturen (FluorCam, Photon Systems Instruments)
Die 24 h nach Anlegen der Kultur detektierbare Chlorophyll-Fluoreszenz (obere Reihe) nimmt über die Kulturdauer von 8 Wochen dramatisch ab (untere Reihe).

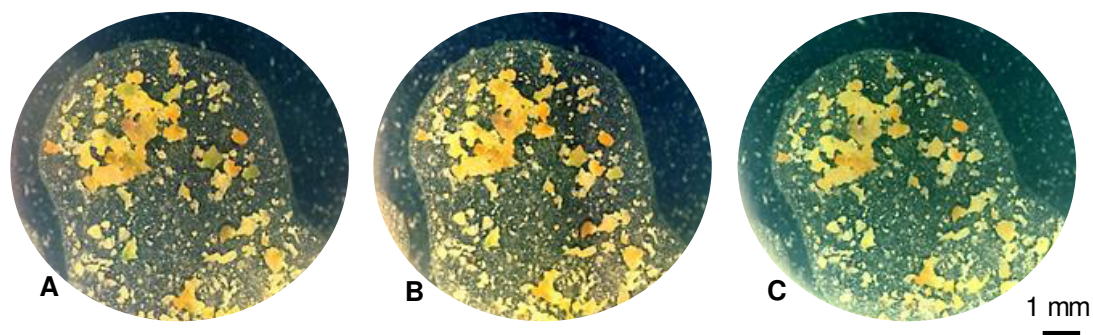


Abb. A5.2: Kulturassay mit präparierten Thallusfragmenten von *Xanthoria elegans* nach 2 kGy Röntgenbestrahlung; Dokumentation eines definierten Messbereiches.
Aufnahmen: **A** nach 4 Tagen, **B** nach 14 Tagen **C** nach 8 Wochen Kulturdauer. Beide Symbionten zeigten kein Wachstum. Die grün gefärbten Algencluster bleichen über die Kulturzeit aus, als optisch wahrnehmbares Zeichen der Chlorophyll-Degeneration (s. auch PUBL. 5).

5. Publikationen

5.1. Extremotolerance and resistance of lichens: Comparative studies on five species used in astrobiological research I. Morphological and anatomical characteristics

J. Meeßen, F. J. Sánchez , A. Brandt, E.-M. Balzer, R. de la Torre, L. G. Sancho, J.-P. de Vera & S. Ott

Origins of Life and Evolution of Biospheres (2013): 43, 283-303

Impact Factor 1,765 (2013)

30% der Labortätigkeit für diesen Artikel wurden als Teil der vorliegenden Dissertation vom 3. Autor durchgeführt.

Extremotolerance and Resistance of Lichens: Comparative Studies on Five Species Used in Astrobiological Research I. Morphological and Anatomical Characteristics

J. Meeßen · F. J. Sánchez · A. Brandt · E.-M. Balzer ·
R. de la Torre · L. G. Sancho · J.-P. de Vera · S. Ott

Received: 1 February 2013 / Accepted: 26 March 2013 /
Published online: 20 July 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract Lichens are symbioses of two organisms, a fungal mycobiont and a photoautotrophic photobiont. In nature, many lichens tolerate extreme environmental conditions and thus became valuable models in astrobiological research to fathom biological resistance towards non-terrestrial conditions; including space exposure, hypervelocity impact simulations as well as space and Martian parameter simulations. All studies demonstrated the high resistance towards non-terrestrial abiotic factors of selected extremotolerant lichens. Besides other adaptations, this study focuses on the morphological and anatomical traits by comparing five lichen species—*Circinaria gyrosa*, *Rhizocarpon geographicum*, *Xanthoria elegans*, *Buellia frigida*, *Pleopsidium chlorophanum*—used in present-day astrobiological research. Detailed investigation of thallus organization by microscopy methods allows to study the effect of morphology on lichen resistance and forms a basis for interpreting data of recent and future experiments. All investigated lichens reveal a common heteromerous thallus structure but diverging sets of morphological-anatomical traits, as intra-/extra-thalline mucilage matrices, cortices, algal arrangements, and hyphal strands. In *B. frigida*, *R. geographicum*, and *X. elegans* the combination of pigmented cortex, algal arrangement, and mucilage seems to enhance resistance, while subcortex and algal clustering seem to be crucial in *C. gyrosa*, as well as pigmented cortices and basal thallus protrusions in *P. chlorophanum*. Thus, generalizations

J. Meeßen (✉) · A. Brandt · E.-M. Balzer · S. Ott
Institut für Botanik, Heinrich-Heine Universität (HHU), Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany
e-mail: joachimmeessen@gmx.de

F. J. Sánchez · R. de la Torre
Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial (INTA), Ctra. de Ajalvir km. 4, Torrejón de Ardoz,
28850 Madrid, Spain

L. G. Sancho
Departamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia,
Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain

J.-P. de Vera
Institut für Planetenforschung, Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR),
Rutherfordstraße 2, 12489 Berlin, Germany

on morphologically conferred resistance have to be avoided. Such differences might reflect the diverging evolutionary histories and are advantageous by adapting lichens to prevalent abiotic stressors. The peculiar lichen morphology demonstrates its remarkable stake in resisting extreme terrestrial conditions and may explain the high resistance of lichens found in astrobiological research.

Keywords *Buellia frigida* · *Circinaria gyrosa* · Lichen morphology · Lichen anatomy · Extremotolerance · BIOMEX

Abbreviations

CLSM	Confocal laser scanning microscopy
EPS	Extracellular polymeric substances
LEO	Low Earth orbit
LTSEM	Low temperature scanning electron microscopy
PAR	Photosynthetically active radiation (400–700 nm)
PSII	Photosystem II
SEM	Scanning electron microscopy
SLC	Secondary lichen compound
UVR	Ultra-violet radiation (100–400 nm)

Introduction

Since the millennium lichens became valuable model organisms in astrobiological research (Sancho et al. 2008). Remarkable progress to fathom their limits and limitations in resisting harsh environmental conditions was made in recent experimental approaches. This includes space exposure experiments as LICHENS II on BIOPAN 5/FOTON M2, LITHOPANSPERMIA and STONE on BIOPAN6/FOTON M3, and LIFE on EXPOSE-E/EuTEF (Sancho et al. 2007; de la Torre et al. 2007, 2010a; de Vera 2012; Raggio et al. 2011; Onofri et al. 2012; Scalzi et al. 2012) and experiments simulating various space conditions such as vacuum and UVR, (de Vera et al. 2003, 2004a, b, 2007, 2008, 2010; de la Torre et al. 2002, 2004, 2007, 2010a, b; Sánchez et al. 2012) as well as hypervelocity impacts (Stöffler et al. 2007; Horneck et al. 2008; de Vera and Ott 2010). An overview of previous astrobiological studies on lichens is given in Table 1. All experiments demonstrated high resistance towards space and Martian environmental parameters of those lichens that are adapted to harsh abiotic factors in their natural habitat. Furthermore, in April 2014 two lichen species will be exposed to LEO-space conditions and on-board simulated Mars conditions for 15 to 18 months during the BIOMEX-experiment on EXPOSE-R2/Zvezda (ESA call ILSRA-AO 2009). The viability after exposure was assessed by various methods, as determination of photosynthetic activity by chlorophyll- α -fluorescence of PSII and by light dependent gas exchange analyses, live/dead-staining of both symbionts utilizing CLSM (apoplastic as well as eusymbiotic), LTSEM, cultivation experiments and germination capacity analyses of the fungal spores (see references above).

Lichens are symbiotic associations formed by two organisms, the heterotrophic fungal partner (mycobiont) and the photoautotrophic partner (photobiont) which is an eukaryotic green alga or a prokaryotic cyanobacterium. Many lichens tolerate extreme environmental conditions, such as scarcity of soil substratum and nutrients, high levels of (toxic) metal ions (review by Bačkor and Fahselt 2008), cold and long-term snow coverage (Kappen 1993; Dyer and Crittenden 2008), heat, intensive insolation with high levels of UVR (Lange 1992; Nybakken et al. 2004), low water availability, infrequent water supply and extreme drought

Table 1 Overview of past and recent astrobiological investigations on lichens

Experiment	Lichen	Facility	Duration	Tested parameters or exposure conditions	Viability analysis	Reference
Lichens I	<i>R. geographicum</i> , <i>X. elegans</i>	BIOPAN 4/ FOTON M1	short	several samples recovered after explosion during launch	PSII activity	de la Torre et al. 2004
Lichens II	<i>R. geographicum</i> , <i>X. elegans</i>	BIOPAN 5/ FOTON M2	16 d	space exposure, $\lambda > 110$, >200 , >290 , >400 nm, (UVA + UVB at 2.2×10^4 kJ m $^{-2}$)	PSII activity, LTSEM	Sancho et al. 2007; Sancho et al. 2008
Lithopanspermia	<i>C. gyrosa</i> , <i>R. geographicum</i> , <i>X. elegans</i>	BIOPAN 6/ FOTON M3	10 d	space exposure, $\lambda > 110$, >200 , >290 , >400 nm	PSII activity, LTSEM, light dependent gas exchange analysis	de la Torre et al. 2010a; Raggio et al. 2011
Stone	<i>R. geographicum</i> ,	BIOPAN 6/ FOTON M3	10 d	space exposure, followed by atmospheric re-entry	samples totally destroyed during re-entry	de la Torre et al. 2010a
Life	<i>R. geographicum</i> , <i>X. elegans</i>	EXPOSE-E/ EuTEF	559 d	LEO temp. + irradiation (>110 nm, 7×10^3 – 5×10^6 kJ m $^{-2}$), UV (200–400 nm, 9.2×10^2 – 6.3×10^5 kJ m $^{-2}$), GCR (≤ 190 mGy), vac. (10^{-4} – 10^{-7} Pa) or Mars atm. (100 % CO $_2$, 7 mbar)	Life/Dead staining (FunI, Bac Light), PSII activity, fxSEM, TEM, biont growth assays, photoproducts	Onofri et al. 2012; Scalzi et al. 2012, analysis in progress
Biomex	<i>B. frigida</i> , <i>C. gyrosa</i>	EXPOSE-R2/ Zvezda	12–18 months	LEO temp. + irradiation (>190 nm, up to 8×10^5 kJ m $^{-2}$), vac. (10^{-4} – 10^{-7} Pa) or Mars atm. (100 % CO $_2$, 7 mbar, 100 % rH)	Life/Dead staining (FunI, Bac Light), PSII activity, fxSEM, TEM, LTSEM, biont growths assays,	scheduled 2014–2015, EVT, SVT in progress
Simulation	<i>F. bracteata</i> , <i>X. elegans</i> , <i>X. parietina</i>	Space Sim. Test Beds, DLR Cologne	4, 8, 16 h	1) vac. (10^{-5} Pa), 2) UV (160–400 nm, $2.8+8.8+0.7$ W m $^{-2}$, 3) vac. + UV (10^{-5} Pa, 160–400 nm, $2.8+8.8+0.7$ W m $^{-2}$)	Life/Dead staining (FunI, Sytox Green), ascospore germination rate	de Vera et al. 2003; de Vera et al. 2004a
Simulation	<i>F. bracteata</i> , <i>X. elegans</i>	Space Sim. Test Beds, DLR Cologne	1, 5, 15, 30 min, 1, 2, 4, 8, 16 h	1) vac. (10^{-5} Pa), 2) UV (200–400 nm; 40, 466, 3,347 kJ m $^{-2}$) 3) vac. + UV (10^{-5} Pa), 200–400 nm; 40, 466, 3,347 kJ m $^{-2}$) 4) vac. + UV (10^{-3} Pa, 160–400 nm, 8.1 W m $^{-2}$)	Life/Dead staining (FunI, Sytox Green), ascospore germination rate	de Vera et al. 2004b
Simulation	<i>B. frigida</i> , <i>P. aphthosa</i>	Space Sim. Test Beds, DLR Cologne	5, 15, 30, 60, 120, 240, 480 min	UVC (254 nm, 2.1–201.8 J m $^{-2}$)	Life/Dead staining (FunI, Sytox Green)	de Vera and Ott 2010

Table 1 (continued)

Experiment	Lichen	Facility	Duration	Tested parameters or exposure conditions	Viability analysis	Reference
Simulation	<i>X. elegans</i>	Space Sim. Test Beds, DLR Cologne	5 min, 2, 4, 8, 16 h	vac. (2.8×10^{-1} – 3.6×10^{-5} Pa) and UV (200–400 nm, 2.8 W m^{-2})	Life/Dead staining (FunL, Sytox Green), biont growths assays	de Vera et al. 2008
Simulation	<i>X. elegans</i>	HUMIDITY LAB, DLR Berlin	22 d (1), 1 d (2–4)	1) Mars atm. (95 % CO ₂ , 6 mbar, 100 % rH, –55–+20 °C) 2) Mars atm. (95 % CO ₂ , 6 mbar, 100 % rH, +15 °C) 3) Mars atm. (95 % CO ₂ , 6 mbar, 100 % rH, –+5 °C) 4) Earth atm. (100 % rH, +15 °C)	PSII activity, Life/Dead staining (FunL)	de Vera et al. 2007; de Vera et al. 2010
Simulation	<i>X. elegans</i>	Shock Recovery Exp., EMI Freiburg	< 1 min	hypervelocity impact simulations 5, 10, 15, 20, 30, 41.5, and 50 GPa)	Life/Dead staining (FunL, Sytox Green)	Stöffler et al. 2007; Horneck et al. 2008
Simulation	<i>P. chlorophanum</i>	Mars Sim. Chamber, DLR Berlin	35 d	Mars radiation (200–2,500 nm, 2.7×10^2 – $6.3 \times 10^3 \text{ kJ m}^{-2}$), Mars atm. (95 % CO ₂ , 6 mbar, –49–+25 °C, 0–80 % rH)	PSII activity	de Vera et al. 2012
Simulation	<i>R. geographicum</i> , <i>X. elegans</i>	BIOPAN Sim. Test, INTA Madrid	10, 20 h	1) UV + VIS + NIR (200–900 nm) 2) vacuum + UV + VIS + NIR (3.0×10^{-7} bar, 200–900 nm)	PSII activity	de la Torre et al. 2004
Simulation	<i>C. gyrosa</i>	PASC at CAB, INTA-CSIC Madrid	120 h	1) Mars UV (200–400 nm, 30 mW cm ⁻²), –93 °C 2) Mars atm. (95 % CO ₂ , 0.6 % H ₂ O, 7 mbar), –93 °C 3) Mars UV (200–400 nm, 30 mW cm ⁻²), vac. (10^{-6} bar), –93 °C	PSII activity, light dependent gas exchange analysis	Sánchez et al. 2012

as observed in cold and hot deserts like the dry valleys in continental Antarctica (Marchant and Head 2007; Harańczyk et al. 2008; Sun et al. 2010) and the Andean Atacama Desert (McKay et al. 2003).

Several adaptive strategies are discussed to contribute to the resistance of lichens towards extreme environmental conditions and therefore they are of interest for astrobiological research. Among other factors, such as the photobiont's capacity to protect its photosynthetic apparatus during and regenerate it after stressful conditions (e. g. drought and cold, Sadowsky et al. 2012), three aspects constituting the extremophile character of many lichen species should be highlighted: the first one is the poikilohydric nature of lichens. Poikilohydry allows lichens to tolerate extreme desiccation—but also high UVR/PAR-levels (Nybakken et al. 2004) and high or low temperatures that may accompany drought—by passing into an ametabolic state which is referred to as anabiosis or, more specifically, anhydrobiosis (Kranner et al. 2005). Re-hydration activates the lichen metabolism, what usually occurs under more moderate and therefore physiologically favourable conditions. It is known that morphological properties affect thallus water-uptake and water-retention, which influence the duration of physiological activity (refer to Lange et al. 1999). A second aspect is the vast variety of secondary lichen compounds (SLCs) formed in high amounts almost exclusively in the symbiotic state (Henssen and Jahns 1974). They cause PAR- and UVR-shielding by absorption (Solhaug and Gauslaa 1996; Huneck and Yoshimura 1996; Solhaug and Gauslaa 2004; Mc Evoy et al. 2006) and are proposed to protect particularly the photobiont.

The present study focuses on a third aspect: the morphological and anatomical traits that shape a lichen thallus and adapt it to the habitat's dominant (micro)climatic and orographic factors. As all fungi, mycobionts are modular organisms (Carlile 1995) characterized by poor differentiation of cell types and plectenchymatic tissues; the photobiont cells show no differentiation. The low degree of functional cell differentiation is compensated on the next higher level of organismic organization by an intriguing complexity of lichen morphology. This is displayed by various growth types (e. g. crustose, placoid, foliose, fruticose, umbilicate) as well as functional morpho-anatomical structures (e.g. heteromerous thallus stratification, pseudocyphellae, rhizines, cephalodia, and reproductive structures as apothecia, perithecia, pycnidia, soredia, and isidia). Valuable introduction into lichen morphology is provided by Jahns (1988) or Büdel and Scheidegger (1996) while the link between morphological traits and their adaptive or eco-physiological significance is still an issue of vivid debate in lichenology. Variation of morphological and anatomical traits unquestionably represents lichen adaptation to the environmental conditions of the respective ecological niche (Jahns 1988; Büdel and Scheidegger 1996). Such traits directly influence major physiological aspects of the lichen's biology as effectiveness of photosynthesis, nutrient uptake, nutrient distribution, gas exchange, but also water uptake and water retention which are fundamental aspects of the poikilohydric life strategy (Lange et al. 2001). Consequently, morphology and anatomy are crucial factors in understanding the extremotolerance of many lichen species.

To date, astrobiological studies were performed with eight lichen species. The mycobiont of all investigated species is an ascomycetes (class Lecanoromycetes). Seven lichens harbour a coccal green alga of the genus *Trebouxia* sp. as a photobiont (phylum Chlorophyta, class Trebouxiophyceae) while *Peltigera aphthosa* harbours *Coccomyxa* sp. (Trebouxiophyceae). All lichens are composed of two eukaryotic symbionts, making the selected species valuable models to investigate the capacity of eukaryotes and of symbioses to resist non-terrestrial environmental factors. The species preferentially used in astrobiological research are *Circinaria gyrosa*, *Rhizocarpon geographicum*, *Xanthoria elegans*, and currently *Buellia frigida*. Recently, promising Martian environment simulations were performed with

Pleopsidium chlorophanum (de Vera et al. 2012). Simulation studies were also performed with *Fulgensia bracteata* and *Xanthoria parietina* (de Vera et al. 2004a, b) but due to their anatomical analogies with *X. elegans*, both are not addressed by the present study. *P. aphthosa* as a mere control to *B. frigida* in UVC-exposure experiments (de Vera and Ott 2010) was also excluded.

The results of astrobiological research depicted above justify continuing research on the resistance of lichens and to focus on the questions, if and to what extent the morphological organization of the symbiotic association contributes to its potential of resistance. Therefore, detailed investigations of thallus structure and anatomical organization were made by light-microscopic analysis and fixed scanning electron microscopic analysis. The presented results give decisive insight into the morphology and anatomy of five out of eight lichens used to date in astrobiological studies. They allow determining the portion of thallus organization in the lichens' potential of resistance and will give a valuable basis for interpreting the data of recent and future experiments. The results demonstrate that the peculiar morphology and anatomy of lichens have a remarkable stake in their resistance towards extreme environmental conditions on Earth as well as towards space and Mars conditions.

Material and Methods

Buellia frigida Darb. (1910) is a frequent, endemic, crustose lichen of maritime and especially continental Antarctica, colonizing habitats down to 84°S. The thalli grow on rocks being fully exposed to wind, low temperatures and high irradiation levels during Antarctic summer and in altitudes up to 2015 m a.s.l. and intact thalli of up 15–20 cm are frequent found on Inexpressible Island (Øvstedal and Lewis Smith 2001). For the present study, *B. frigida* was collected on two sites in continental Antarctica: In 1996/1997 at Inexpressible Island (74°54'S, 163°43'E) in Terra-Nova-Bay, Ross Sea (by R. L. Smith), and in 2009/2010 in the vicinity of the German Gondwana Station at Gerlache Inlet (74°38' S, 164°13'E), in North Victoria Land (by S. Ott). Air-dried samples were stored at -25 °C until use. For BIOMEX on EXPOSE-R2/Zvezda samples from Gondwana Station will be used.

Circinaria gyrosa Sohrabi (2012) was recently revised from *Aspicilia fruticulosa* (Sohrabi 2012) and used under its previous name for several space and simulation experiments (de la Torre et al. 2010a; Raggio et al. 2011; Sánchez et al. 2012). *C. gyrosa* originates from continental deserts and arid areas of Middle Asia, Eurasia, North America and Northern Africa. It is adapted to harsh environmental conditions, including heat, drought, and high levels of solar UVR (Sancho et al. 2000). Samples were collected from clay soils in high basins of central Spain: Guadalajara, Zaorejas, 1260 m a.s.l. (40°45'40"N, 02°12'08"E). The samples were collected in June 2010 and kept under dark and dry conditions until testing.

Rhizocarpon geographicum (L.) DC (1805) (*R. geo.*) is a widespread, bipolar lichen, mostly distributed on northern hemispherical arctic and alpine habitats but also found in maritime and continental Antarctica. It is found on exposed, often dry, siliceous or granite, non-calciferous rock in montane, subalpine and alpine or polar zones. The specimen investigated in this study are collected on two distinct montaneous, respectively alpine sites: In Spain at the Sierra de Guadarrama mountains near Navacerrada (about 40°47'20"N, 04°00'12"W, at about 1400 m a.s.l.), and in Valais, Switzerland at Col du Sanetsch, (46°20'01"N, 07°17'11"E, at 2140 m a.s.l.) as well as in the vicinity of Zmutt (46°00'N, 07°71'E, at 1950 m a.s.l.).

Xanthoria elegans (Link) Th. Fr. (1860) is a cosmopolitan lichen colonizing open sites on diverse substrata in various habitats, including harsh environments as alpine (up to 7,000 m.s.l. in Himalaya), peninsular Antarctic (Berry Hills, Cape Lachman, James Ross Island, 64°S) and continental Antarctic inland sites (near Wood Bay, Victoria Land, 74°S, Øvstedal and Lewis Smith 2001). It is frequent on volcanic, silicate and limestone rock, at nitrophilic sites, and occasionally found on concrete and other anthropogenic substrata. Habitats of *X. elegans* are usually exposed to high levels of UVR (de Vera 2005). For the present study, thalli of *X. elegans* were collected in June 2005 at Col du Sanetsch, Valais, Switzerland (46°21'48"N, 07°17'51"E, at 2140 m a.s.l.) and stored at -25 °C until investigation. Thalli of *X. elegans* from this and from adjacent collection sites (Zermatt, 46°00'N, 07°71'E, at about 1950 m a.s.l.) were used before in astrobiological studies (de Vera et al. 2003, 2004a, b, 2007, 2008, 2010; Stöffler et al. 2007; Horneck et al. 2008) and in the LIFE experiments on EXPOSE-E/EuTEF (see de Vera et al. 2012; Onofri et al. 2012).

Pleopsidium chlorophanum (Wahlenb.) Zopf (1855) is a bipolar distributed species found in North Europe and North America, but also throughout maritime and continental Antarctica (Øvstedal and Lewis Smith 2001). It is most frequent in continental Antarctica, where it is widespread down to far inland nunataks at altitudes of up to 2500 m a.s.l. *P. chlorophanum* colonizes dry, shaded rocks and cracks. It forms hyphal strands which penetrate 10–15 mm into the rock and facilitate bio-weathering. The samples used for the present investigation were collected in 2009/2010 next to Gondwana Station at Gerlache Inlet, North Victoria Land (74°38'S, 164°13'E). The air-dried samples were stored at -25 °C until further use.

Explanation of lichenological terminology: *heteromerous*: internally stratified; *pseudocyphellae*: cortical pores; *hypo-/prothallus*: basal/marginal layer of crustose thalli; *plectenchyma*: general term for interwoven hyphal tissues; *paraplectenchyma*: tissue of isodiametrical hyphae; *prosoplectenchyma*: tissue of elongated periclinal hyphae; *apothecium*: fungal fruitingbody; *hymenium*: asci-bearing layer in apothecia; *epi-/hypotheicum*: layer above/below the hymenium; *ascus*: ascospore-bearing cell; *paraphyse*: sterile hymenial hypha; *pycnidium*: conidiospore-forming fungal structure.

Light-Optical Microscopic Studies and Stratification Measurements

Five to twelve specimen of each lichen species were screened on their morphological properties and representative ones were prepared for further investigations under a stereoscopic microscope (M8, Wild Heerbrugg AG). Photo-documentation of the respective lichen morphology were performed with a Nikon D80 (AF Micro-NIKKOR macro lense, 60 mm focal length). For each lichen species thin layer sections (12–20 µm) were obtained from at least 4 representative specimen at marginal (distal) and central (proximal) lobes or areolae, respectively (Table 2), by using a freezing microtome (ca. -30 °C, Frigomobil 1206, Reichert-Jung) and subsequently stained with 5 % lactoglycerol cotton blue. Analysis of thallus anatomy and further photo documentation were performed under a digital lightmicroscope (Axio imager A1). and stratification measurements were done by proprietary software tools (AxioVision Rel. 4.8.2).

Scanning Electron Microscopy of Fixed Thallus Samples

For each lichen species, thin layer sections (50–80 µm) of 2–3 different lobes/areolae of 2–4 representative thalli were prepared (as described above), transferred into 2.5 % glutaraldehyde in 200 mM cacodylate-buffer, fixed under vacuum and under ambient pressure (30 min

each), and washed for 10 min in pure cacodylate-buffer. Afterwards the samples were mounted in microporous capsules (plano GmbH) and dehydrated by subsequent dilution series of graduated ethanol (in water) and acetone (in ethanol). Submerged in acetone, the thallus sections were brought into screw cap containers (Dr. W. Hert Mikrotechnik), closed with 3 mm copper grids, transferred to a critical point drying device (CPD 020, Balzers Union), washed thrice, and dried at the critical point temperature of 34.5 °C. The dehydrated lichen sections were transferred to specimen holders, air dried for 8 h, and gold-sputter coated for 180 s at 35 mA (Sputter Coater, Agar Scientific Ltd.), followed by detailed examination of thalline morphology and anatomy by scanning electron microscopy (SEM; LEO 1430(VP), LEO Electron Microscopy Ltd.).

Results

Buellia frigida

Morphology *B. frigida* is an epilithic crustose to placoid lichen (Physciaceae) which forms greyish to black circular thalli up to \varnothing 50 cm (Fig. 1a). The thallus margin is composed of rectangular areolae (max. 0.6×3.0 mm) of black colour and represents the growth zone. The older central region is formed by angular grey to black coloured areolae and numerous, black, convex and lecideine apothecia (max. \varnothing 1 mm). The apothecia bear apically thickened and pigmented paraphyses and club-shaped asci containing eight highly melanized, two-celled ascospores each. Asexual reproductive structures—as soredia and isidia—are not formed while immersed pycnidia are frequently formed in central areolae.

In the hydrated state, the thallus is significantly swollen by water uptake, reducing the density of its blackish melanin pigmentation in the cortex (Fig. 4a). Consequently, the photobiont in the algal layer becomes effectively exposed to light in the wet state. During dehydration, the thallus shrinks, leading to densification of the melanin pigmented cortex (Fig. 4b). This effect is most obviously observed in the algal rich marginal zones of *B. frigida* thalli where the number of algae is highest (Fig. 2a). The thallus surface is mostly covered by a mucilageous epicortex (Fig. 5) which may appear white in the dehydrated state (Fig. 1a), usually more prominent in the depigmented central parts of the thallus (Fig. 2a, bottom).

Anatomy The stratification is measured at thalli from two collection sites (Inexpressible Island and Gondwana Station) and for the specimen of the latter habitat in marginal (MS) and central (CS) thallus sections (Table 2). Despite a decrease of algal layer thickness and pigmentation in central thallus sections, the differences between sites and sections are low. Below the epicortex, which is occasionally interrupted in more central areolae, a paraplectenchymatous cortex of swollen and melanin-pigmented apical cells is located. From the marginal (e.g. younger) towards the central (e.g. older) thallus sections the cortex structure remains stable while its pigmentation ceases and the conglutination of the cortical cells increases, leading to a patchy pattern of pigmented and unpigmented areas. Below, the algal layer is composed of homogeneously dispersed algal clusters and interwoven hyphae, both strongly gelatinized (Fig. 3a). The algal layer is more pronounced at the margin but reduced to singled, patchy clusters in the centre. The occurrence of algal clusters in the central parts is clearly correlated to the residual melanin-pigmented areas above (Fig. 2a). Three morphological aspects, (i) depigmentation, (ii) increase of mucilage in the epicortex, and (iii) ceasing of the algal layer, point to thallus degeneration in the central (e.g. older

Table 2 Stratification of five lichen species relevant in astrobiological research

Lichen (from)	Thickness of thalline strata in [μm] \pm standard deviation							
	Mucilage layer	Cortex pigm.	parapl.	Sub-cortex	Algal layer	Medulla	Lower cortex	Hypo-thallus
<i>B. frigida</i> (from Gondwana Station, North Victoria Land and Inexpressible Island, both Antarctica)								
Gondwana	9.4 \pm 2.9	13.3 \pm 2.9	–	–	104.6 \pm 51.5	206.1 \pm 35.5	–	–
Inexpr. Isl.	12.4 \pm 2.9	15.8 \pm 5.5	–	–	68.0 \pm 15.3	204.8 \pm 43.8	–	–
Marginal	8.2 \pm 1.8	14.5 \pm 1.8	–	–	116.9 \pm 52.4	205.5 \pm 37.2	–	–
Central	12.6 \pm 2.8	14.8 \pm 5.6	–	–	67.1 \pm 14.3	205.3 \pm 41.9	–	–
<i>C. gyrosa</i> (from Zaorejas, Guadalajara, Central Spain)								
Proximal	–	20.8 \pm 0.9	18.3 \pm 1.3	125.7 \pm 13.0	69.2 \pm 12.0	385.9 \pm 12.2	–	–
Distal	–	24.3 \pm 9.5	21.4 \pm 2.4	147.1 \pm 29.0	78.3 \pm 39.7	346.3 \pm 111.0	–	–
<i>R. geographicum</i> (from Navacerrada, central Spain and Col du Sanetsch, Valais, Switzerland)								
Valais	–	28.1 \pm 3.5	–	–	94.7 \pm 15.1	159.1 \pm 61.3	–	66.0 \pm 37.7
Navacerr.	5.0 \pm 1.5	16.1 \pm 11.9	–	–	123.6 \pm 4.4	71.7 \pm 12.2	–	61.9 \pm 15.5
<i>X. elegans</i> (from Col du Sanetsch, Valais, Switzerland)								
Marginal	–	22.1 \pm 4.5	18.8 \pm 8.2	–	65.4 \pm 10.6	146.6 \pm 46.8	24.2 \pm 3.7	–
Central	–	35.7 \pm 20.2	20.5 \pm 6.5	–	96.6 \pm 72.6	230.0 \pm 150.3	29.5 \pm 14.2	–
<i>P. chlorophanum</i> (from Gondwana Station, North Victoria Land, Antarctica)								
Gondwana	4.1 \pm 1.8	15.0 \pm 5.0	11.7 \pm 2.3	–	228.2 \pm 102.7	n.d.	–	–

Numbers indicate the mean of $n=44$ to 110 independent measurements of thallus stratification with standard deviation. For *B. frigida*, marginal and central stratification properties were examined with samples from Inexpressible Island, Antarctica. marginal = lobe sections at the margin of a thallus, central = lobe sections from centrally located lobes, proximal = sections from the inward parts of a thallus, distal = sections near the branch tips of *C. gyrosa*

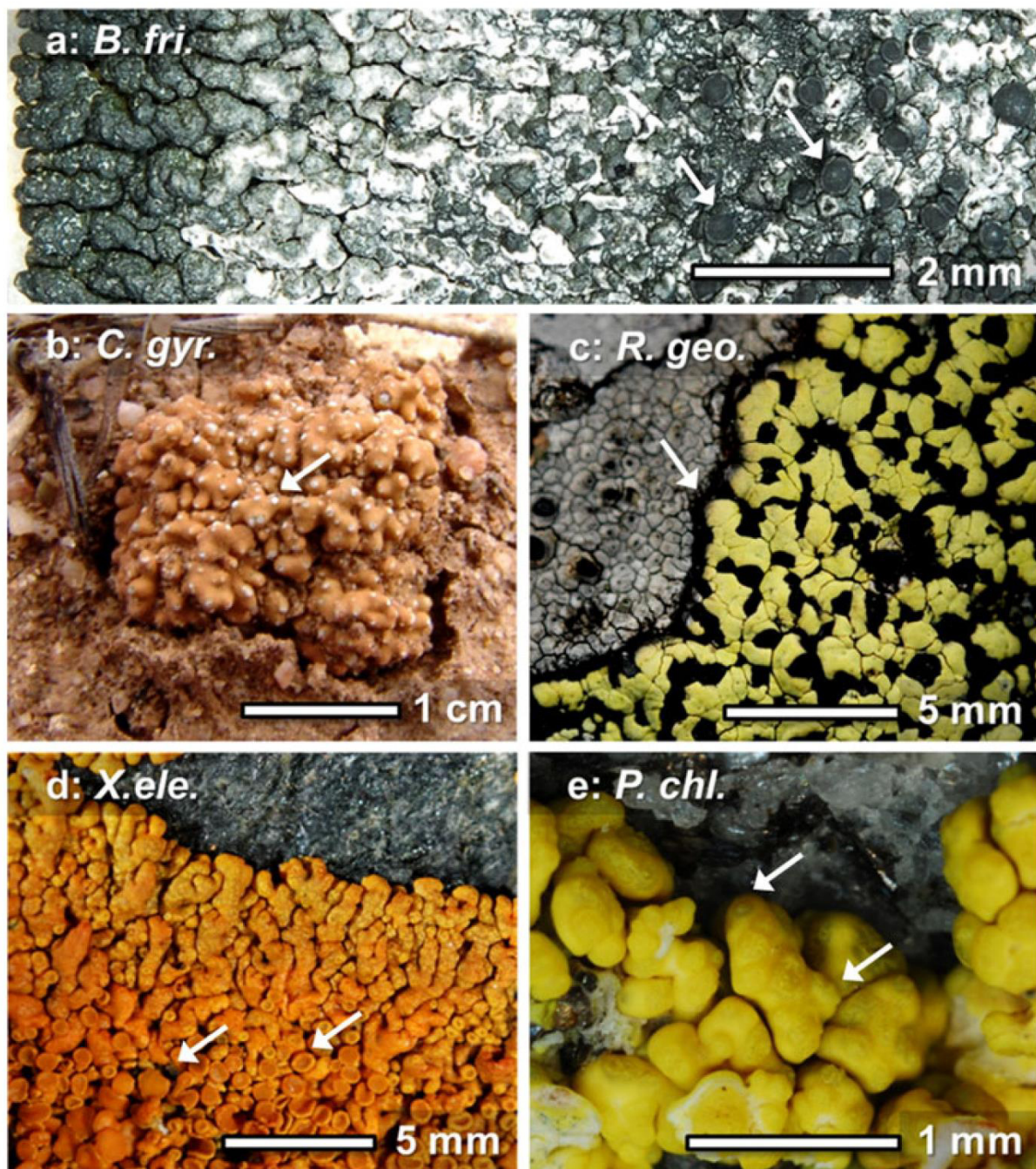


Fig. 1 Habitus macrographs of the five investigated lichens. **1a** thallus detail of *B. frigida* from marginal zones (*left*) to the center (*right*) with black rectangular areolae at the margin and angular areolae and black apothecia (*arrows*) in the center. **1b** vagrant, spherical, fruticose, and compact thallus of *C. gyrosa* with pseudocyphellae as white tips (*arrow*) at the end of sympodial branchings. **1c** habitus of a *R. geographicum* thallus with yellowish areolae, black interspersed apothecia and black prothallus (*left margin, arrow*). **1d** placoid thallus of *X. elegans* with protruding, branched, and narrow lobes at the margin (*upper part*) and disc-like apothecia in the center (*lower part, arrows*). **1e**: thallus detail of *P. chlorophanum*, showing yellow, irregular, distinct, convex to pulvinate areolae with verrucose openings of the pycnidia (*arrows*)

parts) of the thallus. Thalline lobes, pycnidia, and apothecia are frequently formed in the inner parts. The medulla is the largest stratum of *B. frigida* consisting of strongly interwoven hyphae, stabilizing the thallus, and acting as a layer of water retention and gas exchange. The thallus is tightly fixed to the substratum by medullary hyphae, often incorporating small rock particles. A lower cortex or rhizine strands were not observed.

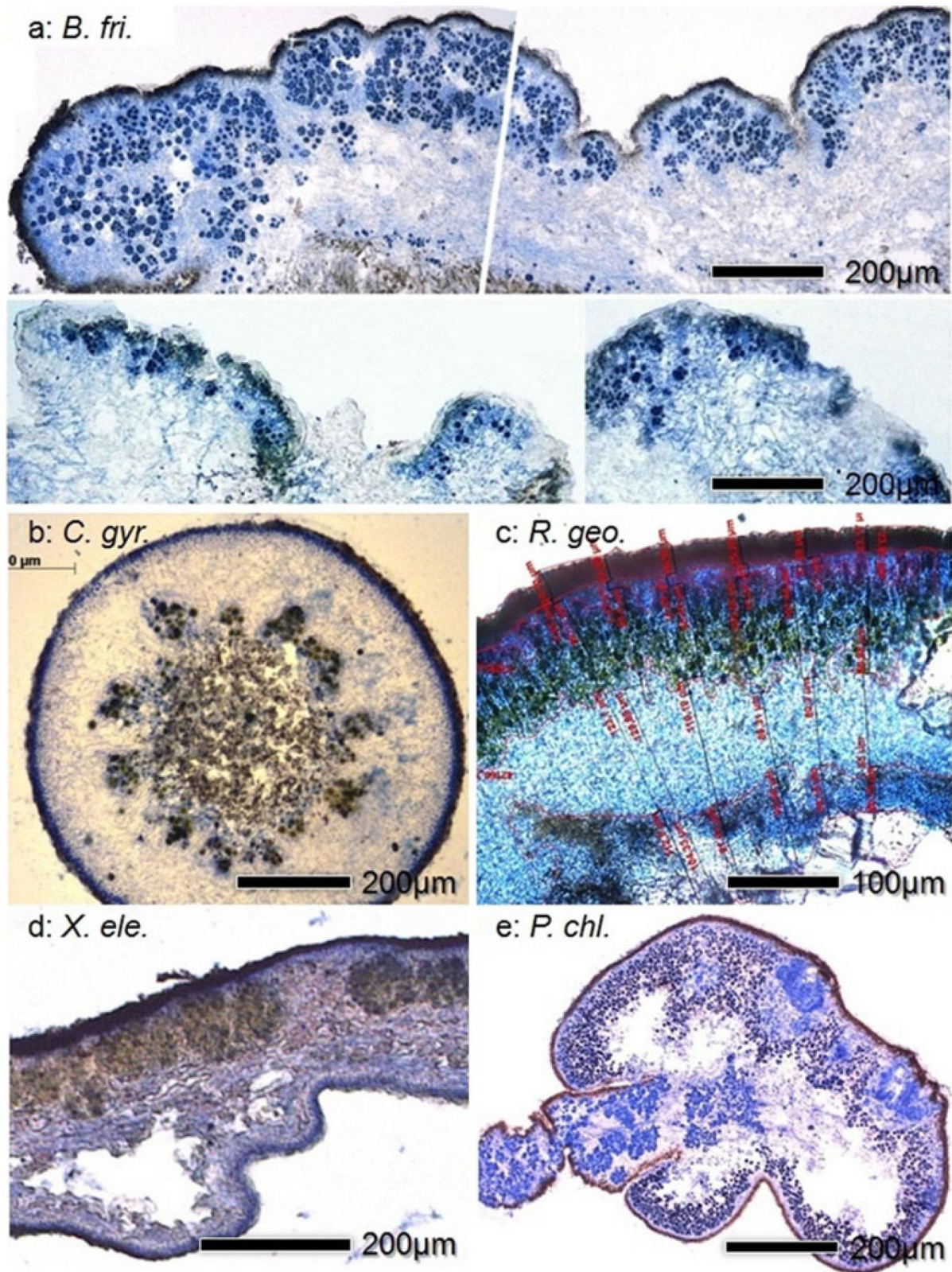


Fig. 2 Thin sections of five investigated lichens. **2a** *B. frigida*, high amounts of algal cells below a pigmented cortex at younger marginal areolae (upper row) and decreased algal numbers below the depigmented cortex in older, central areolae (lower row). **2b** *C. gyrosa*, distal cross section, stratification from outside to the center: pigmented and paraplectenchymatous cortex, pronounced subcortex, evenly arranged algal clusters and loose central medulla. **2c** section through an areola of *R. geographicum*, showing the algae arranged in vertical lines below the highly pigmented cortex. **2d** heteromerous lobes of *X. elegans* **2e** lobe section of *P. chlorophanum*, two types of photobionts, in the algal layer of the lobe (a) and at the base of the rhizine-like strand (left, b)

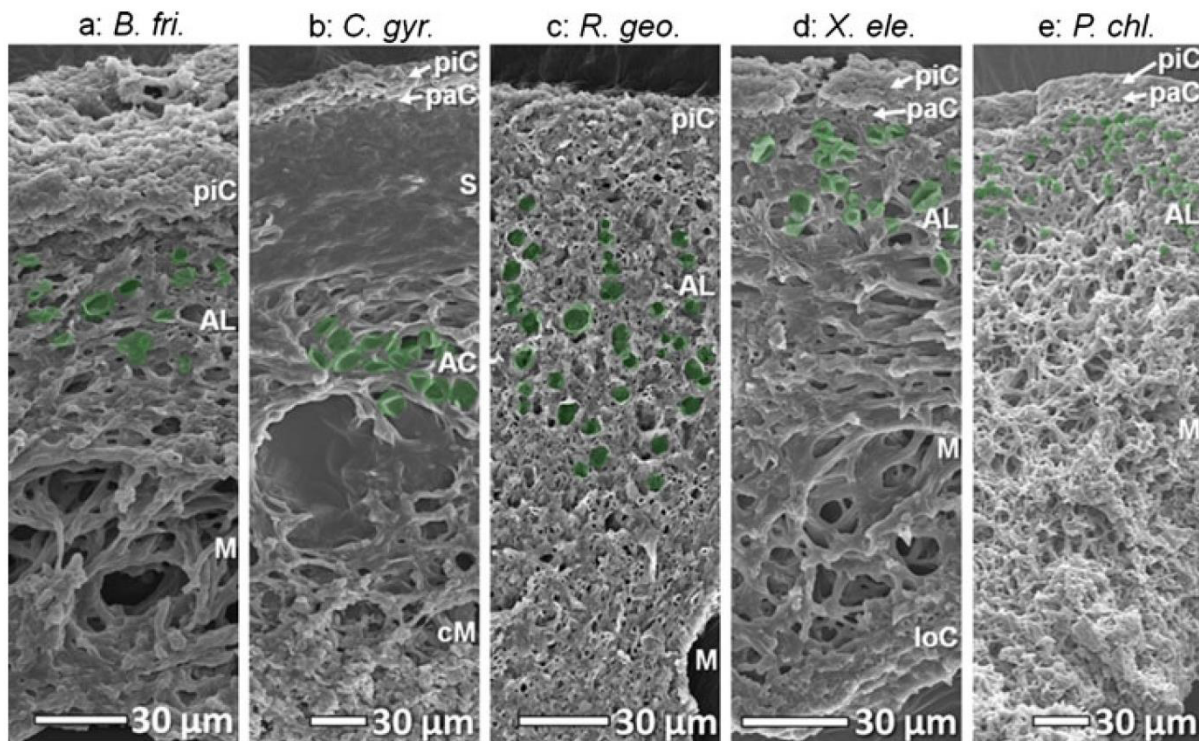


Fig. 3 Fixed SEM micrographs of the five investigated lichens. Algal cells highlighted with transparent green spots. **3a** *B. frigida* **3b** *C. gyrosa* **3c** *R. geographicum* **3d** *X. elegans* **3e** *P. chlorophanum*. Legend as follows: **AC**: algal cluster (in *C. gyrosa*), **AL**: algal layer, **cM**: medullary hyphae, sheathed with whewellite crystals (in *C. gyrosa*), **loC**: lower cortex (in *X. elegans*), **M**: medulla, **paC**: paraplectenchymatous Cortex, **piC**: pigmented cortex, **S**: subcortex (in *C. gyrosa*). Mucilagenous epicortex (*B. frigida*, *R. geographicum*, *P. chlorophanum*) not visible in the choosen micrographs

Circinaria gyrosa

Morphology *C. gyrosa* is a vagrant, spherical, fruticose, and compact lichen of brownish to ochre colour with a diameter of max. \varnothing 2.5 cm (Fig. 1b). It has been recently assorted to the family of the Megasporaceae (Sohrabi 2012). The outer branches end in nearly circular pseudocyphellae that appear as white tips, exposing the medulla directly to the atmosphere (Fig. 1b, as described in Sancho et al. 2000). The surface is formed by a brownish epinecral layer containing no detectable amounts of SLCs (Raggio et al. 2011). The detailed study of morphological-anatomical traits reveals insight that might explain its high potential of

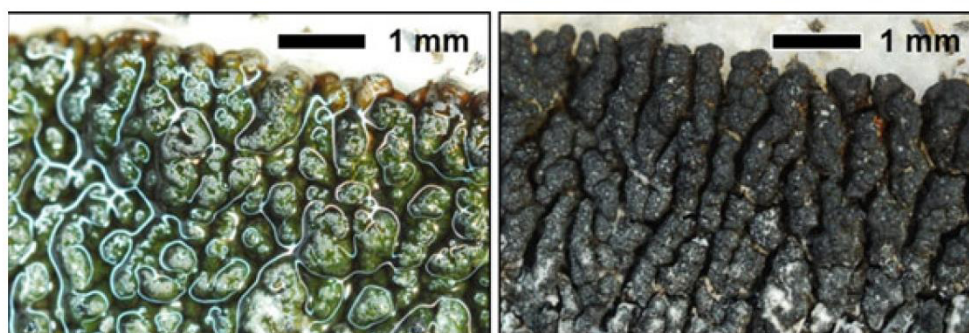
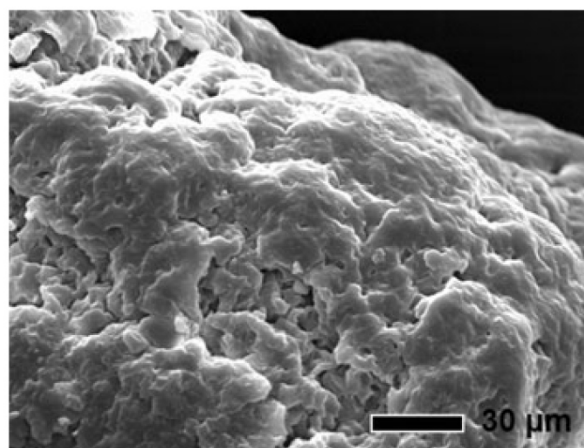


Fig. 4 Macrographic *top view* on the thallus margin of *B. frigida* under wet and dry conditions. **4a** In the wet and swollen state (*left*) the green colour of the algal layer is dominant, while in the dry and shrunken state (**4b**, anhydrobiosis) the black melanin pigmentation of the upper cortex shields lower strata of the thallus from excess irradiation

Fig. 5 SEM-micrograph (*top view*) on the surface of a marginal *B. frigida* areola. The smooth areas are covered with mucilage, the rugged areas in between show the unshathed hyphae of the cortex



resistance—as demonstrated in previous astrobiological studies (de la Torre et al. 2010a; Raggio et al. 2011; Sánchez et al. 2012). The porous pseudocyphellae at the tips facilitate gas exchange between the atmosphere and the interior gas space (Sánchez et al. 2012). Apothecia are rare and no subject of astrobiological studies; asexual reproduction was not observed.

Anatomy Thin sections (15 μm) of proximal and distal parts of sympodial branches revealed particular anatomical structures and internal stratification of *C. gyrosa* (Table 2, Figs. 2b and 3b). Minor differences between distal and proximal parts were detected. The outer stratum is formed by a brown epinecral layer, followed by a vivid paraplectenchymatous layer of roughly isodiametric cells. Below this layer, *C. gyrosa* forms a particular, extended, and compact periclinal prosoplectenchymatous subcortex. This pronounced thallus structure consists of tightly arranged fungal hyphae that are conglutinated by high amounts of extracellular mucilage (Fig. 3b). It is supposed to significantly contribute to the lichen's mechanical stability, to act as a diffusion barrier for gas exchange, and to contribute to the high resistance of *C. gyrosa*. Below, singled, dense, and evenly distributed clusters of photobiont cells are located which are lowly abundant and do not form a continuous algal layer as it is observed in other lichens (Figs. 2b and 3b; e. g. *Xanthoria*- and *Peltigera*-species). The algal clusters are more frequent in distal parts next to the pseudocyphellae. The spaces between the clusters consist of fungal tissue similar to the subcortex while inward, loose medullary hyphae connect the medulla to the clusters. The central branch tubes are formed by medullary fungal tissue that is rich in inner aerial spaces and connected to the atmosphere by apical pseudocyphellae. To prevent complete soaking with water under wet conditions and to enable efficient gas exchange when wet, the medullary hyphae were covered with extracellularly deposited whewellite-crystals (Fig. 6, Böttger et al. unpubl.).

Rhizocarpon geographicum

Morphology *R. geographicum* (Rhizocarpaceae) forms epilithic, crustose thalli of lime-green, angular to rounded, flat to convex areolae, situated upon a well-developed black hypothallus surrounded by a marginal prothallus (Fig. 1c). Usually several thalli fuse into large colonies. The frequently formed apothecia between the areoles are black and disc-shaped, with a black epithecium, a thin margin and up to \varnothing 1 mm. The asci form eight large (25–35 μm), melanized and septate spores. Asexual reproduction was not observed.

Anatomy Thalli samples from the Spanish location Navacerrada occasionally show an interrupted gelatinous epicortex that is missing in samples from the Swiss Alps (Table 2,

Fig. 6 SEM-micrograph, cross section of the medulla of *C. gyrosa*. The medullary hyphae are dense ensheathed with whewellite crystals (arrows)

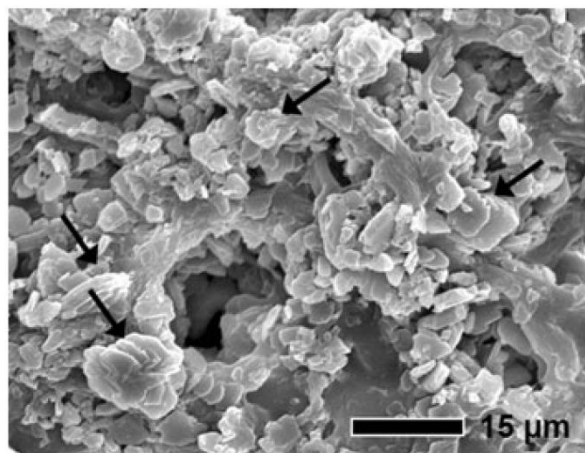
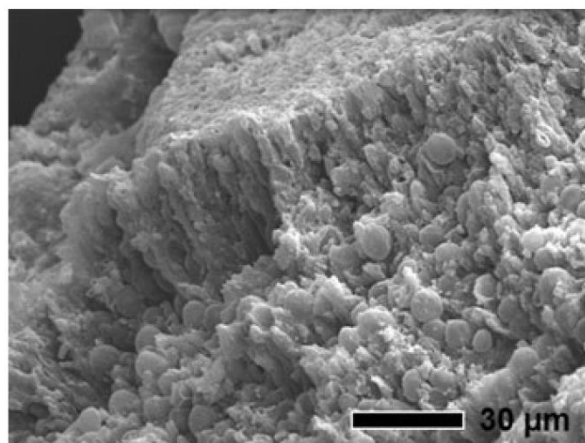


Fig. 2c). The samples collected in Spain were covered by a gelatinous layer upon the cortex which is thinner compared to samples from the Alps while the algal layer is thicker and the medulla is thinner. Samples from both locations display densely arranged cortical cells (Fig. 7) that are intensely coloured and incrustated with SLCs. The algal layer below is characterized by rows of algal cells and interjacent hyphae both arranged antiklin to the surface and highly gelatinized (Figs. 2c and 3c). Upon the blackish prothallus, the medulla is formed by densely aggregated and highly gelatinized hyphae of antiklin orientation with few interior gas spaces (Fig. 3c).

Xanthoria elegans

Morphology *X. elegans* (Teloschistaceae) is a placoid to crustose lichen (Fig. 1d) that may cover large areas of the substrate. At the margin, the thallus protrudes narrow, convex, densely arranged, and overlapping lobes that are lifted above the substrate or attached to it by rhizine-like strands. Thalli are often fusing to form large colonies. The bright yellow-orange to red colour is produced by SLCs in the upper cortex. The intensity of the colour depends on the degree of insolation in the respective habitat (Nybakken et al. 2004) and is effectuated by superficial formation of parietin-crystals—a SLC also found in abundant, orange, lecanorine apothecia (\varnothing 1–3 mm) in central thallus parts. The asci are formed among straight to branched paraphyses and bear eight elliptic ascospores. Asexual reproductive structures are missing.

Fig. 7 SEM-micrograph (side view) on the surface of a *R. geographicum* areola. The cortex is partially removed, exposing the algal layer and illustrating the clear vertical orientation of the hyphae in the cortex and the algal layer



Anatomy The anatomy of *X. elegans* is investigated with marginal (i. e. younger) and central (i.e. older) lobes of representable thallus samples (Table 2). The inner structure is heteromerous (Figs. 2d and 3d). The upper surface is coated by a well-developed upper cortex, which is formed by iso-diametric anticlinal paraplectenchymatous cells and pigmented by parietin in the outer parts. The algal layer is composed of distinct but evenly arranged clusters of photobiont cells with gelatinized interjacent hyphae (Fig. 3d). The medulla consists of a spongy, loose network of long periclinal prosoplectenchymatous hyphae forming a large, gas filled interior space (Fig. 3d). In contrast to the other investigated lichens *X. elegans* forms a lower cortex. The comparison of marginal and central sections indicates an extension of cortical, algal and medullary layers with age.

Pleopsidium chlorophanum

Morphology *P. chlorophanum* (Acarosporaceae) is a crustose, effigurate, morphologically variable lichen with irregular, distinct, convex to pulvinate areolae (\varnothing 10–20 mm), and a smooth to verrucose surface (Fig. 1e). The colour is sulphuric yellow on mature or exposed areolae to lime green on young or shaded areolae. Apothecia of up to \varnothing 2.5 mm are reported to be frequent (Øvstedal and Lewis Smith 2001), but not found in samples collected at Gondwana Station. This might be correlated to extreme environmental conditions preventing sexual reproduction by extremely short periods of favourable growth conditions. Nonetheless, large numbers of pycnidia are formed in the thalli releasing the pycnospores through bottle-neck apertures in verrucose elevations. Penetration of rock fissures by outgrowing hyphal strands is a common observation; it fixes the thallus to the substratum and promotes rock colonization as well as bio-weathering.

Anatomy The cortex is divided into a pigmented upper layer (Table 2, Fig. 3e). The pigmentation—which is missing in premature areolae but develops by time—is due to extracellular deposits of needle-shaped yellow crystals while the unpigmented layer is constituted of paraplectenchymatous and intensively gelatinized hyphae. The cortex is covered by an epicortex which is more pronounced above the pycnidia. Below this layer, the large numbers of photobiont cells are situated (Fig 2e). They are not consistently arranged in a distinct and uniform algal layer, but fill large areas of the globose areolae more or less densely or clustered. Depending on that, the extremely loose medulla is irregularly shaped. In the vicinity of and within the basal thallus strands the aggregation of hyphae becomes denser and more gelatinized. In these basal parts of the areolae, a second type of photobiont is found which is smaller, blueish-green, and shows a different proliferation pattern (Fig. 2e). For clarification of photobiont identity molecular phylogenetics are in progress.

Discussion

As represented by the different growth types (crustose, placoid, and fruticose) and the diverse morphological and anatomical traits (i. a. the prevalence of different strata, Table 2), it is not a peculiar growth type or trait but an individual set of features that enables lichens to brave harsh environmental conditions and explains the high potential in resisting extreme environmental factors. Protection against excess PAR and UVR is often considered one of the most crucial factors in research on lichen extremotolerance (Solhaug and Gauslaa 2004), therefore the following paragraphs pre-dominantly focus on photoprotective effects.

By the comparative approach, it is possible to identify some features that contribute to the resistance of astrobiologically relevant lichens. While the discussion focuses on thalline structures, the fruiting bodies of the investigated lichens reveal additional features to protect the fungal spores inside: melanized paraphyses, a gelatinous matrix in and on the hymenium, deposits of SLCs in the epithecium, the hypothecium and the apothecial margins (parietin in *X. elegans*, melaninic substances in *B. frigida* and *R. geographicum*). In the case of *B. frigida* and *R. geographicum* the spores themselves are highly melanized implying that they are not only protected within the apothecium but also beyond, being an advantage for successful establishment at highly insolated habitats.

Mucilage Matrices The formation of extracellular polymeric substances (EPS, i. e. mucilageous or gelatinous matrices) is a basic property of the investigated lichens. Besides being the basic biont contact interface (Honegger 1992), mucilage covers the surface, conglutinates cortical and subcortical cells, ensheaths algal clusters and covers medullary hyphae. Two predominant appearances of gelatinous substances are observed: the formation of a gelatinous epicortex (partially in *P. chlorophanum* and *X. elegans*, site-dependent in *R. geographicum*, frequently in *B. frigida*) and the formation of gelatinous substances in peculiar strata (in the subcortex of *C. gyrosa* or the algal layer of *B. frigida*). Besides aspects of water-uptake and -retention, the mucilage in the epicortex and the (sub)cortex might promote resistance: It was discussed that gelatinous substances have UVR-screening properties (Lütz et al. 1997; Belnap et al. 2001; de Vera et al. 2003, 2010; Flemming et al. 2007; Ortega-Retuerta et al. 2009) and that mucilage might act as a radiation-protective layer. Studies with bacterial exopolymer biofilms show that they are only transmitted by minor proportions of UVR (13 % of UVC, 31 % of UVB, 33 % of UVA), protecting the cells from exposure and suggesting that EPS is a natural defense against UVR (Elasri and Miller 1999). With up to 12.6 μm in *B. frigida*, 5.0 μm in *R. geographicum*, and 4.1 μm in *P. chlorophanum* the mucilageous epicortices of these extremotolerant lichens are more extended than in the more temperate distributed Parmeliaceae (0.6–1.0 μm , Büdel and Scheidegger 1996). The epicortex may also change the reflection properties of the surface—due to refractive and dispersive effects—and reduce the intensity of PAR and UVR in the thallus. The remarkable amounts of gelatinous substances in the subcortex of *C. gyrosa* as well as in the algal layer of *B. frigida* and *R. geographicum* may cause additional shielding against PAR and/or UVR.

Cortices As in most lichens, a pigmented and conglutinated cortex is found in all five investigated species followed by an unpigmented paraplectenchymatous cortex in *C. gyrosa*, *X. elegans*, and *P. chlorophanum*. In these cortices, the vivid fungal cells are found in the lower part while the upper pigmented part occasionally lacks vivid cell lumina, forming an epinecral layer of pigment incrustated dead cell remnants (as observed in *X. elegans* and *P. chlorophanum*). In all cases the pigmentation is confined to fungal cell walls of the apical hyphae, ceasing with increasing depth. The SLCs of astrobiologically relevant lichens are addressed elsewhere (Meeßen et al., unpubl.), but also the cortical morphology contributes to resistance. Besides physiological limitation, herbivore defence, and mechanical stabilization, protection of the photobiont is considered a main function of the cortex (Ertl 1951; Jahns 1988; Kappen 1988). In general, lichen cortices are able to absorb 26–43 % of the incident light while shade- and light-adapted thalli of the same species may vary in cortical organization due to the different light regimes (Ertl 1951; Büdel and Scheidegger 1996).

Hydrated, physiologically active thalli of *B. frigida* are coloured intensively green by the algal layer below the cortex (Fig. 2a). The swelling of cortical cells by water-uptake reduces

the density of the cortical pigmentation, and exposes the algae to higher light intensities. If *B. frigida* passes into anhydrobiosis, the thallus becomes intensively coloured black by shrinking cortical cells and densifying melanin incrustations in the upper cortex (Fig. 4b). This effect of increasing cortical absorbance substantially reduces excess light levels reaching the photobiont and might be an adaptation comparable to the pruina, a superficial layer of crystalline deposits or dead cells that increases reflection when dry (Jahns 1988; Büdel and Scheidegger 1996) and resembles a protective adaptation (Kappen 1973). Both effects protect lichens most effectively in anhydrobiosis, in which it experiences considerably long periods of insolation (Lange et al. 1999), its repair mechanisms are dormant, and harmful effects of excess PAR/UVR are accumulative (Solhaug and Gauslaa 2004).

Astrobiological investigations stress the role of the lichen cortex in protecting fungal and algal bionts: for *R. geographicum* it was found that the removal of the cortex before exposition reduces the relative PSII activity of the photobiont depending on the type of UVR-transmission filter used (de la Torre et al. 2010a). In other experiments the thallus tissue viability decreased at about 15 % in *F. bracteata* and 25 % in *X. elegans* if the cortex is removed before UVR-exposure (de Vera et al. 2003; de Vera and Ott 2010). However, in such experiments the effect of the cortical structure itself was not separated from the effect of the deposited SLCs.

Subcortex In the present study, a subcortex is found in *C. gyrosa* only. It measures up to 150 µm and is characterized by dense fungal hyphae that are highly conglutinated with mucilage but lack any pigmentation. This structure is exclusively formed by the very lichen species that showed no sign of major SLC production (Raggio et al. 2011). The thick and dense fungal cortex was found to protect the algal populations within the cluster while the contribution of the single layers (cortex and subcortex) is not yet quantified. We conclude that the highly conglutinated subcortex does not only deal with the mechanical stress of the lichen's vagrant life style, but also compensates the lack of photoprotective SLCs. Especially, if its location above the algal layer, the lack of SLCs in the cortex (Raggio et al. 2011), and its high resistance towards UVR-exposure (de la Torre et al. 2010a; Sánchez et al. 2012) are taken into account. Several factors may contribute: the sheer thickness, the high amount of mucilage (with the shielding properties discussed above), and the protective effect of the densely packed hyphae themselves.

Algal Layer Investigations on the viability of both symbionts of *X. elegans* and *P. aphthosa* after exposure to UVC_(254nm) at 2.1–201.8 J·m⁻² (de Vera and Ott 2010) showed a higher decrease in viability of the photobiont compared to the mycobiont, supporting the hypothesis that the photobiont is the more sensitive partner of the symbiosis. Recent observations show that the resistance of lichens to high UVR and vacuum can be attributed to the mycobiont (de Vera et al. 2008; de Vera 2012), while additional results indicate that also the arrangement of the photobiont contributes to resistance: In *B. frigida*, *C. gyrosa*, *P. chlorophanum* and *X. elegans* the algae are clustered in more or less dense aggregates which are enveloped by a layer of gelatinous substances. In *R. geographicum* the algae are surrounded by highly gelatinized hyphae and arranged in rows vertical to the surface of the thallus and thus, in line with the direction of most intensive insolation. Both arrangements—clustering and alignment—can be interpreted as protective strategies to avoid excess insolation. Live/Dead analysis after several simulation experiments supports this hypothesis, clearly showing that inner cells of algal clusters are more vital than outer ones after exposure to UVR or UVR + vacuum (de Vera et al. 2003, 2004a, b), even if isolated photobionts were tested (de Vera et al. 2008).

Basal Thallus Strands Out of the five investigated species, only *P. chlorophanum* forms basal thallus strands penetrating the upper layer of the rock substrate, integrating an endolithic characteristic to an usually epilithic lichen. This feature may not only substantially contribute to the lichen's potential of substrate colonization and bioweathering but may also reflect an adaptation towards extremotolerance. Growing inside the substrate and using its structure as a protection is a strategy of many organisms—including lichens—to colonize the most extreme terrestrial habitats (Sun et al. 2010). For *P. chlorophanum*, the endolithic strands resemble a reservoir of hyphal biomass which might allow regeneration if the epilithic thallus is damaged by stressors as UVR and abrasion. This is stressed by the fact that a second, morphologically distinct type of algal partner is found to be located in the basal zone, suggesting not only a regenerative capacity of the mycobiont but also of an alternative photoautotrophic partner.

General Aspects All investigated lichens reveal the same anatomical blueprint of a heteromerous thallus (Jahns 1988; Büdel and Scheidegger 1996) but show diverging sets of morphological-anatomical traits represented by the presence and properties of different strata and anatomical structures. Besides other factors (poikilohydry, SLCs), the results indicate that these traits help to explain lichen extremotolerance towards abiotic factors as well as their resistance towards space and Mars parameters (de Vera et al. 2003, 2004a, b, 2007, 2008, 2010; de la Torre et al. 2004; 2007; Sánchez et al. 2012). From a morphological point of view, in *B. frigida*, *R. geographicum*, and *X. elegans* the combination of cortex (with varying SLCs), algal arrangement, and mucilage seems to be fundamental to constitute resistance, while in *C. gyrosa* the subcortex seems to play a crucial role, as well as the rhizine-like strands in *P. chlorophanum*.

All lichens tested to date showed high viability in astrobiological experiments. However, experimental attempts to test the protective effects of the distinct morphological and anatomical thallus structures are scarce. In UV-exposure experiments ($\lambda > 160$ nm) with *X. elegans* and *F. bracteata*, lichen thalli with intact and with removed cortex were compared (de Vera et al. 2003). Samples with removed cortex showed a loss in viability of 15–35 % in *X. elegans* and 15–40 % in *F. bracteata* indicating a protective effect of the cortex. In the LITHOPANSPERMIA experiment, *R. geographicum* and *X. elegans* were exposed to space with intact and with removed or depigmented cortices, respectively (de la Torre et al. 2010a), revealing a post-flight reduction of PSII activity of 6.9–81 % in *R. geographicum* and of 0.1–43 % in *X. elegans*. Comparing the effect of removed (*R. geographicum*) and depigmented (*X. elegans*) cortices, a more severe effect is found if the cortex is removed. However, such results do not help much to separate the protective effect of the cortex itself and the adjacent SLCs, as both lichens also reveal anatomical differences in terms of cortical structure (Table 2) and algal arrangement. Nonetheless, the high viability in both studies indicates additional protective features, e. g. as discussed above. In *C. gyrosa*, the post-flight reduction of PSII activity was low (0–4.5 %, de la Torre et al. 2010a) what might be correlated to the protective effect of its extended subcortex, as its cortex is supposed to lack sufficient amounts of SLCs (Raggio et al. 2011). The differences in the reduction of PSII activity in *X. elegans* and *R. geographicum* after the LIFE experiment are evident (Onofri et al. 2012). Post-flight dark control samples of *X. elegans* showed a reduction of PSII activity of 2 % and irradiated post-flight samples showed a reduction of about 55 %, in *R. geographicum* the reduction is 97.5 % and 99.5 %, respectively. What morphological-anatomical features of *X. elegans* might help to explain such difference? Especially as both lichens are crustose, form pigmented cortices of about 20 μm thickness, and bear a photobiont of the same genus (*Trebouxia*). Besides the different predominant SLCs in both

lichens (parietin in *X. elegans* compared to rhizocarpic acid in *R. geographicum*), two features may give an explanation: the additional 20 μm -wide paraplectenchymatous cortex and the densely clustered photobiont cells, presumably shielding each other more effectively than the aligned photobiont cells in *R. geographicum*. Nonetheless, a different level of desiccation resistance among the exposed lichen species is also supposed to contribute to the diverging survival rates.

The present study shows that generalizations concerning the resistance of lichens towards extreme conditions have to be avoided. The differences reflect the diverging evolutionary histories of their lineages which led to different adaptations to the respective ecological niches (Jahns 1988). Such adaptations enable the symbiosis to successfully cope with prevalent abiotic stressors and support its persistence in extreme habitat. Alpine and polar regions are characterized by high levels of insolation and the dominance of lichens in these regions can be explained by their ability to endure UVR (Solhaug and Gauslaa 2004). Several studies highlight the mycobiont to be more resistant towards UVR-exposure than the photobiont (de la Torre et al. 2002; de Vera et al. 2008; de Vera and Ott 2010; de Vera 2012), and thus protects the photosynthesizing partner. Nonetheless, studies with isolated mycobionts stress that undifferentiated axenic fungal tissue is more susceptible to the damaging effects of UVR than complete lichen thalli (de Vera and Ott 2010). These results give a clear hint on the importance of distinct differentiated thallus structures—as demonstrated in the present study—rather than mere fungal biomass.

Acknowledgments The authors would like to express their sincere gratitude to the German Federal Ministry of Economics and Technology (BMWi) and the German Aerospace Center (DLR) for funding the work of Joachim Meeßen (50BW1153) and Annette Brandt (50BW1216), to the Spanish Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial (INTA) for granting a PhD scholarship to Francisco Javier Sánchez Iñigo, and to the German Aerospace Center (DLR) for supporting the ESA-space experiment BIOMEX (ILSRA ESA-ILSRA 2009–0834, P-I Dr. J.-P. de Vera). Samples of *B. frigida* and *P. chlorophanum* were collected by S. Ott during the GANOVEX 10 expedition which was funded by the German Research Foundation (DFG, OT 96/10-3) in the framework of the Antarctic Priority Program 1158. We would also like to thank the reviewers for their comments and suggestions. Results of this study were presented on the 12th European Workshop on Astrobiology (P6.16, EANA 2012).

References

- Bačkor M, Fahselt D (2008) Lichen photobionts and metal toxicity. *Symbiosis* 46:1–10
- Belnap J, Büdel B, Lange OL (2001) Biological soils crusts: characteristics and distribution. *Ecol Stud* 150:3–31
- Büdel B, Scheidegger C (1996) Thallus morphology and anatomy. In: Nash TH III (ed) *Lichen biology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 37–64
- Carlile MJ (1995) The success of hypha and mycelium. In: Gow NAR, Gadd GM (eds) *The growing fungus*. Chapman & Hall, London, pp 3–19
- de la Torre R, Horneck G, Sancho LG, Scherer K, Facius R, Urlings T, Rettberg P, Reina M, Pintado A (2002) Photoecological characterisation of an epilithic ecosystem at a high mountain locality (Central Spain). *Proceedings of Second European Workshop on Exo/Astrobiology*. ESA SP-518, ESA Publications Division, ESTEC, Noordwijk, pp 443–445
- de la Torre R, Horneck G, Sancho LG, Pintado A, Scherer K, Facius R, Deutschmann U, Reina M, Baglioni P, Demets R (2004) Studies of lichens from high mountain regions in outer space: The BIOPAN experiment. *Proceedings of the third European Workshop on Astrobiology*. ESA SP-545, ESA Publications Division, ESTEC, Noordwijk, pp 193–194
- de la Torre NR, Sancho LG, Pintado A, Rettberg P, Rabbow E, Panitz C, Deutschmann U, Reina M, Horneck G (2007) BIOPAN experiment LICHENS on the Foton M2 mission: Pre-flight verification tests of the *Rhizocarpon geographicum*-granite ecosystem. *Adv Space Res* 40(11):1665–1671

- de la Torre R, Sancho LG, Horneck G, de los Ríos A, Wierzchos J, Olsson-Francis K, Cockell C, Rettberg P, Berger T, de Vera JP, Ott S, Frías JM, Gonzalez PM, Lucas MM, Reina M, Pintado A, Demets R (2010a) Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions—Results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus* 208(2):735–748
- de la Torre R, Martínez-Frías J, Mateo-Martí E, Sánchez Iñigo FJ, Sancho LG, Horneck G (2010b) Are lichens and cyanobacteria suitable candidates to test the theory of lithopanspermia? *EGU General Assembly*. *Geophys Res Abstr* 10:EGU2010–EGU14713
- de Vera JP (2005) Grenzen des Überlebens: Flechten als Modellorganismen für das Potential von Adaptationsmechanismen unter Extrembedingungen. Dissertation at the Heinrich-Heine University, ULB Düsseldorf, 1–180
- de Vera JP (2012) Lichens as survivors in space and on Mars. *Fungal Ecol* 5:472–479
- de Vera JP, Ott S (2010) Resistance of symbiotic eukaryotes. Survival to simulated space conditions and asteroid impact cataclysms. In: Seckbach J, Grube M (eds) *Symbioses and stress: Joint ventures in biology*. Cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology 17:595–611
- de Vera JP, Horneck G, Rettberg P, Ott S (2003) The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *Int J Astrobiol* 1:285–293
- de Vera JP, Horneck G, Rettberg P, Ott S (2004a) The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space II: germination capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions. *Adv Space Res* 33:1236–1243
- de Vera JP, Horneck G, Rettberg P, Ott S (2004b) In the context of panspermia: May lichens serve as shuttles for their bionts in space? Proceedings of the third European Workshop on Astrobiology. ESA SP-545, ESA Publications Division, ESTEC, Noordwijk, pp 197–198
- de Vera JP, Tilmes F, Heydenreich T, Meyer C, Horneck G, Ott S (2007) Potential of prokaryotic and eukaryotic organisms in Mars-like environments and as a reference system for the search of life on other planets. Proceeding of DGLR Int. Symp. To the Moon and beyond (available as CD)
- de Vera JP, Rettberg P, Ott S (2008) Life at the limits: capacities of isolated and cultured lichensymbionts to resist extreme environmental stresses. *Orig Life Evol Biosph* 38:457–468
- de Vera JP, Möhlmann D, Butina F, Lorek A, Wernecke R, Ott S (2010) Survival potential and photosynthetic activity of lichens under Mars-like conditions: a laboratory study. *Astrobiology* 10(2):215–227
- de Vera JP, Schulze-Makuch D, Khan A, Lorek A, Koncz A, Möhlmann D, Spohn T (2012) The adaptation potential of extremophiles to Martian surface conditions and its implication for the habitability of Mars. *EGU General Assembly*, p 2113
- Dyer P, Crittenden P (2008) Antarctic lichens: life in the freezer. *Microbiol Today* 2008:74–77
- Elasri MO, Miller RV (1999) Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Appl Environ Microbiol* 65(5):2025–2031
- Ertl L (1951) Über die Lichtverhältnisse in Laubflechten. *Planta* 39:245–270
- Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ (2007) The EPS matrix: the house of biofilm cells. *J Bacteriol* 189:7945–7947
- Harańczyk H, Pytel M, Pater Ł, Olech A (2008) Deep dehydration resistance of antarctic lichens (genera *Umbilicaria* and *Ramalina*) by proton NMR and sorption isotherm. *Antarctic Science*. Cambridge University Press, Vol. 20(06):527–535
- Henssen A, Jahns HM (1974) *Lichenes. Eine Einführung in die Flechtenkunde*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp 11–71
- Honegger R (1992) Lichens: Mycobiont-photobiont relationships. In: Reisser W (ed) *Algae and symbioses*. Biopress Limited, Bristol, pp 255–276
- Horneck G, Stöffler D, Ott S, Hornemann U, Cockell CS, Moeller R, Meyer C, de Vera JP, Fritz J, Schade S, Artemieva NA (2008) Microbial rock inhabitants survive hypervelocity impacts on Mars-like host planets: first phase of lithopanspermia experimentally tested. *Astrobiology* 8(1):17–44
- Huneck S, Yoshimura I (1996) Identification of lichen substances. Springer, Berlin, pp 1–9
- Jahns HM (1988) The lichen thallus. In: Galun M (ed) *CRC handbook of lichenology*. Vol. I. CRC Press, Boca Ranton, pp 95–143
- Kappen L (1973) Environmental response and effects. Response to extreme environments. In: Ahmadjian V, Hale ME (eds) *The lichens*. Academic, New York, pp 346–348
- Kappen L (1988) Ecophysiological relationships in different climatic regions. In: Galun M (ed) *CRC handbook of lichenology*, Vol. II. CRC Press, Boca Ranton, pp 37–99
- Kappen L (1993) Plant activity under snow and ice, with particular reference to lichens. *Arctic* 46(4):297–302
- Kranner I, Cram WJ, Zorn M, Wornik S, Yoshimura I, Stabentheiner E, Pfeifhofer HW (2005) Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *PNAS* 102(8):3141–3146

- Lange OL (1992) Pflanzenleben unter Stress. Echter Würzburg Fränkische Gesellschaftsdruckerei und Verlag, Würzburg, pp 213–217
- Lange OL, Green TGA, Reichenberger H (1999) The response of lichen photosynthesis to external CO₂ concentration and its interaction with thallus water-status. *J Plant Physiol* 154:157–166
- Lange OL, Green TGA, Heber U (2001) Hydration-dependent photosynthetic production of lichens: what do laboratory studies tell us about field performance. *J Exp Bot Plants under Stress Special Issue* 52(363):2033–2042
- Lütz C, Seidlitz HK, Meindl U (1997) Physiological and structural changes in the chloroplast of the green alga *Micrasterias denticulata* induced by UV B simulation. *Plant Ecol* 128:55–64
- Marchant DR, Head JW III (2007) Antarctic dry valleys: microclimate zonation, variable geomorphic processes, and implications for assessing climate change on Mars. *Icarus* 192:187–222
- Mc Evoy M, Nybakken L, Solhaug KA, Gauslaa Y (2006) UV triggers the synthesis of the widely distributed secondary lichen compound usnic acid. *Mycol Prog* 5:221–229
- McKay CP, Friedmann EI, Gomez-Silva B, Caceres-Villanueva L, Andersen DT, Landheim R (2003) Temperature and moisture conditions for life in the extreme arid region of the Atacama Desert: Four years of observations including the El Nino of 1997–1998. *Astrobiology* 3(2):393–406
- Nybakken L, Solhaug KA, Bilger W, Gauslaa Y (2004) The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats. *Oecologia* 140:211–216
- Onofri S, de la Torre R, de Vera JP, Ott S, Zucconi L, Selbmann L, Scalzi G, Vankateswaran KJ, Rabbow E, Sánchez Iñigo FJ, Horneck G (2012) Survival of rock-colonizing organisms after 1.5 years in outer space. *Astrobiology* 12(5):508–516
- Ortega-Retuerta E, Passow U, Duarte CM, Reche I (2009) Effects of ultraviolet B radiation on (not so) transparent exopolymer particles. *Biogeosci Discuss* 6:7599–7625
- Øvstedal DO, Lewis Smith RI (2001) Lichens of Antarctica and South Georgia. A guide to their identification and ecology. Cambridge University Press, Cambridge, pp 66–365
- Raggio J, Pintado A, Ascaso C, de la Torre R, de los Ríos A, Wierzchos J, Horneck G, Sancho LG (2011) Whole lichen thalli survive exposure to space conditions: results of lithopanspermia experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* 11(4):281–292
- Sadowsky A, Hussner A, Ott S (2012) Submersion tolerance in a habitat of *Stereocaulon paschale* (Stereocaulaceae) and *Cladonia stellaris* (Cladoniaceae) from the high-mountain region Rondane, Norway. *Nova Hedwig* 94(3–4):1–12
- Sánchez FJ, Mateo-Martí E, Raggio J, Meeßen J, Martínez-Frías J, Sancho LG, Ott S, de la Torre R (2012) The resistance of the lichen *Circinaria gyrosa* (nom. provis.) towards simulated Mars conditions—a model test for the survival capacity of an eukaryotic extremophile. *Planet Space Sci* 72(1):102–110
- Sancho LG, Schroeter B, del Prado R (2000) Ecophysiology and morphology of the globular erratic lichen *Aspicilia fruticulosa* (Eversm.) Flag. from Central Spain. *Bibl Lichenologica* 75:137–147
- Sancho LG, de la Torre R, Horneck G, Ascaso C, de los Ríos A, Pintado A, Wierzchos J, Schuster M (2007) Lichens survive in space: results from 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology* 7(3):443–454
- Sancho LG, de la Torre R, Pintado A (2008) Lichens, new and promising material from experiments in astrobiology. *Fungal Biol Rev* 22:103–109
- Scalzi G, Selbmann L, Zucconi L, Rabbow E, Horneck G, Albertano P, Onofri S (2012) LIFE Experiment: isolation of cryptoendolithic organisms from Antarctic colonized sandstone exposed to space and simulated Mars conditions on the International Space Station. *Orig Life Evol Biosph* 42:253–262
- Sohrabi M (2012) Taxonomy and phylogeny of the manna lichens and allied species (*Megasporaceae*). PhD thesis, Publications in Botany from the University of Helsinki. <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-10-7400-4>
- Solhaug KA, Gauslaa Y (1996) Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina*. *Oecologia* 108:412–418
- Solhaug KA, Gauslaa Y (2004) Photosynthates stimulate the UV-B induced fungal anthraquinone synthesis in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. *Plant Cell Environ* 27:167–178
- Stöffler D, Horneck G, Ott S, Hornemann U, Cockell CS, Moeller R, Meyer C, de Vera JP, Fritz J, Artemieva NA (2007) Experimental evidence for the potential impact ejection of viable microorganisms from Mars and Mars-like planets. *Icarus* 189:585–588
- Sun HJ, Nienow JA, McKay CP (2010) The antarctic cryptoendolithic microbial ecosystem. In: Doran PT, Lyons WB, McKnight DM (eds) Life in Antarctic deserts and other cold dry environments—astrobiological analogs. Cambridge University Press, Cambridge, pp 110–138

5.2 Viability of the lichen *Xanthoria elegans* and its symbionts after 18 months of space exposure and simulated Mars conditions on the ISS

A. Brandt, J.-P. de Vera, S. Onofri & S. Ott

International Journal of Astrobiology (2015): 14 (3), 411-425

Impact Factor 1,256 (2015)

Der Artikel wurde vollständig vom Erstautor verfasst.

Viability of the lichen *Xanthoria elegans* and its symbionts after 18 months of space exposure and simulated Mars conditions on the ISS

Annette Brandt¹, Jean-Pierre de Vera², Silvano Onofri³ and Sieglinde Ott¹

¹Institute of Botany, Heinrich-Heine-University, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany

²Institute of Planetary Research, German Aerospace Center (DLR), Rutherfordstr. 2, 12489 Berlin, Germany

³Department of Ecological and Biological Sciences (DEB), Tuscia University, Largo dell'Università, 01100 Viterbo, Italy
e-mail: ott@uni-duesseldorf.de

Abstract: The lichen *Xanthoria elegans* has been exposed to space conditions and simulated Mars-analogue conditions in the lichen and fungi experiment (LIFE) on the International Space Station (ISS). After several simulations and short space exposure experiments such as BIOPAN, this was the first long-term exposure of eukaryotic organisms to the hostile space conditions of the low Earth orbit (LEO). The biological samples were integrated in the EXPOSE-E facility and exposed for 1.5 years outside the ISS to the combined impact of insolation, ultraviolet (UV)-irradiation, cosmic radiation, temperatures and vacuum conditions of LEO space. Additionally, a subset of *X. elegans* samples was exposed to simulated Martian environmental conditions by applying Mars-analogue atmosphere and suitable solar radiation filters. After their return to Earth the viability of the lichen samples was ascertained by viability analysis of LIVE/DEAD staining and confocal laser-scanning microscopy, but also by analyses of chlorophyll *a* fluorescence. According to the LIVE/DEAD staining results, the lichen photobiont showed an average viability rate of 71%, whereas the even more resistant lichen mycobiont showed a rate of 84%. Post-exposure viability rates did not significantly vary among the applied exposure conditions. This remarkable viability is discussed in the context of particular protective mechanisms of lichens such as anhydrobiosis and UV-screening pigments.

Received 10 February 2014, accepted 10 June 2014, first published online 24 July 2014

Key words: astrobiology, insolation, Lithopanspermia, mycobiont, photobiont, UV-resistance.

Introduction

Challenging effects of global transitions and a vast range of terrestrial ecological niches resulted in an enormous capacity of life to resist hostile environmental conditions and a broad range of adaptive mechanisms. To assess this resistance in the context of space conditions, numerable exposure- and simulation-experiments were conducted with micro-organisms originating from extreme arid, alpine and polar regions, including bacteria, biofilms, cryptoendolithic fungi and lichen symbioses (Onofri *et al.* 2004; de Vera *et al.* 2004a, b; de Vera *et al.* 2008; Hájek *et al.* 2012; Sadowsky & Ott 2012; Baqué *et al.* 2013).

The study presented focuses on the lichen *Xanthoria elegans* (Link) Th.Fr. Lichens are symbiotic associations of photoautotrophic green algae or cyanobacteria (photobiont, PB) and heterotrophic fungi (mycobiont, MB). Lichen symbioses are characterized by high resistance to severe environmental conditions (Lange & Kappen 1972; Kappen 1985; Hawksworth 1988; Lange 1990). Lichens developed a broad range of anatomical, morphological and physiological adaptations (Lange & Kappen 1972; Ott & Sancho 1991; Sadowsky &

Ott 2012; Meeßen *et al.* 2013a, b). Moreover, all lichens are poikilohydric with the ability for anhydrobiosis (also called anabiosis), an inactive state of latent life while being desiccated (Crowe *et al.* 1992). Additionally, they frequently produce high amounts of secondary lichen compounds (Huneck & Yoshimura 1996) which may provide protection against ultraviolet (UV) irradiation and/or excess photosynthetically active radiation (Solhaug & Gauslaa 1996; Nybakken *et al.* 2004; Kranner *et al.* 2005). These adaptive traits enable the lichen symbiosis to colonize all biomes on Earth and adapt to the harsh environmental conditions of extreme habitats such as deserts, alpine and polar regions (aridity, cold, freeze–thaw cycles, high insolation) where they occasionally form the dominant vegetation (Kappen *et al.* 1996; Kappen & Schroeter 1997; Kappen 2000; Sadowsky & Ott 2012). Owing to these adaptations, lichens found some attention in astrobiological research (de Vera *et al.* 2003, 2004a, 2008, 2010; de la Torre *et al.* 2007, 2010a, b; Sancho *et al.* 2007; Stöffler *et al.* 2007; Horneck *et al.* 2008; de Vera & Ott 2010; Raggio *et al.* 2011; Onofri *et al.* 2012; Sánchez *et al.* 2014) and were supposed to be astrobiological model organisms (Sancho *et al.* 2008).

Prior to the lichen and fungi experiment (LIFE) on the International Space Station (ISS) the lichen species *X. elegans* was investigated in several experiments not only under real (LITHOPANSPERMIA on BIOPAN 6; de la Torre *et al.* 2010b; Raggio *et al.* 2011) but also under simulated space conditions that included stressors as desiccation, low Earth orbit (LEO)-vacuum of 10^{-5} Pa, sub-zero temperatures, solar irradiation, cosmic radiation and shock pressure impacts (de Vera *et al.* 2003, 2004a, b; Stöffler *et al.* 2007; Horneck *et al.* 2008; Sancho *et al.* 2008; de Vera & Ott 2010; Meyer *et al.* 2011). The studies demonstrated the high resistance of *X. elegans* towards hostile conditions and assessed the limits of life for extremotolerant organisms. Entire *X. elegans* thalli were neither significantly damaged by the combined influences of UV radiation (UVR) ($\lambda > 160$ nm; 2.8 W m^{-2} , 16 h) and vacuum up to 10^{-3} Pa (de Vera *et al.* 2003) nor by the combined influences of UVR ($\lambda = 200$ nm; 3.8 GJ m^{-2}) and vacuum up to 10^{-5} Pa (de Vera *et al.* 2004b), with survival rates ranging between 95 and 50%, depending on the stressors applied. Additionally, *X. elegans* symbiont cells survived hypervelocity impacts up to 45 GPa (Horneck *et al.* 2008). Based on the knowledge achieved in simulation experiments and 10 days LEO-exposure (BIOPAN 6) on the resistance of *X. elegans* to hostile conditions the next step was to test its ability to survive a long-term exposure to the combined conditions including the cosmic radiation of LEO-space. Consequently, it was chosen for LIFE to be exposed to real space and simulated Mars conditions for about 18 months (559 days). LIFE was intended to test the ability of the micro-organisms to resist the space conditions of LEO and to assess the habitability of Mars' atmosphere for micro-organisms. Recent literature discusses the putative habitability of micro-niches on Mars (Westall 2013). It was one of the objectives of LIFE to study this possibility.

LIFE is the first experiment to expose lichens and – in parallel – its isolated MB for long-term duration (> 1 year) to LEO-space and to Mars-analogue conditions. The samples were exposed in the EXPOSE-E facility which was specifically designed for astrobiological research (Rabbow *et al.* 2012) and located on the European Columbus Module of the ISS.

The scientific objective of the present study is to analyse the viability of both *X. elegans* symbionts after LEO-space exposure and simulated Martian environmental conditions, to investigate differences between the exposure conditions, to characterize the extend and pattern of potential damages, to correlate the present results to previous studies and to assess the contribution of lichen-specific protective mechanisms to post-exposure viability. Both, the space-exposed samples as well as the Mars simulation samples experienced three irradiation regimen at the ISS: one sub-set was exposed to the full spectrum of solar and cosmic irradiation, including ionizing radiation of different sources (refer to Berger *et al.* 2012), for a second sub-set the insolation was filtered down to 0.1%, whereas a third sub-set was kept dark in the interior of the EXPOSE-E facility. A corresponding set of samples was exposed to conditions simulating as similar as possible the environmental conditions of the ISS exposure experiment,

according to the data received from the EXPOSE-E facility at the ISS. The simulation was performed at the DLR in Cologne, herein referred to as Mission Ground Reference (MGR; Rabbow *et al.* 2012).

Preliminary results of LIFE were already presented (Onofri *et al.* 2012), while the present study focuses on the viability of *X. elegans* as an entire thallus and the effects of the long-term exposure. Post-flight viability of the lichen samples was examined by LIVE/DEAD analysis, using FUN-1[®] staining and confocal laser-scanning microscopy (CLSM) analysis. The two-colour fluorescent cell-dye method allows the assessment of viability by membrane integrity and metabolic activity (Millard *et al.* 1997). In addition, chlorophyll *a* fluorescence analyses confirmed the viability of the lichen's PB by providing insight to the photosynthetic capacity in its photosystem II (Lange *et al.* 1989; Schroeter *et al.* 1992).

The Lithopanspermia hypothesis (based on a proposal by Thomson, 1871) was revisited recently (Sancho *et al.* 2007; Stöffler *et al.* 2007; Horneck *et al.* 2008, 2010; de la Torre *et al.* 2010b) especially after several meteorites originating from Mars had been found and studied (Melosh 1984; Shuster & Weiss 2005). The hypothesis implies the transfer of organisms on their host rock through space, and the seeding of life on a new planet, compelling the organisms to survive the impact-driven ejection, an interplanetary travel and an atmospheric re-entry after being captured by a planet's gravity. In the context of this hypothesis, several organisms were tested on their ability to survive shock pressures (Horneck *et al.* 2008), space conditions and a re-entry (de la Torre *et al.* 2010a; de Vera *et al.* 2010; Raggio *et al.* 2011; Onofri *et al.* 2012). Since the lichens *X. elegans*, *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa* were part of this series of experiments (space exposure experiments LITHOPANSPERMIA, LICHENS I, LICHENS II and STONE at BIOPAN 4–6 on FOTON 2–3, 2002–2005; Sancho *et al.* 2007; de la Torre *et al.* 2010b), the present experiment on *X. elegans* contributes to the debate on the likelihood of lithopanspermia by revealing the long-term survival of symbiotic eukaryotes to the conditions of space exposure.

Material and methods

Lichen samples

X. elegans (Link) Th. Fr. (1860) is a cosmopolitan lichen colonizing various harsh habitats, including alpine (up to 7000 m a.s.l. in Himalaya), maritime and continental Antarctic inland sites (Øvstedal & Lewis Smith, 2001). It is frequent on volcanic, silicate and limestone rock, at nitrophilic sites, and on anthropogenic substrata like concrete. *X. elegans* is usually exposed to high levels of insolation (Solhaug & Gauslaa 1996, 2004; de Vera 2005). The thalli of *X. elegans* used in the present study were collected in June 2008 at Col du Sanetsch, Valais, Switzerland (46°21'48"N, 07°17'51"E, at 2140 m a.s.l.) and adjacent collection sites (Zermatt, 46°00'N, 07°71'E, at 1950 m a.s.l.), air-dried and frozen at -20 °C until further use. Samples originating from these collection sites were used in

Table 1. Experimental parameters of the LIFE experiment. The irradiance at the sample site over the full spectrum are shown as average of the three distinct slots used for *Xanthoria elegans* samples (*) as calculated by Redshift (Redshift Protocol 2011). The irradiance for UVC (100–280 nm), UVB (280–315 nm), UVA (315–400 nm) and PAR (300–700 nm) are given in MJ m⁻². Please mind the overlap of UVA and PAR. The last row shows the UV-fluence_(200–400 nm) as calculated by Rabbow et al. (2012). Data are calculated for the middle of the sample site (Red Shift Protocol 2011).

Space conditions		Mars-analogue conditions			
10 ⁻⁴ –10 ⁻⁷ Pa		10 hPa			
208 ± 8 mGy		215 ± 16 mGy			
Top layer, MgF ₂ window (110 nm < λ > 1 mm)		Bottom layer	Top layer, quartz window (200 nm < λ > 1 mm)		Bottom layer
Full insolation 4873 MJ m ⁻² *	0.1% neutral density insolation 6.30 MJ m ⁻² *	Dark exposure 0 MJ m ⁻²	Full insolation 4799 MJ m ⁻² *	0.1% neutral density insolation 5.90 MJ m ⁻² *	Dark exposure 0 MJ m ⁻²
UVC: 13.8	UVC: 0.009	UVC: –	UVC: 17.8	UVC: 0.010	UVC: –
UVB: 41.2	UVB: 0.040	UVB: –	UVB: 46.8	UVB: 0.037	UVB: –
UVA: 236	UVA: 0.23	UVA: –	UVA: 249	UVA: 0.21	UVA: –
PAR: 2185	PAR: 2.55	PAR: –	PAR: 2227	PAR: 2.44	PAR: –
634 MJ m ⁻²	0.92 MJ m ⁻²	0 MJ m ⁻²	475 MJ m ⁻²	0.63 MJ m ⁻²	0 MJ m ⁻²

astrobiological studies before (de Vera *et al.* 2003, 2004a, b, 2007, 2008, 2010; Stöffler *et al.* 2007; Horneck *et al.* 2008).

Methods

Sample handling

Thalli were drilled off their stone substrata with a sample of diameter 7 mm. A maximum quantum yield (Fv/Fm) measurement of photosystem II (mini-PAM, Walz, Germany) was performed before further processing to ensure the photosynthetic activity as a measure of the PB's vitality. Samples for the exposure experiment at the ISS and for the MGR were air-dried on orange silica gel and glued into the sample slots of the EXPOSE-E facility. The slots were sealed by an MgF₂ or a quartz window with respect to the experimental conditions, for details refer to Rabbow *et al.* (2012).

After the exposure the ISS samples were removed from the EXPOSE-E facility at the DLR Cologne and mounted carefully in glass flasks separately, re-distributed to the investigators (including the MGR samples) and stored at –20 °C until further investigation.

Exposure parameters

The LIFE applied six experimental conditions to overall 24 lichen and fungi samples (Table 1): 12 samples were exposed to space vacuum (tray 1) and 12 to a Mars-analogue atmosphere (tray 2). On the one hand tray 1 exposed its samples to 10⁻⁴–10⁻⁷ Pa LEO space vacuum and provided them three intensities of solar radiation (dark, 0.1% neutral density filtered and full insolation with a wavelength range of 110 nmλ1 mm; samples covered with MgF₂ windows). On the other hand, tray 2 supplied simulated Mars conditions with a 10³ Pa atmosphere (consisting of 95.3% CO₂, 2.7% N₂, 1.6% Ar, 0.15% O₂ and ~370 ppm water vapour) and also three intensities of solar irradiation (dark, 0.1% neutral density filtered and full insolation with a wavelength range of

200 nmλ1 mm; samples covered by quartz windows). The reduced solar intensities were realized by additional neutral density filters, covering half of the sample slots of the trays' top layer and reducing the samples irradiation by the factor of 1000 while the dark-exposed samples were situated directly below the insulated top layer (Rabbow *et al.* 2012). Fully insulated samples accumulated an average of 4800 MJ m⁻² photon energy input; 0.1% neutral density filtered samples accumulated 6.3 MJ m⁻² photon energy in space vacuum or 5.9 MJ m⁻² in Mars-analogue conditions (Table 1). Ionizing radiation was measured by passive detectors and its quality was evaluated and related to the sample positions (Berger *et al.* 2012; Dachev *et al.* 2012; Schuster *et al.* 2012). The samples experienced 208 ± 8 mGy (tray 1) and 215 ± 16 mGy (tray 2) of ionizing radiation from different sources (galactic cosmic rays, South Atlantic Anomaly, secondary radiation produced in the hardware, refer to Berger *et al.* 2012.) The temperature ranged from –21.7 to +43 °C, with a one-time maximum of 61 °C for a few hours (Rabbow *et al.* 2012). The EXPOSE-E facility was mounted outside the Columbus Module and its lids and valves were opened between 20th February 2008 and 20th August 2009, exposing the samples for 559 days. Owing to off-nominal events during the mission about 20% of the expected environmental data were lost. To assure a precise analysis of the samples' exposure conditions the solar irradiation was recalculated (RedShift Report 2011) leading to the average accumulated irradiance (as experienced by the samples) shown in Table 1.

LIVE/DEAD staining

The LIVE/DEAD staining was performed with the fluorescent dye FUN-1[®] (Molecular Probes, Oregon, USA). The dye contains fluorophores excitable at 488 nm and changing their emission properties when metabolized. By up-taking the dye each cell achieves fluorescent labelling, detectable in the green channel (band-pass 505–550 nm), while only metabolically

active cells obtain a bright yellow to red emission with a vacuolar deposit of the dye (band-pass 575–615 nm, for details refer to Millard *et al.* 1997). For the quantification of active and inactive cells parts of the samples were wetted, cross-sectioned into slices of 80–160 μm with a cryotome (Reichert-Jung, Germany) and immediately dyed on a microscope slide. The FUN-1[®] solution was composed of 20 μM FUN-1[®] in HEPES buffer (pH 7; 1.0 μl in 1 ml). The dyeing protocol followed the producer's manual, except an altered and prolonged incubation time with respect to the algal cell wall which was found to slow down the uptake of staining solution. The dyed samples were examined by CLSM (LSM 510 Meta, Zeiss, Germany), to verify the metabolic activity of the MB and the PB of *X. elegans*. For analysis, 6–15 pictures were taken for each sample with a 1.0–2.0 pinhole opening and amplifier values according to the fluorescence signal intensity (400–800; equal for the red and green channel). The measured emission for the picture composition was according to the emission maxima of the fluorophores: green channel (signals of inactive cells) and red channel (signals of metabolically active cells). Besides these channels, PB cells were additionally marked by their chlorophyll auto-fluorescence for better discrimination, displayed in a blue channel (band-pass 660–750 nm).

The CLSM-pictures were analysed for metabolically active (interpreted as alive) and metabolically inactive (interpreted as dead) cells by manual counting, using an ImageJ counting tool (cell counter, ImageJ, W. Rasband, NIH, USA). Manual counting was necessary due to PB cell artefacts. These cells which showed bright yellow fluorescence active cells but no vacuolar deposits are misinterpreted by software-aided cell counters as active cells.

Owing to the expenses of space missions the sample quantity in space experiments is limited. Therefore not more than four replicates were available for the dark exposed and two replicates for the 0.1% neutral density filtered as well as for the fully insolated samples. The LIVE/DEAD staining procedure of each replicate included 7–29 technical replicates, gained by analysing and evaluating different sections and spots of each sample. The vital control samples were collected together with the ISS and MGR samples and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

Chlorophyll *a* fluorescence

Chlorophyll *a* fluorescence was assessed by a Mini-PAM fluorimeter (Walz, Germany) according to Jensen (2002). The maximum quantum yield (Fv/Fm) as a measure for the activity of the photosystem II is calculated as the ratio of variable fluorescence (Fv) over maximum fluorescence (Fm).

The analysis of the 16 ISS and the 16 MGR lichen samples followed three different protocols of sample re-activation prior to Mini-PAM measurement.

a) Standard protocol, applied directly before and after flight/MGR simulation: the lichen thalli were provided with 200 μl sterile water and the chlorophyll *a* fluorescence was measured 10 min afterwards. This is repeated four times to the maximum water supply of 800 μl .

- b) First re-activation protocol: 200 μl water application twice and measurements after 0, 1, 2, 3, 24 and 48 h. The samples which had been exposed in Mars-analogue conditions were additionally measured after 72 and 96 h.
- c) Second re-activation protocol: for the samples 100 and 116 (space vacuum conditions) the first re-activation was repeated after a day of air-drying, in order to emulate the wet/dry cycle of lichens in their natural environment. Again the measurements took place after 0, 1, 2, 3, 24, 48, 72 and 96 h.

Statistical analyses

Testing the data for significant difference was done with GraphPad InStat 3 software, applying an unpaired *t*-test with Welch correction, ANOVA with parametric or non-parametric testing or Mann–Whitney test with two-tailed *P* value. Correlation coefficient and standard deviations were calculated with MS excel 2010.

Abbreviations (exposure parameters)

Space: samples were exposed in space vacuum conditions; Mars ac: samples were exposed in Mars-analogue conditions; full ins.: samples experienced full solar irradiation; 0.1% ins.: solar irradiation of the samples was reduced to 0.1% of the full insolation (neutral density filter); dark exp.: samples experienced no direct insolation.

Results

After the exposure experiment both, the ISS and MGR samples appeared unaltered in colour and structure in the first visual inspections compared with untreated control samples. The viability of the lichen samples was analysed by different methods, with regard to the different cell types (PB and MB) and the structure of the lichen thallus. The LIVE/DEAD staining with FUN-1[®] was well feasible for the hyphal cells of the MB and appropriate for the coccal green algal PB. Additionally, photosynthetic activity of the PB was analysed by chlorophyll *a* fluorescence and related to the LIVE/DEAD staining results.

LIVE/DEAD staining (FUN-1[®]/CLSM)

In all samples metabolically active MB and PB cells were observed when incubated with FUN-1[®]. The samples displayed a reproducible staining pattern in CLSM analyses. The space exposed samples (ISS) and the samples exposed to simulated space conditions (MGR) as well as the control samples (stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, dark), showed equal reactions regarding up-take, and metabolization of FUN-1[®] and fluorescence signal quality. Figures 1 and 2 show the number of metabolically active PB and MB cells, respectively, displayed as percentage of total cells counted and according to the six different experimental conditions on the ISS and in the MGR. The number of replicates is given in Table 2.

The percentage rate mean values of active PB cells ranged from 43% (MGR 0.1% ins. Mars ac and MGR full ins. Mars ac) to 83% (ISS full ins. space) and for active MB cells

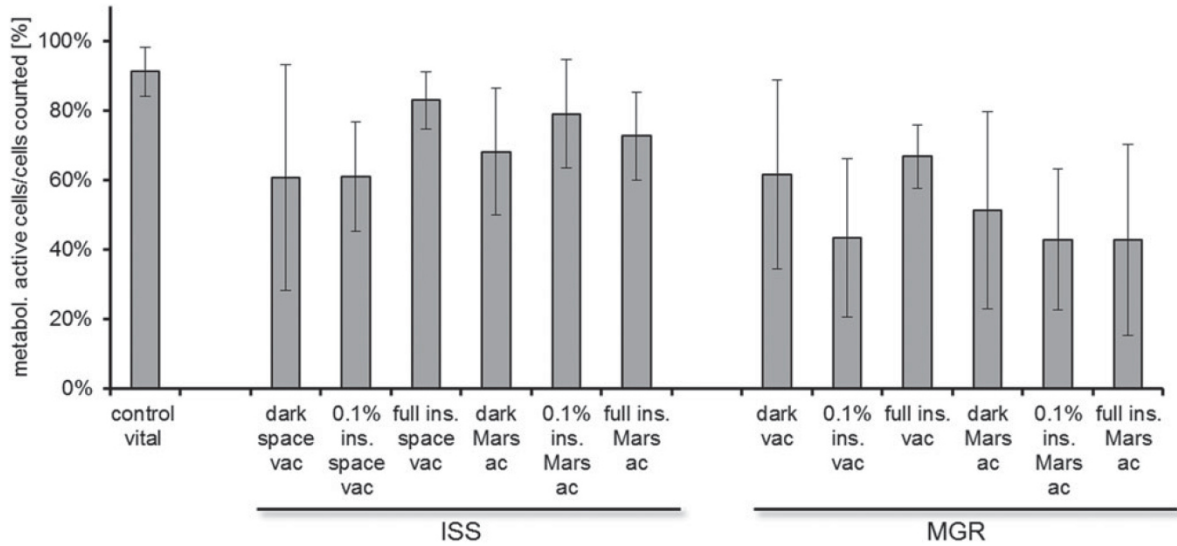


Fig. 1. LIVE/DEAD staining: metabolically active photobiont cells as percentage of cells counted, mean viability values for each sample position/ experimental condition in EXPOSE-E plus untreated control group.

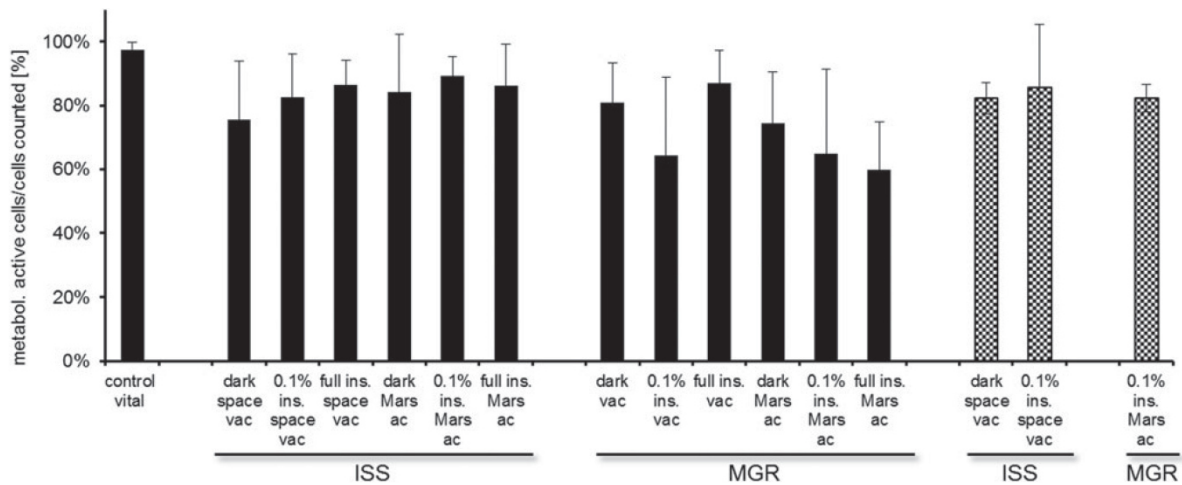


Fig. 2. LIVE/DEAD staining: metabolically active mycobiont (MB) cells as percentage of cells counted, mean viability values for each sample position/ experimental condition in EXPOSE-E plus untreated control group. Squared columns show isolated non-lichenized MB samples.

from 60% (MGR full ins. Mars ac) to 89% (ISS 0.1% ins. Mars ac).

MB hyphae appeared to be more resistant towards extreme conditions compared with PB cells which can be recognized to be deformed or collapsed in some sections. The space exposed samples showed a higher survival rate of clustered PB cells in the anatomical centre of the lichen thallus or below thick cortical structures as well as apothecia (Fig. 3). The samples revealed a remarkably high number of metabolically active cells with over-all mean values of 61% for active PB cells and of 78% for MB cells. The MB always showed higher viability percentages than the PB, while the loss of viability of both symbionts is correlated to each other under all experimental

conditions applied. Samples of the isolated non-lichenized MB were tested with the 0.1% neutral density insolation filtering and as dark exposed samples. A mean value of 83% metabolically active hyphae of the mycelium (non-lichenized MB) has been detected, which is comparable to the percentage rate mean values of active MB cells in the entire lichen thallus (mean value of 79%).

In order to evaluate the specific effect of the experimental conditions applied, the viability rates of PB, lichenized MB and non-lichenized MB were correlated to the different experimental conditions. The combined ISS and MGR viability rates of PB and MB in dependency to the three intensities of solar irradiation are illustrated in Fig. 4. There is no significant

Table 2. Cell viability: the results obtained from the EXPOSE-E samples sorted by the six different conditions applied on ISS and during MGR. Legend: space: samples experienced space vacuum; Mars ac: samples experienced Mars analogue conditions; full ins.: full insolation; 0.1% ins.: 0.1% neutral density filtered insolation; dark exp.: samples experienced no direct irradiation MV: mean value of vital cells as percentage of total cells counted, uses mean values of technical replicates; SD: standard deviation; n_{tech} , n_{biol} : number of technical and biological replicates; control vital: untreated *Xanthoria elegans* control samples, stored at -20°C .

	ISS				MGR			
	MV in %	SD	n_{tech}	n_{biol}	MV in %	SD	n_{tech}	n_{biol}
<i>Photobionts</i>								
Control vital	91.3	7.0	19	6	91.3	7.0	19	6
Dark exp., space	60.8	32.5	22	4	61.7	27.2	23	4
0.1% ins., space	61.2	15.8	7	2	43.5	22.9	14	2
Full ins., space	83.1	8.2	14	2	66.8	9.2	10	2
Dark exp., Mars ac	68.3	18.2	27	4	51.5	28.4	27	4
0.1% ins., Mars ac	79.1	15.5	13	2	43.0	20.2	7	1
Full ins., Mars ac	72.7	12.7	20	2	42.9	27.6	13	2
<i>Mycobionts</i>								
Control vital	97.4	2.3	14	6	97.4	2.3	14	6
Dark exp., space	75.7	18.4	29	4	80.8	12.6	20	4
0.1% ins., space	82.7	13.5	8	2	64.2	24.8	13	2
Full ins., space	86.6	7.7	14	2	87.1	10.3	10	2
Dark exp., Mars ac	84.3	18.0	23	4	74.3	16.4	29	4
0.1% ins., Mars ac	89.2	6.2	10	2	64.9	26.6	7	1
Full ins., Mars ac	86.2	13.1	16	2	59.8	15.2	15	2

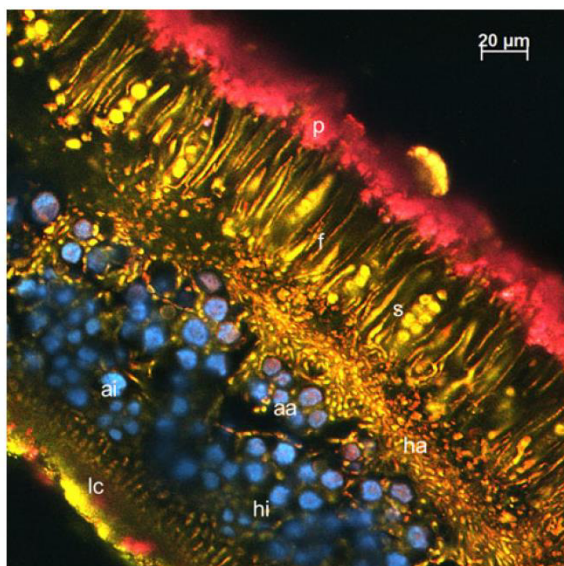


Fig. 3. *Xanthoria elegans* (cross-section) stained with FUN-1[®], documented by CLSM, ISS LIFE sample (full insolation space vacuum). p: parietin encrusted upper cortex layer; f: apothecia (fruiting body) with s: spores; fungal hyphae (MB): ha: active (vital) hyphae, hi: inactive hyphae; algal cells (PB): aa: active (vital) algae, ai: inactive algae; lc: lower cortex.

difference in the viability rates in reference to the insolation conditions. The three orders of magnitude higher energy input to unfiltered ISS or MGR samples – compared to the 0.1% neutral density filtered samples – did not elicit a significant

change of the survival rates. The dark exposed samples did not show higher viability rates while the untreated control samples showed a significantly higher amount of metabolically active cells for both MB and PB.

Additionally, the results of ISS and MGR dark-exposed samples were assembled to depict the differences between Mars-analogue and space vacuum conditions (Fig. 5). No significant differences were observed. All MGR samples showed a clear decrease in metabolic activity, compared with the control and but also compared with the ISS samples, with a minimum of 36% PB viability in one MGR sample. These results coincide with the results of the chlorophyll *a* fluorescence analyses (see below), indicating a possible negative effect of MGR-exposure on viability.

The ISS lichen samples revealed a minor decrease in activity for the cells exposed in Mars-analogue conditions. The mean values of the viability rates of the MB showed a 5.5% higher viability under Mars-analogue conditions, compared with the space vacuum MB samples. The difference is significant (two-tailed *P* value 0.0212, Mann–Whitney test). The difference of the PB viability rates resulted in an insignificant increase of 4% in favour of the Mars-analogue atmosphere. The MGR vacuum samples showed an elevated level of metabolic activity compared with those cells exposed under Mars-analogue conditions. The MB mean viability rate was 7.2% higher and the PB showed even 9.5% higher viability in the MGR vacuum, compared with the MGR Mars-analogue atmosphere. The different amount of metabolically active cells between ISS and MGR samples was tested for its significance (Mann–Whitney test). The difference is significant for the MB (two-tailed *P* value: 0.0152) and very significant for the PB (two-tailed *P* value: 0.0043).

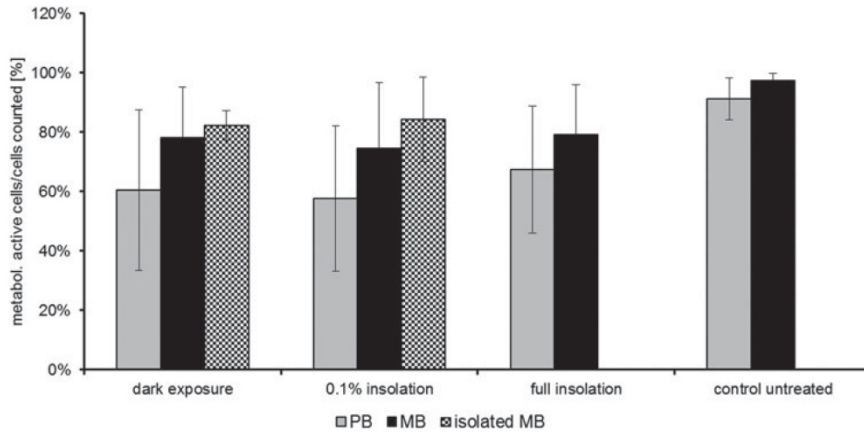


Fig. 4. Viability of ISS and MGR samples related to received photon/EM fluence (110/200 nm.l mm); viability assessed by Fun-1[®] LIVE/DEAD staining and analysed by CLSM. No significant differences occurred related to the different insolation applied.

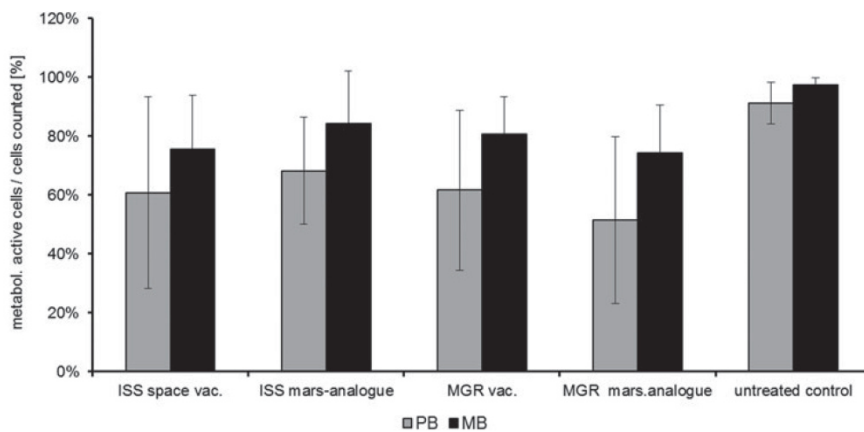


Fig. 5. Mars-analogue atmosphere versus space vacuum conditions: mean viability rates of photobiont cells and mycobiont hyphae in *X. elegans* with reference to the atmospheric conditions; dark-exposed samples.

DNA damage and cell decay caused by ionizing radiation of different sources has not been quantified yet. The measured accumulated doses of ionizing radiation (200–231 mGy) were mainly due to protons of the radiation belt which hit the ISS when it passed through the South Atlantic Anomaly (Dachev *et al.* 2012). The doses are not likely to explain viability loss of samples, because 50% of irradiated lichen algae survived doses of 90–480 Gy (10–54 kR) while fungal hyphae seemed even less sensitive to radiation (Gannutz 1972). The results of the LIVE/DEAD analyses indicate that after 1.5 year exposure in LEO a total average of 71% of the PB and 84% of the MB cells revealed metabolic activity. A less pronounced decrease of viability of MB and PB cells occurred under ISS Mars-analogue conditions. This is confirmed by a higher PS II activity of the PB exposed in ISS Mars-analogue conditions according to chlorophyll *a* fluorescence measurements as presented below.

Chlorophyll *a* fluorescence

Preliminary results of chlorophyll *a* fluorescence measurements on the post-flight viability of *X. elegans* PB have been presented before by Onofri *et al.* (2012) including also results of the lichen *R. geographicum*. Complementary, the following analysis focuses on the correlation between chlorophyll *a* fluorescence (as a marker of the PB's vitality) and the previously described results of the LIVE/DEAD analyses with regard to the experimental conditions applied and the characteristics of *X. elegans*.

The lichen samples (ISS and MGR) were measured prior to the exposure (pre-flight) and after their return (post-flight) according to a standardized measuring protocol. The mean values of the natural pre-flight values and initial post-flight measurements are given in Fig. 6. The highest post-flight Fv/Fm (= maximum quantum yield of photosystem II) value

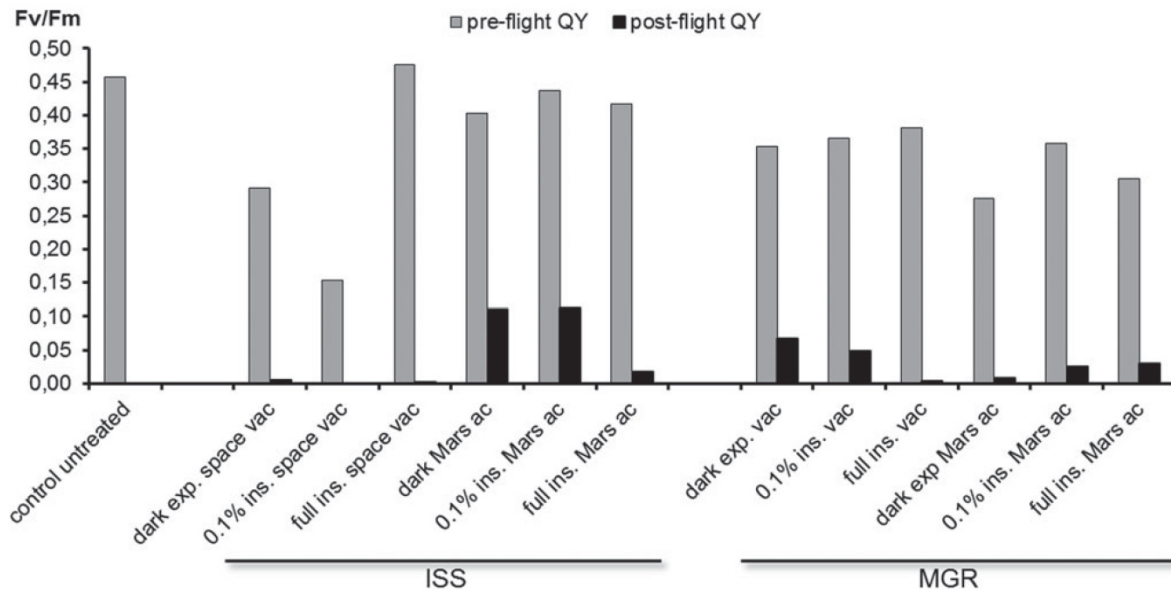


Fig. 6. Chlorophyll *a* fluorescence data of pre- and post-flight photosynthetic activity (Fv/Fm) as measured after standard protocol for each sample (ISS and MGR). The short wetting time was not sufficient for the strongly desiccated samples.

which was achieved by a single sample was 0.238 (MGR dark exp. space), followed by 0.148 and 0.129 (both ISS dark exp. Mars ac) representing 37–40% of their pre-flight Fv/Fm values. Most of the samples showed none or just a minimum of activity, defined as Fv/Fm < 0.1 in the initial post-flight measurement.

After the measurements described above, an additional re-activation was carried out two times. The first re-activation procedure enabled the strongly desiccated lichen (due to the effect of long-term space vacuum) to take up the allocated water and re-activate in a time range of 48 and 96 h. In this experiment, the number of examined samples was reduced, due to the finite sample quantity and in order to conserve sample material for different experiments to follow (e.g. DNA analyses, anatomical studies). The eight samples selected (four ISS; four MGR) showed different effects in response to the prolonged water availability. After 48 h of re-activation, four of the analysed samples indicated post-flight photosynthetic activity of the PB. Two out of these four samples revealed high Fv/Fm values (Fig. 7(a): 0.543: ISS dark exp. Mars ac; 0.621: ISS 0.1% ins. Mars ac) while two samples gave values indicating moderate photosynthetic activity (Fig. 7(a): 0.392: ISS dark exp. space and Fig. 7(b): 0.335: MGR 0.1% ins. Mars ac). The other four samples showed very low Fv/Fm values (Fig. 7(a): 0.106: ISS full ins. space; Fig. 7(b): 0.105: MGR dark exp. space, 0.000: MGR full ins. space and 0.039: MGR dark exp. Mars ac). Three out of the four samples which were exposed under Mars-analogue conditions showed increased Fv/Fm values after 96 h of re-activation (Fig. 7(a): 0.602: ISS dark exp. Mars ac; 0.641: ISS 0.1% ins. Mars ac; Fig. 7(b): 0.444: MGR 0.1% ins. Mars ac). One of the MGR samples revealed no photosynthetic activity after the prolonged re-activation period (Fig. 7(b): MGR dark exp. Mars ac).

The second re-activation procedure (Figs. 7(c): ISS samples; 7(d): MGR samples), following the same protocol as used in the first re-activation, was performed after the four space vacuum exposed samples of the first re-activation (ISS and MGR) had been desiccated again, because cycles of drying and wetting mimic the lichens' poikilohydric lifestyle. The Fv/Fm value increased by 56% for the ISS dark exp. sample. For other space vacuum samples the Fv/Fm values increased but were still remained on a low level (Fig. 7(c): 0.234: ISS full ins.; Fig. 7(d): 0.207: MGR dark exp.) after 96 h of re-activation. The MGR full ins. revealed no residual photosynthetic activity (Fig. 7(d)).

Four samples can be regarded as viable, according to the chlorophyll *a* fluorescence measurement, two samples showed reduced activity, and only two samples failed the re-activation, both of MGR. In six tests, the prolonged re-activation procedure resulted in higher Fv/Fm values, compared with the short-term activation pre- and post-flight measurements.

For three of the samples, there was a clear correlation between the re-activation procedure (wetting time, interrupted by desiccation) and a gain of measurable photosynthetic activity (Fig. 8). Thus, it is concluded that a prolonged time of re-activation procedure of multiple water supply and intermediate desiccation results in re-activation of photosynthetic activity, even for samples appearing inactive in the initial post-flight measurement. Compared with the ISS samples the MGR samples always showed reduced Fv/Fm values.

*Correlation of viability data by LIVE/DEAD staining and chlorophyll *a* fluorescence*

1. Compared with the ISS samples the MGR samples showed reduced viability in LIVE/DEAD staining and in PS II activity.

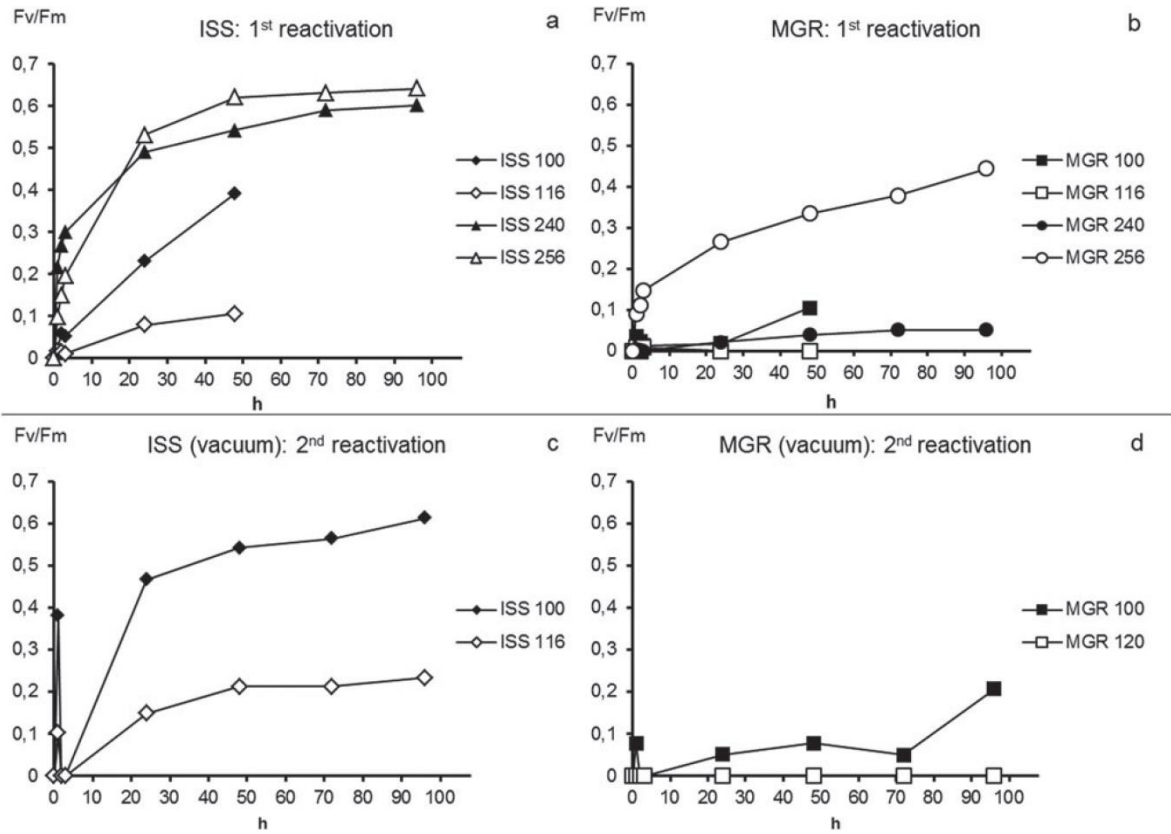


Fig. 7. Photosynthetic activity (as maximum quantum yield, Fv/Fm) in *Xanthoria elegans* after LIFE exposure according to the prolonged re-activation protocols (a) ISS samples, first re-activation; space vacuum: dark-exposed (100), full insolation (116); Mars-analogue conditions: dark exposed (240), full insolation (256). (b) MGR samples, conditions (simulated) and sample numbers as in (a). (c) ISS samples, second re-activation of the space vacuum samples, dark exposed (100), full insolation (116). (d) MGR samples, second re-activation of the vacuum samples, dark exposed (100), full insolation (120).

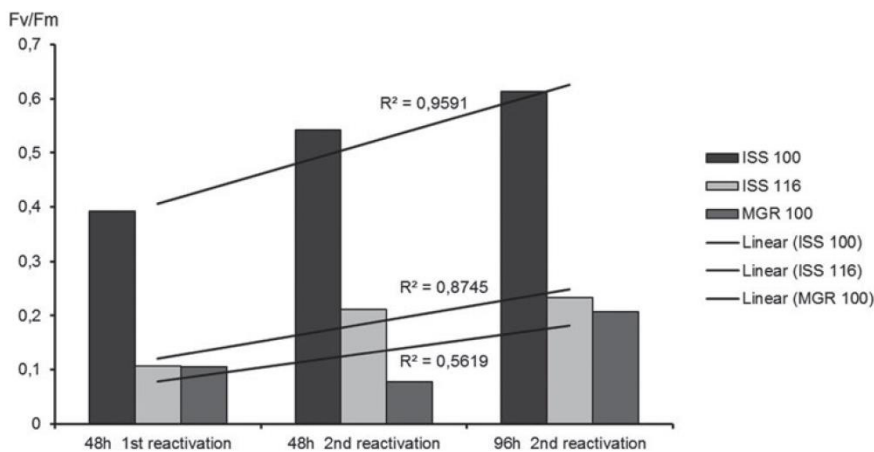


Fig. 8. First and second re-activation of the ISS and MGR space vacuum samples: samples show positive linear correlations of reactivation time (h) and maximum quantum yield of PS II (Fv/Fm). Samples dried between the re-activation (wetting) in ambient conditions.

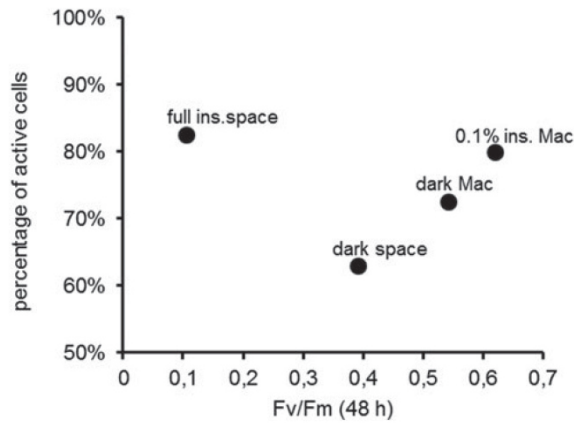


Fig. 9. ISS samples: correlation between the Fv/Fm values (chlorophyll *a* fluorescence) and cell viability assessed by LIVE/DEAD staining. The viability of the analysed samples is correlated for the both methods, except the space vacuum full insolation sample, which showed high metabolic activity combined with lower Fv/Fm values than samples of filtered insolation or dark exposure. full ins., full insolation; 0.1% ins., 0.1% insolation; dark, dark exposure; space, space vacuum; Mac, Mars-analogue conditions.

2. A prolonged re-activation procedure is mandatory to properly re-activate the photosynthetic activity. This might be due to the intense desiccation in space vacuum and the time which might be needed for cellular repair mechanisms.
3. The duration of the re-activation and the maximum quantum yield of photosystem II (Fv/Fm) are correlated (Fig. 8).
4. The ISS samples exposed under Mars-analogue conditions revealed higher viability rates, compared with the ISS space vacuum samples (Figs. 5 and 7(a)), and needed less re-activation time (Fig. 7(a)). According to the ISS sample results Mars-analogue conditions provided improved survival conditions for the anabiotic lichens.
5. The measured Fv/Fm values of the ISS samples can be correlated to the amount of PB cells detected as metabolically active in the LIVE/DEAD staining for three out of four ISS samples (Fig. 9: four samples after 48 h of first re-activation). Higher Fv/Fm values correlated to higher PB vitality rates in the LIVE/DEAD staining analysis. Only one sample (ISS full ins. space) showed a low Fv/Fm (maximum quantum yield) value, but high metabolic activity of PB cells in LIVE/DEAD staining analysis, indicating that the photosynthetic activity can be reduced without a loss of the overall metabolic activity in the PB cells.

Discussion

To fathom the limits and limitations of life it is fundamental to conduct real space and Mars-analogue exposure experiments. LIFE tested the potential of lichens' survival under

non-terrestrial conditions, as intense solar radiation, lack of atmospheric shielding, LEO-cosmic-radiation, vacuum which causes extreme desiccation, different atmosphere and a temperature-regime including rapid freeze/thaw cycling (Berger *et al.* 2012; Rabbow *et al.* 2012). The Mars-analogue conditions compartment of LIFE was intended to assess the possibility of microbial life (extinct or recent) in putative micro-niches on Mars.

According to the LIVE/DEAD viability analyses, the symbionts of *X. elegans* achieved remarkable high viability rates with a total average of 71% (PB) and 84% (MB) after 18 months of space exposure on the ISS. These results were substantiated by the chlorophyll *a* fluorescence analysis, illustrating a profound recovery of photosynthetic activity if properly re-activated. Besides these data obtained from LIVE/DEAD and chlorophyll *a* fluorescence analyses, *X. elegans* also revealed its remarkable post-flight viability and the capability of continuous proliferation in culture-based assays of the PB (Brandt *et al.* in preparation).

The post-flight viability of *X. elegans* is not reached by other organisms exposed in LIFE, including the lichen *R. geographicum* which re-gained not more than $2.5 \pm 1.4\%$ of its pre-flight PS II activity, compared with 75% for some *X. elegans* samples (ISS dark exp. space; Onofri *et al.* 2012). Additionally, Antarctic sandstone samples which were colonized by cryptoendolithic micro-organisms (fungi, algae and yeasts among others) and exposed in parallel to both lichens, produced three fungal colonies from the dark exposed space vacuum sample and one green algal colony from the 0.1% insolated Mars-analogue conditions sample (Scalzi *et al.* 2012), although qPCR propidium monoazide assays indicated quite high rates of non-damaged cryptoendolithic fungal cells (Onofri *et al.* 2012).

The high survival rates of *X. elegans* might be caused by its particular adaptation properties. Unlike the cryptoendolithic organisms, *X. elegans* does not depend on shielding by rock, but is well adapted to exposed habitats (Nybakken *et al.* 2004; de Vera *et al.* 2008) characterized by high insolation (Nybakken *et al.* 2004), extreme temperatures and occasionally higher altitudes. The adaptations of the lichens to the environmental conditions in their original habitat comprise different strategies of stress avoidance (Kappen 2000; Meeßen *et al.* 2013b) and damage repair (Eker *et al.* 1994; Petersen *et al.* 1999; Buffoni Hall *et al.* 2003). However, this study focuses on the anhydrobiotic (anabiotic) state of desiccated lichens and on the potential to avoid damage caused by insolation with wavelengths >110 nm (space vacuum) and >200 nm (Mars-analogue conditions), respectively.

LIVE/DEAD staining and chlorophyll *a* fluorescence analyses form a comparable pattern of both vital MB and PB in the samples examined. The only exception is the PB of the ISS fully insolated space vacuum sample which failed to reach its pre-flight Fv/Fm values in the chlorophyll *a* fluorescence measurements, revealing a deficit in photosynthetic activity, although the LIVE/DEAD staining analysis indicated a high average quantity of metabolically active cells (about 83%). The chlorophyll *a* fluorescence data of *X. elegans*

(ISS samples) correspond to the results presented by Onofri *et al.* (2012), indicating a full recovery (about 99%) of the photosynthetic activity for all ISS samples, except the space vacuum samples exposed to full solar irradiation which reached only 45% of the pre-flight Fv/Fm values. This is consistent with the present study indicating 50% of the pre-flight Fv/Fm value for this sample. The viability rates of each sample's PB and MB appear to be coupled to each other, this is confirmed by a linear correlation between the viability rates of MB and PB (coefficient of correlation is 0.95). PB and MB reacted likewise to the environmental condition applied with a proportionally higher rate of damage in the PB.

Owing to the narrow sample number available in LIFE, and its subsequent partition on various analytical methods, the influence of individual sample characteristics might be considered. Intersample variety might also be caused by different pre-flight vitality of individual lichen samples as well as by slightly differing thallus orientation during exposure or individual thallus structures (Meeßen *et al.* 2013b).

Anhydrobiosis: vacuum and freezing

Their poikilohydric nature enables lichens to endure unfavourable environmental conditions in a state of anhydrobiosis, 'latent life', mainly induced by desiccation (Crowe *et al.* 1992). Anhydrobiosis provides enormous desiccation tolerance (Hoekstra *et al.* 2001; Schlensog *et al.* 2003; Rebecchi *et al.* 2007) and supports the importance of the poikilohydry as a fundamental life strategy of the lichen symbiosis in response to hostile conditions (Kranter *et al.* 2008). Although the non-lichenized PB is discussed to be more sensitive to intense insolation and desiccation than the MB (de la Torre *et al.* 2002; de Vera *et al.* 2008; de Vera & Ott 2010; de Vera 2012), the results of the present study for lichenized PB reported its high survival and re-activation potential after 18 months in anhydrobiosis under space and Mars conditions.

Considering space vacuum of 10^{-4} – 10^{-7} Pa as well as 10^3 Pa of the Mars-analogue atmosphere for 18 months, the lichens experienced a strong, long-term desiccation. Normally, the re-activation of air-dried lichens by water-uptake takes 5–20 min (Lange *et al.* 1989; Dyer & Crittenden 2008), depending on the species and the dry state. The prolonged re-activation time (48 or 96 h) of the ISS and MGR samples appears to be due to the longer time needed to moisten sufficiently after such extreme desiccation events, to re-start metabolism, to run repair processes and to re-initiate photosynthetic activity in the PB. This is supported by the correlation between elongated re-activation procedures with rising Fv/Fm values (Fig. 8). Consistently, the samples exposed in Mars-analogue atmosphere took half of the time to regain their photosynthetic activity. However, the experiment demonstrates the protective potential of the anhydrobiotic state, permitting re-activation after long-term desiccation by LEO-vacuum conditions (Sánchez *et al.* 2014). This is consistent with former simulation experiments (de Vera *et al.* 2003, 2004b, 2010, 2013) and storage experiments, in which

desiccated thalli of *X. parietina* (stored at -20°C), appeared fully viable after 13 years (Honegger 2003) while micro-fungi survived 13 years in liquid nitrogen (Smith 1982). Desiccated lichens also survived shock freezing in liquid nitrogen, preparation for scanning electron microscope (SEM) analyses and low-temperature SEM examination (20 kV electron beam, high vacuum, Honegger 2003). Moreover, isolated PB revealed high resistance to freezing (Hájek *et al.* 2012; Sadowsky & Ott 2012).

To conclude, concerning anhydrobiosis neither vacuum nor freezing appears to be the limiting factor for survival for lichen symbionts. Anhydrobiosis includes de-activation of photosystem II (Lange *et al.* 1989), avoiding the accumulation of reactive oxygen species (ROS), which harm essential cell functions (Wieners *et al.* 2012; Kranter *et al.* 2005). The repeated freezing and thawing cycles can be tolerated by lichens in their natural habitat in a diurnal course (Kappen 1985). The temperature fluctuations during exposition ranged between $+43$ and -21.7°C and do not exceed the range of temperatures lichen may experience in the natural habitat. The freezing resistance of *X. elegans* was not sufficiently tested by the conditions in LIFE.

The ISS Mars-analogue samples showed slightly higher viability rates in LIVE/DEAD analysis compared with the ISS space vacuum samples. Additionally, the respective Fv/Fm values were higher after shorter re-activation for samples exposed in Mars-analogue conditions. Depending on the length of the desiccation event the re-activation time needed was more prolonged, as indicated by the time-dependent increase of Fv/Fm in the (space) vacuum samples. The LIVE/DEAD staining results for the PB indicated less difference between the viability of Mars-analogue and space vacuum samples than the chlorophyll *a* fluorescence data pointed to, indicating that Fv/Fm measurements should not be the only test for viability of the PB in the lichen thallus.

Solar irradiation/cortex layer

In the present study, ISS and MGR lichen samples, including the isolated MB samples, lost vitality not related to the insolation applied according to the LIVE/DEAD staining analyses. This is consistent with space condition simulation experiments conducted by de Vera *et al.* (2003), which revealed no decrease in viability for *X. elegans* thalli irradiated with UV (200–400 nm) to a dose of 10 kJ m^{-2} applied in 4 h, and a decrease to a minor extent after UVR $>160\text{ nm}$ up to doses of 150 kJ m^{-2} , combined with vacuum conditions. The UVR doses of the fully insolated ISS samples accumulated to about 634 MJ m^{-2} within 559 days (Rabbow *et al.* 2012), not exceeding UVR-resistance of the entire lichen thalli. The high resistance to insolation of the photosynthetic partner (algae) might largely be caused by the secondary metabolite parietin deposited in the upper cortex layer (Solhaug & Gauslaa 1996), by the algal cell clustering in the PB layer, characteristic for the genus *Trebouxia* (Schaper 2003) and the protection by the layered anatomical structure of the lichen thallus, mainly formed by the MB (Henssen & Jahns 1974).

The UV and blue light screening abilities of the secondary metabolite parietin have been discussed by several authors, mainly with respect to UV-B irradiation (e.g. Solhaug & Gauslaa 1996; Wynn-Williams *et al.* 2002; Nybakken *et al.* 2004). For PAR insolation parietin encrusted cortices were found to screen 81% of blue, 27% of green and 1% of red wavelength ranges (Solhaug *et al.* 2010).

The production of the screening secondary lichen metabolites can be enhanced in the symbiotic state (Brunauer & Stocker-Wörgötter 2005) and the amount of parietin produced has been described to be effected by UV-B in lichens colonizing irradiated sites (Solhaug *et al.* 2003; Nybakken *et al.* 2004). The parietin encrusted cortex of *X. elegans* constitutes 8% of the total thallus thickness (Meeßen *et al.* 2013b) hence the additional quantity of secondary metabolites is adding to the insolation protection of the sensitive PB, more than e.g. sole cortex thickness (Dietz *et al.* 2000; Gauslaa & Solhaug 2004). In the anhydrobiotic (desiccated) state, the shrinkage of the lichen thallus causes a higher density of the secondary metabolite parietin, enhancing the screening and protective effect, making UV and blue light screening most efficient (Ertl 1951; Solhaug *et al.* 2010).

The difference in viability occurring in the two different methods used may be caused by direct UV-induced damage of the photosynthetic key components (e.g. D1 protein, Rubisco; Holzinger & Lütz 2006).

The Mars-analogue insolation included a 200 nm cut-off filter, shielding the samples (Mars ac) from vacuum-UVR ($\lambda < 200$ nm). Missing vacuum-UVR insolation might explain the slightly higher viability of the ISS Mars ac samples (LIVE/DEAD staining results). However, the viability rates of all ISS samples analysed were not correlated to the irradiation received. Even the dark exposed samples did not show increased viability in LIVE/DEAD staining analysis. The small increase in the viability rates of ISS Mars-analogue samples is rather due to the Mars-analogue atmosphere.

The samples studied were collected from slightly different high alpine sites. According to the intense UV-B irradiation at the different sites (Nybakken *et al.* 2004) the parietin production has been stimulated in slightly different amounts or might have been even altered seasonally (Solhaug & Gauslaa 2004; Gauslaa & McEvoy 2005). As a consequence, different viability rates of ISS or MGR insolated samples might also be caused by different concentration of parietin in the upper cortex layer.

Ionizing radiation

To assess and quantify the impact of cosmic radiation on the samples seems to be difficult, because of the relatively low accumulated doses (200–231 mGy), the complex composition of the radiation and the shielding provided by the EXPOSE-E hardware or the ISS (Berger *et al.* 2012). Ionizing radiation was mainly delivered by protons of the South Atlantic Anomaly (Dachev *et al.* 2012) and galactic cosmic heavy ions (Berger *et al.* 2012). It can be discussed, that the dark-exposed samples suffered from secondary radiation produced in the hardware and the final energy deposit of accelerated protons (Hausmann

2013 personal communication). Due to the sparsely differentiation of MB and PB cells (Carlile 1995) and the lichens' modular structure, single dead cells can be spared and replaced, not affecting the lichens' entire structure. Surviving cells are able to recover from radiation showing normal growth (Gannutz 1972).

MGR samples

According to both methods the viability of the MGR samples is significantly reduced compared with the ISS samples, although the MGR samples were not subjected to cosmic radiation sources above Earth level. This might be an indication to the disparity in viability of MGR and ISS samples, caused by inevitable differences in sample handling between ISS and MGR.

Mars habitability

The *X. elegans* samples exposed on the ISS in Mars-analogue conditions showed slightly higher viability and clearly higher photosynthetic activity compared with the space vacuum-exposed samples. The freezing temperatures of Mars were not tested in LIFE. As all samples were in anhydrobiosis (desiccated) for the duration of the experiment their ability to thrive in Mars micro-niches remains open.

Lithopanspermia hypothesis

The Lithopanspermia hypothesis is i.e. based on a proposal by Thomson (1871), suggesting that life could survive interplanetary travel. It emphasizes the role of the rock material, protecting the micro-organism on their transfer through space, e.g. by shielding against UV irradiation (Nicholson *et al.* 2000; Benardini *et al.* 2003; Cockell 2008; Horneck *et al.* 2008). Despite further modifications of the hypothesis, its principle deals with the interplanetary transfer of micro-organisms, seeding life from one planet to another.

One of the basic objectives of LIFE was to obtain results on the ability of the organisms tested to survive the interplanetary transfer phase. The results of the experiments with *X. elegans* align with the results of the simulation studies and the short-term exposure on BIOPAN 5 and 6 (Sancho *et al.* 2007, 2008; de la Torre *et al.* 2010b). The survival abilities of *X. elegans* appear not to be exhausted even by the conditions applied at the LIFE project. Though the 1.5 year mission duration is much shorter than the estimated length of a hypothetical interplanetary transfer e.g. 2.6 Myr for some Mars meteorites (Clark 2001), the results presented indicate that *X. elegans* might be able to survive a longer duration in space or might be a promising test subject for a Directed Lithopanspermia as proposed by Crick & Orgel (1973).

Acknowledgements

The authors would like to express their sincere gratitude to the German Federal Ministry of Economics and Technology (BMWi) and the German Aerospace Center (DLR) for funding the work of Annette Brandt (50BW1216) and J.-P. de Vera (50WB0614). Our special thanks to

Eva Posthoff for her invaluable technical support and Joachim Meeßen for stimulating discussions. The results are included in the doctoral thesis of Annette Brandt. The authors also thank the anonymous reviewers for their comments. Results of this study were presented on the 13th European Workshop on Astrobiology (EANA 2013).

References

- Baqué, M., Scalzi, G., Rabbow, E., Rettberg, P. & Billi, D. (2013). Biofilm and planktonic lifestyles differently support the resistance of the desert cyanobacterium *Chroococcidiopsis* under space and martian simulations. *Orig. Life Evol. Biosph.* **43**(4–5), 377–389.
- Benardini, J.N., Sawyer, J., Venkateswaran, K. & Nicholson, W.L. (2003). Spore UV and acceleration resistance of endolithic *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* isolates obtained from Sonoran desert basalt: implications for lithopanspermia. *Astrobiology* **3**(4), 709–717.
- Berger, T., Hajek, M., Bilski, P., Körner, C., Vanhavere, F. & Reitz, G. (2012). Cosmic radiation exposure of biological test systems during the EXPOSE-E mission. *Astrobiology* **12**(5), 387–392.
- Brunauer, G. & Stocker-Wörgötter, E. (2005). Culture of lichen fungi for future production of biologically active compounds. *Symbiosis* **38**(2), 187–201.
- Buffoni Hall, R.S., Paulsson, M., Duncan, K., Tobin, A.K., Widell, S. & Bornman, J.F. (2003). Water- and temperature-dependence of DNA damage and repair in the fruticose lichen *Cladonia arbuscula* ssp. *mitis* exposed to UV-B radiation. *Physiol. Plantarum* **118**(3), 371–379.
- Carlile, M.J. (1995). The Success of the Hypha and Mycelium. In *The Growing Fungus*, ed. N.A.R. Gow and G.M. Gadd, pp. 3–19. Springer Dordrecht, Netherlands.
- Clark, B.C. (2001). Planetary interchange of bioactive material: probability factors and implications. *Orig. Life Evol. Biosph.* **31**(1–2), 185–197.
- Cockell, C.S. (2008). The interplanetary exchange of photosynthesis. *Orig. Life Evol. Biosph.* **38**(1), 87–104.
- Crick, F.H. & Orgel, L.E. (1973). Directed panspermia. *Icarus* **19**(3), 341–346.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. & Crowe, L.M. (1992). Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* **54**(1), 579–599.
- Dachev, T., Horneck, G., Häder, D.P., Schuster, M., Richter, P., Lebert, M. & Demets, R. (2012). Time profile of cosmic radiation exposure during the EXPOSE-E mission: the R3DE instrument. *Astrobiology* **12**(5), 403–411.
- de la Torre, R., Horneck, G., Sancho, L.G., Scherer, K., Faciu, R., Urling, T. & Pintado, A. (2002). Photoecological characterization of an epilithic ecosystem at a high mountain locality (Central Spain). In *Proc. Second European Workshop on Exo-Astrobiology*, 16–19 Sep 2002, Granz, Austria, ESA SP-518, ESA ESTEC The Netherlands, pp. 443–444.
- de la Torre Noetzel, R., Sancho, L. G., Pintado, A., Rettberg, P., Rabbow, E., Panitz, C., Deutschmann, U., Reina, M. & Horneck, G. (2007). BIOPAN experiment LICHENS on the Foton M2 mission: pre-flight verification tests of the *Rhizocarpon geographicum*-granite ecosystem. *Adv. Space Res.* **40**(11), 1665–1671.
- de la Torre Noetzel, R., Martínez Frias, J., Mateo-Martí, E., Sánchez Iñigo, F.J., García Sancho, L. & Horneck, G. (2010a). Are lichens and cyanobacteria suitable candidates to test the theory of lithopanspermia? In *EGU General Assembly Conf. Abstracts*, vol. 12, p. 14713.
- de la Torre, R. et al. (2010b). Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions – results of the LITHOPANSPERMIA experiments. *Icarus* **208**(2), 735–748.
- de Vera, J.P. (2005). Grenzen des Überlebens: Flechten als Modellorganismen für das Potential von Adaptationsmechanismen unter Extrembedingungen. *Dissertation at Heinrich-Heine University, ULB Düsseldorf*, pp. 1–180.
- de Vera, J.P. (2012). Lichens as survivors in space and on Mars. *Fungal Ecol.* **5**(4), 472–479.
- de Vera, J.P. & Ott, S. (2010). Resistance of symbiotic eukaryotes. In *Symbioses and Stress*, ed. J. Seckbach, M. Grube, pp. 595–611, Springer, Netherlands.
- de Vera, J.P., Horneck, G., Rettberg, P. & Ott, S. (2003). The potential of the lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space-I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *Int. J. Astrobiol.* **1**(4), 285–293.
- de Vera, J.P., Horneck, G., Rettberg, P. & Ott, S. (2004a). The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space II: germination capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions. *Adv. Space Res.* **33**(8), 1236–1243.
- de Vera, J.P., Horneck, G., Rettberg, P. & Ott, S. (2004b). In the context of panspermia: may lichens serve as shuttles for their bionts in space? In *Proc. Third European Workshop on Exo-Astrobiology*, 18–20 November 2003, Madrid, Spain, ESA SP-545, ESA ESTEC, The Netherlands, pp. 197–198.
- de Vera, J.P., Tilmes, F., Heydenreich, T., Meyer, C., Horneck, G. & Ott, S. (2007). Potential of prokaryotic and eukaryotic organisms in Mars-like environments and as a reference system for the search of life on other planets. In *Proc. DGLR Int. Symp.*, p. 10.
- de Vera, J.P., Rettberg, P. & Ott, S. (2008). Life at the limits: capacities of isolated and cultured lichen symbionts to resist extreme environmental stresses. *Orig. Life Evol. Biosph.* **38**(5), 457–468.
- de Vera, J.P., Möhlmann, D., Butina, F., Lorek, A., Wernecke, R. & Ott, S. (2010). Survival potential and photosynthetic activity of lichens under Mars-like conditions: a laboratory study. *Astrobiology* **10**(2), 215–227.
- de Vera, J.P., Schulze-Makuch, D., Khan, A., Lorek, A., Koncz, A., Möhlmann, D. & Spohn, T. (2014). Adaptation of an Antarctic lichen to Martian niche conditions can occur within 34 days. *Planet. Space Sci.* **98**, 182–190.
- Dietz, S., Büdel, B., Lange, O.L. & Bilger, W. (2000). Transmittance of light through the cortex of lichens from contrasting habitats. *Bibl. Lichenol.* **75**, 171–182.
- Dyer, P. & Crittenden, P. (2008). Antarctic lichens: life in the freezer. *Microbiol. Today* **35**(2), 74.
- Eker, A.P.M., Yajima, H. & Yasui, A. (1994). DNA photolyase from the fungus *Neurospora crassa*. Purification, characterization and comparison with other photolyases. *Photochem. Photobiol.* **60**(2), 125–133.
- Ertl, L. (1951). Über die Lichtverhältnisse in Laubflechten. *Planta* **39**(3), 245–270.
- Gannutz, T.P. (1972). Effects of gamma radiation on lichens – I. Acute gamma radiation on lichen algae and fungi. *Radiat. Bot.* **12**, 331–338.
- Gauslaa, Y. & McEvoy, M. (2005). Seasonal changes in solar radiation drive acclimation of the sun-screening compound parietin in the lichen *Xanthoria parietina*. *Basic Appl. Ecol.* **6**(1), 75–82.
- Gauslaa, Y. & Solhaug, K.A. (2004). Photoinhibition in lichens depends on cortical characteristics and hydration. *Lichenologist* **36**(2), 133–143.
- Hájek, J., Vácz, P., Barták, M. & Jahnová, L. (2012). Interspecific differences in cryoresistance of lichen symbiotic algae of genus *Trebouxia* assessed by cell viability and chlorophyll fluorescence. *Cryobiology* **64**(3), 215–222.
- Hawksworth, D.L. (1988). The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance, and the nature of lichens. *Bot. J. Linnean Soc.* **96**(1), 3–20.
- Henssen, A. & Jahns, H.M. (1974). *Lichenes. Eine Einführung in die Flechtenkunde*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 11–71.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A. & Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant sci.* **6**(9), 431–438.
- Holzinger, A. & Lütz, C. (2006). Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron* **37**(3), 190–207.
- Honegger, R. (2003). The impact of different long-term storage conditions on the viability of lichen-forming ascomycetes and their green algal photobiont, *Trebouxia* spp. *Plant Biol.* **5**(3), 324–330.
- Horneck, G., Stöffler, D., Ott, S., Hornemann, U., Cockell, C.S., Moeller, R., Meyer, C., de Vera, J.P., Fritz, J., Schade, S. &

- Artemieva, N.A. (2008). Microbial rock inhabitants survive hypervelocity impacts on Mars-like host planets: first phase of lithopanspermia experimentally tested. *Astrobiology* **8**(1), 17–44.
- Horneck, G., Klaus, D.M. & Mancinelli, R.L. (2010). Space microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**(1), 121–156.
- Huneck, S. & Yoshimura, I. (1996). Data of lichen substances (chapter 3). In *Identification of Lichen Substances*. pp. 125–446. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Jensen, M. (2002). Measurement of chlorophyll fluorescence in lichens. In *Protocols in Lichenology*, ed. I. Kranner, R.P. Beckett, A.K. Varma, pp. 135–151. Springer Laboratory Manuals, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Kappen, L. (1985). Lichen-habitats as micro-oases in the Antarctic – the role of temperature. *Polarforschung* **55**(1), 49–54.
- Kappen, L. (2000). Some aspects of the great success of lichens in Antarctica. *Antarct. Sci.* **12**(3), 314–324.
- Kappen, L. & Schroeter, B. (1997). Activity of lichens under the influence of snow and ice. In *Proc. NIPR Symp. on Polar Biology*. pp. 163–168.
- Kappen, L., Schroeter, B., Scheidegger, C., Sommerkorn, M. & Hestmark, G. (1996). Cold resistance and metabolic activity of lichens below 0 °C. *Adv. Space Res.* **18**(12), 119–128.
- Kranner, I., Cram, W.J., Zorn, M., Wornik, S., Yoshimura, I., Stabentheiner, E. & Pfeifhofer, H.W. (2005). Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**(8), 3141–3146.
- Kranner, I., Beckett, R., Hochman, A. & Nash, T.H. III (2008). Desiccation-tolerance in lichens: a review. *Bryologist* **111**(4), 576–593.
- Lange, O.L. (1990). Twenty-three years of growth measurements on the crustose lichen *Caloplaca aurantia* in the central Negev Desert. *Israel J. Bot.* **39**(4–6), 383–394.
- Lange, O.L. & Kappen, L. (1972). Photosynthesis of lichens from Antarctica. In *Antarctic research series*, vol. 20 (*Antarctic terrestrial biology*), ed. Llano, A., pp. 83–95. American Geophysical Union.
- Lange, O.L., Bilger, W., Rimke, S. & Schreiber, U. (1989). Chlorophyll fluorescence of lichens containing green and blue-green algae during hydration by water vapor uptake and by addition of liquid water. *Bot. Acta* **102**(4), 306–313.
- Meeßen, J., Eppenstein, S. & Ott, S. (2013a). Recognition mechanisms during the pre-contact state of lichens: II. Influence of algal exudates and ribitol on the response of the mycobiont of *Fulgensia bracteata*. *Symbiosis* **59**(3), 131–143.
- Meeßen, J., Sánchez, F.J., Brandt, A., Balzer, E.M., de la Torre, R., Sancho, L.G., de Vera, J.P. & Ott, S. (2013b). Extremotolerance and resistance of lichens: comparative studies on five species used in astrobiological research I. Morphological and anatomical characteristics. *Orig. Life Evol. Biosph.* **43**(3), 283–303.
- Melosh, H.J. (1984). Impact ejection, spallation, and the origin of meteorites. *Icarus* **59**(2), 234–260.
- Meyer, C., Fritz, J., Misgaiski, M., Stoeffler, D., Artemieva, N.A., Hornemann, U., Moeller, R., de Vera, J.P., Cockell, C.S., Horneck, G., Ott, S. & Rabbow, E. (2011). Shock experiments in support of the Lithopanspermia theory: the influence of host rock composition, temperature, and shock pressure on the survival rate of endolithic and epilithic microorganisms. *Meteorit. Planet. Sci.* **46**(5), 701–718.
- Millard, P.J., Roth, B.L., Thi, H.P., Yue, S.T. & Haugland, R.P. (1997). Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(7), 2897–2905.
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J. & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**(3), 548–572.
- Nybakken, L., Solhaug, K.A., Bilger, W. & Gauslaa, Y. (2004). The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats. *Oecologia* **140**(2), 211–216.
- Onofri, S., Selbmann, L., Zucconi, L. & Pagano, S. (2004). Antarctic microfungi as models for exobiology. *Planet. Space Sci.* **52**(1), 229–237.
- Onofri, S. et al. (2012). Survival of rock-colonizing organisms after 1.5 years in outer space. *Astrobiology* **12**(5), 508–516.
- Ott, S. & Sancho, L.G. (1991). Structure and adaptation of lichens to extreme environmental conditions in the maritime Antarctic (Livingston Island, South Shetland Island). In: *Actas del cuarto simposio español de estudios antárticos*. ed. J. Castellví, pp. 251–256. Comision Interministerial de ciencia y tecnología, Madrid.
- Øvstedal, D.O. & Lewis Smith, R.I. (2001). *Lichens of Antarctica and South Georgia*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 361–363.
- Petersen, J.L., Lang, D.W. & Small, G.D. (1999). Cloning and characterization of a class II DNA photolyase from *Chlamydomonas*. *Plant Mol. Biol.* **40**(6), 1063–1071.
- Rabbow, E. et al. (2012). EXPOSE-E: an ESA astrobiology mission 1.5 years in space. *Astrobiology* **12**(5), 374–386.
- Raggio, J., Pintado, A., Ascaso, C., de La Torre, R., de Los Ríos, A., Wierzechos, J., Horneck, G. & Sancho, L.G. (2011). Whole lichen thalli survive exposure to space conditions: results of LITHOPANSPERMIA experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* **11**(4), 281–292.
- Rebecchi, L., Altiero, T. & Guidetti, R. (2007). Anhydrobiosis: the extreme limit of desiccation tolerance. *Invert. Surviv. J.* **4**, 65–81.
- RedShift Report (2011). Reviewers: van Bavinchove, C., Beuselink, T., EXPOSE: Environmental history by calculation – EXPOSE-E simulation results. Ref: EXP-RP-017-RS ISS. A (2). RedShift Design and Engineering BVBA (125 pp).
- Sadowsky, A. & Ott, S. (2012). Photosynthetic symbionts in Antarctic terrestrial ecosystems: the physiological response of lichen photobionts to drought and cold. *Symbiosis* **58**(1–3), 81–90.
- Sánchez, F.J., Meeßen, J., Ruiz, M., Sancho, L.G., Ott, S., Vilchez, C., Horneck, G., Sadowsky, A. & de la Torre, R. (2014). UV-C tolerance of symbiotic *Trebouxia* sp. in the space-tested lichen species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: role of the hydration state and cortex/screening substances. *Int. J. Astrobiol.* **13**(1), 1–18.
- Sancho, L.G., de la Torre, R., Horneck, G., Ascaso, C., de los Ríos, A., Pintado, A., Wierzechos, J. & Schuster, M. (2007). Lichens survive in space: results from the 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology* **7**(3), 443–454.
- Sancho, L.G., de la Torre, R. & Pintado, A. (2008). Lichens, new and promising material from experiments in astrobiology. *Fungal Biol. Rev.* **22**(3), 103–109.
- Scalzi, G., Selbmann, L., Zucconi, L., Rabbow, E., Horneck, G., Albertano, P. & Onofri, S. (2012). LIFE Experiment: isolation of cryptoendolithic organisms from Antarctic colonized sandstone exposed to space and simulated Mars conditions on the International Space Station. *Orig. Life Evol. Biosph.* **42**(2–3), 253–262.
- Schaper, G.M. (2003). Komplexe Interaktionsmuster und die Dynamik von Entwicklungsprozessen in Flechtenökosystemen. *Dissertation at the Heinrich-Heine University, ULB Düsseldorf*, pp. 1–220.
- Schlesog, M., Schroeter, B., Pannewitz, S. & Green, T.G.A. (2003). Adaptation of mosses and lichens to irradiance stress in maritime and continental antarctic habitats. In *Antarctic Biology in a Global Context*, ed. A.H.L. Huiskes, W.W.C. Gieskes, J. Rozema, R.M.L. Schorno, S.M. van der Vies, W.J. Wolff, pp. 161–166. Backhuys Publisher, Leiden.
- Schroeter, B., Green, T.G.A., Seppelt, R.D. & Kappen, L. (1992). Monitoring photosynthetic activity of crustose lichens using a PAM-2000 fluorescence system. *Oecologia* **92**(4), 457–462.
- Schuster, M., Dachev, T., Richter, P. & Häder, D.P. (2012). R3DE: radiation risk radiometer-dosimeter on the International Space Station—optical radiation data recorded during 18 months of EXPOSE-E exposure to open space. *Astrobiology* **12**(5), 393–402.
- Shuster, D.L. & Weiss, B.P. (2005). Martian surface paleotemperatures from thermochronology of meteorites. *Science* **309**(5734), 594–600.
- Smith, D. (1982). Liquid nitrogen storage of fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **79**(3), 415–421.
- Solhaug, K.A. & Gauslaa, Y. (1996). Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina*. *Oecologia* **108**(3), 412–418.
- Solhaug, K.A. & Gauslaa, Y. (2004). Photosynthates stimulate the UV-B induced fungal anthraquinone synthesis in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. *Plant, Cell Environ.* **27**(2), 167–176.
- Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., Nybakken, L. & Bilger, W. (2003). UV-induction of sun-screening pigments in lichens. *New Phytol.* **158**(1), 91–100.

Viability of *Xanthoria elegans* after exposure on the ISS

- Solhaug, K.A., Larsson, P. & Gauslaa, Y. (2010). Light screening in lichen cortices can be quantified by chlorophyll fluorescence techniques for both reflecting and absorbing pigments. *Planta* **231**(5), 1003–1011.
- Stöffler, D., Horneck, G., Ott, S., Hornemann, U., Cockell, C.S., Moeller, R., Meyer, C., de Vera, J.P., Fritz, J. & Artemieva, N.A. (2007). Experimental evidence for the potential impact ejection of viable microorganisms from Mars and Mars-like planets. *Icarus* **186**(2), 585–588.
- Thomson, W. (1871). Presidential address to the British Association for the Advancement of Science. *Nature* **4**, 262–270.
- Westall, F. (2013). Microbial scale habitability on Mars. In *Habitability of Other Planets; Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, 28. Springer, Springer Dordrecht, NL, pp. 183–202.
- Wieners, P.C., Mudimu, O. & Bilger, W. (2012). Desiccation-induced non-radiative dissipation in isolated green lichen algae. *Photosynth. Res.* **113**(1–3), 239–247.
- Wynn-Williams, D.D., Edwards, H.G.M., Newton, E.M. & Holder, J.M. (2002). Pigmentation as a survival strategy for ancient and modern photosynthetic microbes under high ultraviolet stress on planetary surfaces. *Int. J. Astrobiol.* **1**(1), 39–49.

5.3 Characterisation of growth and ultrastructural effects of the *Xanthoria elegans* photobiont after 1.5 years of space exposure on the International Space Station

A. Brandt, E.-M. Posthoff, J.-P. de Vera, S. Onofri & S. Ott

Origins of Life and Evolution of Biospheres (2016): 46(2), 311-321

Impact Faktor: 1,11 (2015)

Der Artikel wurde vollständig vom Erstautor verfasst.

Characterisation of Growth and Ultrastructural Effects of the *Xanthoria elegans* Photobiont After 1.5 Years of Space Exposure on the International Space Station

Annette Brandt¹ · Eva Posthoff¹ · Jean-Pierre de Vera² ·
Silvano Onofri³ · Sieglinde Ott¹

Received: 1 October 2015 / Accepted: 5 October 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract The lichen *Xanthoria elegans* has been exposed to space and simulated Mars-analogue environment in the Lichen and Fungi Experiment (LIFE) on the EXPOSE-E facility at the International Space Station (ISS). This long-term exposure of 559 days tested the ability of various organisms to cope with either low earth orbit (LEO) or Mars-analogue conditions, such as vacuum, Mars-analogue atmosphere, rapid temperature cycling, cosmic radiation of up to 215 ± 16 mGy, and insolation of accumulated doses up to 4.87GJm^{-2} , including up to 0.314GJm^{-2} of UV irradiation. In a previous study, *X. elegans* demonstrated considerable resistance towards these conditions by means of photosynthetic activity as well as by post-exposure metabolic activity of 50–80 % in the algal and 60–90 % in the fungal symbiont (Brandt et al. Int J Astrobiol 14(3):411–425, 2015). The two objectives of the present study were complementary: First, to verify the high post-exposure viability by using a qualitative cultivation assay. Second, to characterise the cellular damages by transmission electron microscopy (TEM) which were caused by the space and Mars-analogue exposure conditions of LIFE. Since the algal symbiont of lichens is considered as the more susceptible partner (de Vera and Ott 2010), the analyses focused on the photobiont. The study demonstrated growth and proliferation of the isolated photobiont after all exposure conditions of LIFE. The ultrastructural analysis of the algal cells provided an insight to cellular damages caused by long-term exposure and highlighted that desiccation-induced breakdown of

Paper presented at the 14th European Astrobiology Conference (EANA 2014) held 13–16 October 2014 in Edinburgh, United Kingdom.

✉ Sieglinde Ott
otts@uni-duesseldorf.de

¹ Institute of Botany, Heinrich-Heine-University (HHU), Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany

² Institute of Planetary Research, German Aerospace Center (DLR), Rutherfordstr. 2, 12489 Berlin, Germany

³ Department of Ecological and Biological Sciences (DEB), Tuscia University, Largo dell'Università, 01100 Viterbo, Italy

cellular integrity is more pronounced under the more severe space vacuum than under Mars-analogue atmospheric conditions. In conclusion, desiccation-induced damages were identified as a major threat to the photobiont of *X. elegans*. Nonetheless, a fraction of the photobiont cells remained cultivable after all exposure conditions tested in LIFE.

Keywords Astrobiology · Expose-E · Life · Lichen · Space conditions · Mars-analogue conditions

Abbreviations

ISS	International Space Station
LEO	low Earth orbit
LIFE	Lichen and Fungi Experiment
MGR	Mission Ground Reference
T	transmission
TEM	transmission electron microscopy
UV	ultraviolet radiation

Introduction

Since the beginning of the new millennium, various astrobiological experiments were conducted to test the effects of space and Mars-analogue conditions on lichens, mosses, fungi and prokaryotes. These simulation experiments tested the single or combined effects of vacuum up to 10^{-5} Pa and UV-radiation (de Vera et al. 2003, 2004a, 2004b, 2008, 2010; de La Vega et al. 2007; de Vera & Ott 2010; Sánchez et al. 2012, 2014; Baqué et al. 2013; Meeßen et al. 2014), hypervelocity impact pressures up to 50 GPa (Stöffler et al. 2007; Horneck et al. 2008), but also tested the resistance to other space-related parameters as freezing and drought (Onofri et al. 2004; Hájek et al. 2012; Meeßen et al., 2014). Additionally, the lichen *Xanthoria elegans* was part of the space exposure experiments LICHENS II on BIOPAN 5, LITHOPANSPERMIA on BIOPAN 6 (Sancho et al. 2007; de la Torre et al. 2007, 2010; Olsson-Francis et al., 2010; Raggio et al. 2011) and consequently became part of the Lichen and Fungi Experiment (LIFE) on EXPOSE-E/EuTEF at the ISS where it was exposed among other organisms to space and simulated Mars conditions for 18 months (Cockell et al. 2011; Onofri et al. 2012; Rabbow et al. 2012; Scalzi et al. 2012; Brandt et al. 2015). The EXPOSE-E facility provided LEO-space vacuum (10^{-4} to 10^{-7} Pa) and simulated Mars conditions (10^3 Pa Mars-analogue atmosphere) under three different insolation regimes of 100 % transmission, 0.1 % transmission (T) and no insolation as described below, leading to accumulated insolation doses up to 4.87 GJm^{-2} and UV irradiation doses of up to 314 MJm^{-2} at the sample sites of *X. elegans*.

The astrobiological model lichen *X. elegans* is a symbiotic association of an ascomycete fungus (mycobiont) and a coccal green alga (photobiont, genus *Trebouxia*). This cosmopolite lichen is well adapted to harsh environmental conditions as found in high alpine and polar regions (Øvstedal & Lewis Smith 2001). It is characterized by the secondary lichen compound parietin known for its high light- and UV-screening capacities (Solhaug & Gauslaa 1996; Solhaug et al. 2003, 2010). To assess its limits of survival after LIFE, *X. elegans* was tested on its resistance to the applied conditions and the exposure-induced decrease of post-exposure viability by chlorophyll *a* fluorescence and live/dead staining analyses (Onofri et al. 2012; Brandt et al. 2015). Both methods revealed high rates of metabolic and photosynthetic activity.

The live/dead staining results of the photobiont revealed viability rates of 50–80 %, while the more resistant mycobiont showed rates of 60–90 %. The photosynthetic re-activation of the photobiont depended on the exposure conditions. Vacuum exposed and fully insolated (100 % transmission) samples took 8 days of re-activation to reach c. 45 % of its pre-flight maximum quantum yield of photosystem II while the Mars-analogue samples of all insolation conditions returned to pre-flight values within 4 days (Onofri et al. 2012, Brandt et al. 2015).

The present study conducted a qualitative cultivation assay of the isolated photobiont to corroborate the 50–80 % of remaining metabolic activity and the photosynthetic re-activation of *X. elegans* as indicators of post-flight viability. This assay confirmed the viability of photobiont cells/clusters after 1.5 years of space exposure by growth and proliferation, i.e. by its ability to perform complete cell cycles. The present study demonstrates a capacity of survival beyond the metabolic and photosynthetic activities reported before (Onofri et al. 2012, Brandt et al. 2015). Complementary, the analysis by transmission electron microscopy (TEM) also investigated the impact of extreme desiccation on photobiont ultrastructure as induced by 1.5 year exposure to space vacuum and Mars-analogue atmosphere conditions. This part of the study aimed to characterise the impairment on the cellular level by vacuum and low atmospheric pressure that may explain the loss of 20–50 % of algal viability observed in previous studies (Brandt et al. 2015). Both parts of the present study focused on the isolated photobiont, as it is described to be the more sensitive symbiotic partner towards simulated space and Martian conditions (de Vera et al. 2003, 2008; de Vera & Ott 2010).

Material and Methods

Lichen Samples Samples of *Xanthoria elegans* (Link) Th. Fr. (1860) were collected in June 2008 at Col du Sanetsch, Valais, Switzerland (46°21'48"N, 07°17'51"E, at 2140 m a.s.l.) and adjacent collection sites (Zermatt, 46°00'N, 07°71'E, at 1950m a.s.l.). Samples originating from this collection sites were used in astrobiological studies before (de Vera et al. 2003, 2004a, 2004b, 2008, 2010) and consistently showed high viability after these studies.

Exposure Conditions The samples were exposed in the EXPOSE-E facility outside the European Columbus Module at the ISS for 559 days. Six experimental conditions were realised: Eight samples each were exposed to space (tray 1) and Mars-analogue conditions (tray 2). Tray 1 provided 10^{-4} to 10^{-7} Pa LEO-vacuum and three intensities of solar radiation (dark, 0.1 % transmission by neutral density filters, and 100 % transmission (T)) from 110 nm $< \lambda >$ 1 mm (covered with MgF₂ windows) while tray 2 provided simulated Mars conditions with a 10^3 Pa atmosphere (95.3 % CO₂, 2.7 % N₂, 1.6 % Ar, 0.15 % O₂, ~370 ppm water vapour) and again three intensities of solar irradiation (as above) from 200 nm $< \lambda >$ 1 mm (covered by Suprasil quartz windows). At the sample sites, fully insolated samples accumulated an average of 4800 MJm^{-2} photon energy input; 0.1 % transmission samples accumulated 6.3 MJm^{-2} photon energy in tray 1 and 5.9 MJm^{-2} in tray 2. The portions of UV-irradiation ranged from 291 MJm^{-2} at 100 % T to 0.271 MJm^{-2} at 0.1 % T under space conditions (110nm $< \lambda >$ 400nm) and from 314 MJm^{-2} at 100 % T to 0.257 MJm^{-2} at 0.1 % T under Mars conditions (200nm $< \lambda >$ 400nm). The samples experienced ionizing radiation of $208 \pm 8 \text{ mGy}$ in tray 1, and $215 \pm 16 \text{ mGy}$ in tray 2 (Berger et al. 2012) and a temperature range from -21.7 to $+43^\circ\text{C}$ with a short-time maximum of 61°C and 100 freeze/thaw cycles (Rabbow et al. 2012). According to the data received from the EXPOSE-E facility, a

corresponding set of samples was exposed to as similar as possible simulated conditions, referred to as Mission Ground Reference (MGR; Rabbow et al. 2012). Due to off-nominal events during the mission about 20 % of the expected environmental data were lost. To assure precise sample analysis of the exposure conditions the solar irradiation was recalculated (RedShift Report 2011) leading to accumulated irradiance values differing from those given in Rabbow et al. (2012). During LIFE the lichen samples stayed in anhydrobiotic state during the whole experiment. After return all samples were stored frozen (-20°C) until further investigations.

Culture Assay The symbiotic algae were prepared from the lichen sample under sterile conditions, using a hollow needle and a scalpel to place algal clusters immediately on *Trebouxia* Organic Medium agar-plates (Ahmadjian 1967) and BG11 medium. Amphotericin-B ($5\mu\text{g/ml}$) and Ampicillin ($200\mu\text{g/ml}$) were added to both media to prevent fungal and bacterial contamination. 10–15 colonies per agar-plate and per media were inoculated for each experimental condition, including untreated controls. The cultivation took place at 12°C under 14h daytime photosynthetic photon flux density of $15\text{--}25\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Algal colonies were inspected daily to detect contaminations and were re-inoculated on sterile media in case of visible contamination. Growing colonies were photo-documented using a stereo microscope (Zeiss, Germany) with a digital camera (Pentax). After 200 days of cultivation the experiment was concluded. For subsequent studies the algae were transferred to glycerin stocks and stored at -20°C .

Transmission Electron Microscopy (TEM) Sample pieces of lichen thalli of all exposure conditions (c. 2mm in diameter) were fixed in 2.5 % glutaraldehyde (in 200mM cacodylate-buffer), contrasted in 4 % OsO_4 (in 0.8 % potassium ferrocyanide), and dried by graduated dilution series of ethanol and acetone prior to critical point drying (CPD 020, Balzers Union). The fixed samples were embedded in Epon812 resin following the manufacturer's protocol and ultrathin cross-sections (100nm) were examined with a Zeiss E902 TEM. To test the effect of prolonged dry storage, two different controls were chosen: one from dry storage over silica-gel, the other was kept in the freezer at -20°C . Cell counting was performed manually using the ImageJ counter tool (v1.49 m Wayne Rasband). Image processing of the micrographs was done with Fiji macros (Biovoxxel 2014). For statistical analyses (one-way ANOVA with post-test) GraphPad InStat3 was applied (GraphPad software 2003).

Explanation of Ultrastructural Terminology *Cell wall*: rigid layer surrounding the protoplast of plant cells; *protoplast*: plant cell without its cell wall; *thylakoid*: compartment of the chloroplast where thylakoid membranes enclose the thylakoid lumen, site of light-dependent reaction of photosynthesis; *pyrenoid*: compartment of the chloroplast, spherical protein structure, site of CO_2 -fixation; *pyrenoglobuli*: osmiophilic, electron-dense globuli of uncertain function, most likely sites of lipid storage; *grana*: thylakoid membrane stacks in the chloroplast.

Results

Culture Assay For the first time, it was possible to cultivate lichen photobionts after long-term space exposure. Proliferating algal cultures were achieved from all three insolation regimes investigated in the LIFE experiment and under both, space vacuum and Mars-

analogue conditions. The algal colonies from different exposure conditions revealed qualitative differences in proliferation rate and final colony size (Figs. 1 and 2) while the control group samples showed the fastest growth. They formed larger colonies in equivalent periods of time when compared to all experimental conditions tested. By comparing the ratio of initially inoculated algal clusters to grown colonies, the results indicate that exposure to Mars-analogue conditions had less effects on the proliferation abilities when compared to the algal colonies derived from space vacuum exposure conditions (Table 1). Colonies from Mars-analogue exposure conditions grew faster and became larger in size in the respective time. Despite varying by three orders of magnitude, the different insolation conditions (no insolation, 0.1 % T, and 100 % T) had no visible effect on the samples exposed to Mars-analogue conditions (Fig. 2). Compared to Mars-analogue conditions, the vacuum exposed samples showed an overall reduction in proliferation and colony-forming ratio. In general, the viability of non-insolated samples was not increased compared to irradiated ones. In line with previous investigations on the metabolic activity (Brandt et al. 2015), the present results indicate that insolation, especially UV-irradiation, seems not to be the crucial factor affecting post-exposure viability under the experimental conditions tested. Among the cultivated photobionts one mycelium arose putatively from co-isolated hyphae and was transferred to malt-yeast media (Fig. 2) for further cultivation.

Ultrastructural Analyses by TEM The current analysis focused on the ultrastructural impairment of the photobiont of *Xanthoria elegans* to investigate damaging to lethal effects experienced during LIFE. Detailed analysis of the micrographs revealed distinct ultrastructural features of algal degeneration. Collapses of the cell or of the protoplast alone were frequently recognised and served as markers of exposure-induced damages. Under all investigated exposure conditions, a portion of photobiont cells showed partial or complete collapse of the protoplast with or without cell wall deformation (Fig. 3A-C). The frequency of cellular collapses differed between dry-stored and frozen control group. Dry-stored control samples showed a significantly higher amount of protoplast (70 %) and cell wall collapses (49 %) compared to frozen ones (44 % and 33 %, respectively) indicating a more deleterious effect of long-term desiccation than freezing (Table 2). The intensity of damage also differed between samples exposed to Mars-analogue atmosphere and space vacuum but none of the irradiation conditions correlated to the percentage of cell wall and protoplast collapses. Exposure to Mars-analogue atmosphere of 10^3 Pa caused comparable numbers of protoplast collapses (57 %, 48 %, 51 % at non-irradiated, 0.1 % T and 100 % T, respectively). Exposure to vacuum (10^{-4} to 10^{-7} Pa) showed higher numbers of collapsed protoplasts (61 %, 97 %, 85 %) even when compared to the dry control samples. Except for the non-irradiated samples, deformed cell walls occurred in space vacuum samples in higher percentage when compared to Mars-analogue conditions (25 %, 79 %, 85 % compared to 27 %, 16 %, 35 %, Table 2). The MGR data confirmed these results. The MGR simulation of Mars-analogue conditions caused

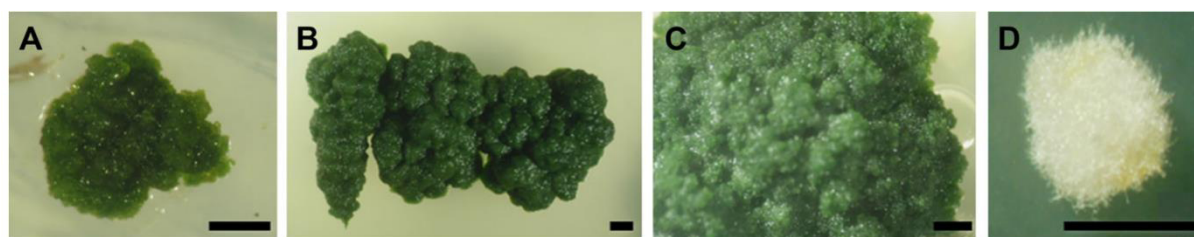


Fig. 1 Photobiont cultivation assay of samples exposed to space vacuum. Algal colonies after space vacuum exposure, cultivation duration c. 200 days. **a** 100 % T. **b** 0.1 % T. **c** no insolation. **d** 0.1 % T, picture shows one mycobiont colony of *X. elegans*. Scale bars indicate 1 mm

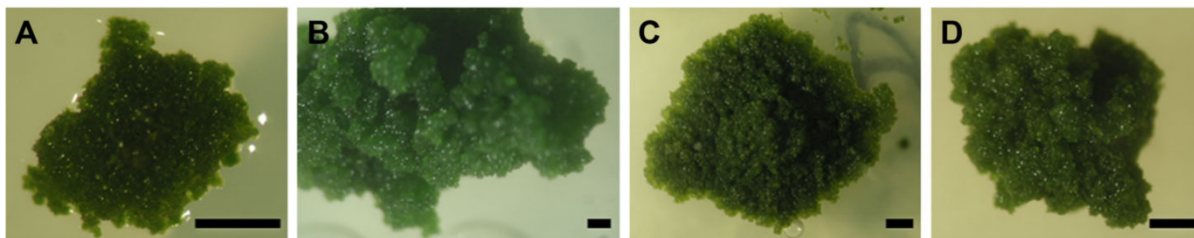


Fig. 2 Photobiont cultivation assay of samples exposed to Mars-analogue conditions. Algal colonies after Mars-analogue exposure, cultivation duration ca. 200 days: **a** 100 % T. **b** 0.1 % T. **c** no insolation. **d** Control (stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Scale bars indicate 1 mm

40–42 % of collapsed protoplasts while the MGR simulation of space vacuum led to 52–86 % of collapsed protoplasts.

Based on previous observations (Brown et al. 1987; Ascaso et al. 1988, 1995; Honegger 2003), changes in pyrenoid structure, localisation and appearance of pyrenoglobuli, degraded grana, and degraded thylakoid membranes were taken as additional markers of desiccation-induced cellular damage (Fig. 4). The degree of thylakoid membrane degradation and pyrenoid-enlargement was moderate in the frozen control and more pronounced in the dry control (Fig. 4 a). Even more pronounced thylakoid membrane degradation was observed in samples from space vacuum exposure and Mars-analogue exposure (Fig. 4 b-c). The pyrenoid-enlargement and appearance of pyrenoglobuli were observed to various extent but did not correlate to the experimental conditions applied (Fig. 4 d-e). Pyrenoglobuli were documented in all samples except in non- and 0.1 %-insolated Mars-analogue samples and appeared most frequently in the frozen control group (Fig. 4 f).

In general, the ultrastructural markers of thylakoid membrane degradation, cell wall and protoplast collapse indicate that the extreme and long-term desiccation of space vacuum and - less effective - Mars atmospheric pressure was the major impairment factor of the exposure conditions of LIFE. However, any LIFE exposure condition enhanced the observed degradation patterns of photobiont cells when compared to the two control samples.

Discussion

Post-Exposure Viability The present study verified the viability of the lichen photobiont of *Xanthoria elegans* after 18 months under the extreme conditions of LEO-space exposure by demonstrating the photobiont's ability to grow and proliferate after isolation from the thallus. These results are consistent with the results of previous quantitative analyses of photosynthetic

Table 1 Percentage of grown algal clusters after various experimental conditions

	control	space vacuum conditions			Mars-analogue conditions		
		non- insolated	0.1 % T	100 % T	non-insolated	0.1 % T	100 % T
grown clusters in [%]	100 %	26 %	50 %	13 %	77 %	100 %	100 %

Exposure conditions during 18 months exposure at the ISS. Space vacuum: 10^{-4} to 10^{-7} Pa and insolation with $110\text{ nm} < \lambda > 1\text{ mm}$. Mars-analogue conditions: 10^3 Pa Mars-analogue CO_2 -atmosphere and insolation with $200\text{ nm} < \lambda > 1\text{ mm}$. Grown clusters in [%] refer to the number of colony-forming algal clusters of the total number of prepared clusters. Control: freshly isolated photobiont clusters from frozen stored *X. elegans* thalli ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, same collection site).

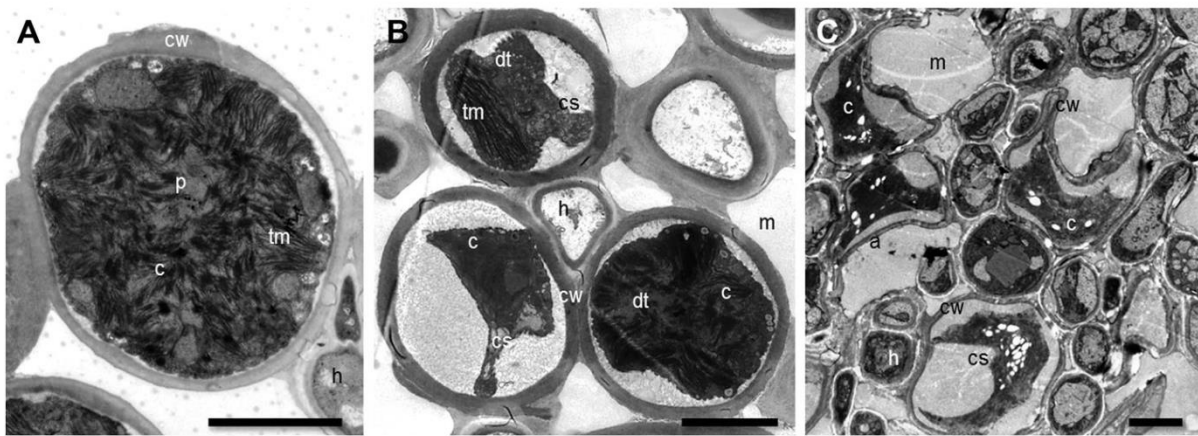


Fig. 3 Photobiont cells: normal appearance, partial and complete collapses. **a** Frozen control: regular appearance of *Trebouxia* photobiont cell. **b** Space vacuum, no insolation: partial and complete collapses, cell walls remain stable and unaffected. **c** Space vacuum, 0.1 % T: collapsed protoplasts with collapsed walls. Abbreviations: *cw* algal cell wall, *c* chloroplast, *tm* thylakoid membranes, *h* hyphe, *m* mucilage, *dt* degraded thylakoid, *cs* collapsed protoplast, *p* pyrenoid, *ep* enlarged pyrenoid, *pg* pyrenoglobuli. Scale bars indicate 5 μm

and metabolic activity by chlorophyll *a* fluorescence and live/dead staining, respectively (Onofri et al. 2012; Brandt et al. 2015). None of the conditions tested in LIFE caused complete inhibition of growth or proliferation. The present results demonstrate that the lichen's viability was more preserved under Mars-analogue conditions compared to space vacuum. Insolation and/or UV-radiation were not the major parameters affecting the post-exposure viability of the photobiont. The results of chlorophyll *a* fluorescence showed lower rates of photosynthetic activity in the space vacuum samples than in the Mars-analogue ones (Brandt et al. 2015). The present cultivation assay of the photobiont confirmed this pattern, broadening it from mere metabolic activity to the actual ability of proliferation and growth. Besides *X. elegans*, other eukaryotic organisms were exposed to space or Mars-analogue conditions in the LIFE experiments on EXPOSE-E. All organisms revealed certain resistance to the hostile conditions (Horneck et al. 2012; Onofri et al. 2012), but the viability and proliferation ability of symbiotic *X. elegans* photobionts is not reached by other tested model organisms. In contrast to the photobiont of *X. elegans*, the cryptoendolithic fungi *Cryomyces antarcticus* and *Cryptomyces minterii* lost their colony-forming ability, though the former fungus showed 80 % of intact cells in a PCR-assay after exposure to full insolation (Onofri et al. 2012).

Protective Screening Mechanisms The secondary lichen compound parietin, which is produced by the lichen fungus and deposited in the cortex of *X. elegans* is known for its blue

Table 2 Percentage of ultrastructural damage markers after various experimental conditions

condition	space vacuum			Mars-analogue			control	
	non-insolated	0.1 % T	100 % T	non-insolated	0.1 % T	100 % T	dry	frozen
% collapsed protoplast	61 %	97 %	85 %	57 %	48 %	51 %	70 %	44 %
% deformed walls	25 %	85 %	79 %	27 %	16 %	35 %	49 %	33 %
n (algae cells)	106	61	68	99	25	75	147	54

Table 2 Exposure conditions during 18 months exposure at the ISS. Space vacuum: 10^{-4} to 10^{-7} Pa and insolation with $110\text{nm} < \lambda > 1\text{mm}$. Mars-analogue conditions: 10^3 Pa Mars-analogue CO_2 -atmosphere and insolation with $200\text{nm} < \lambda > 1\text{mm}$. Frozen control: kept dark in freezer at -20°C . Dry control: dried sample kept dark at ambient temperature over silica-gel

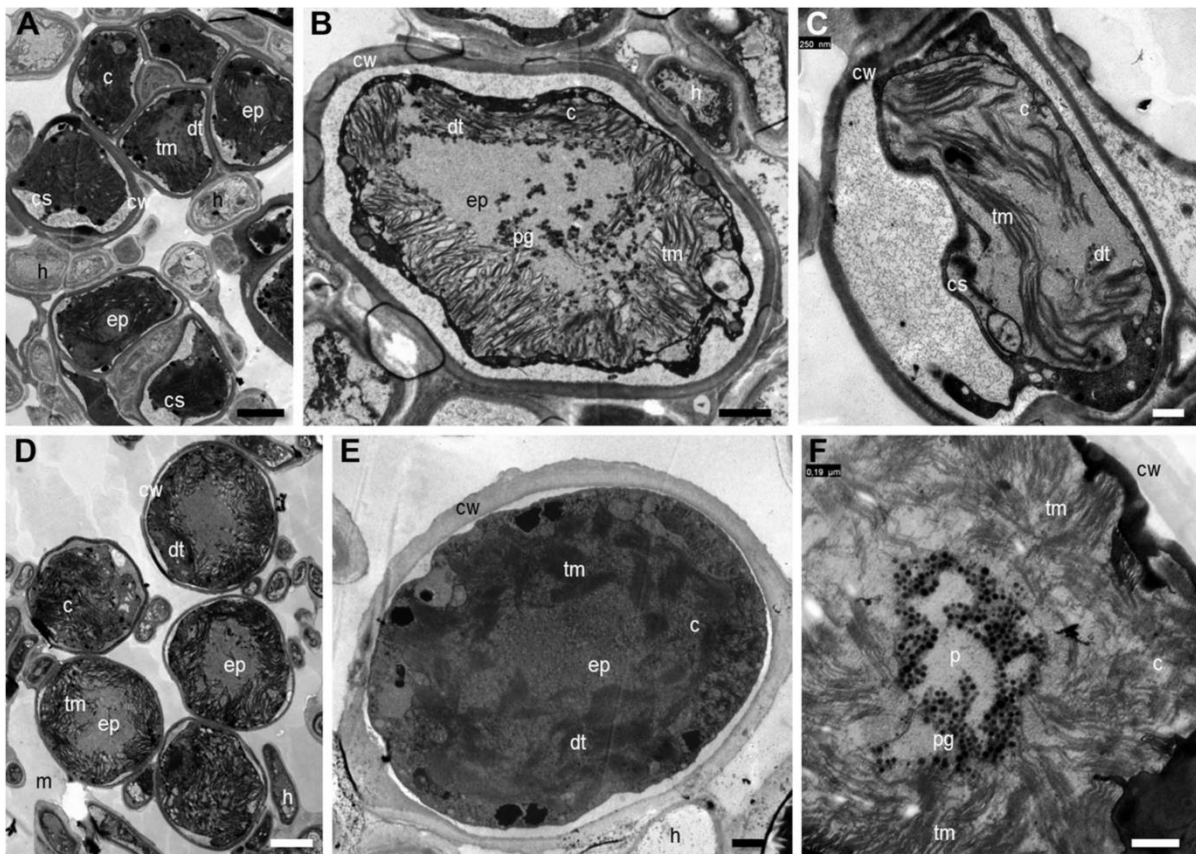


Fig. 4 Ultrastructural markers of desiccation. **a** Dry control: pyrenoid enlargement, partial protoplast collapses. **b** Space vacuum: degradation of thylakoid membranes, pyrenoid enlargement and photobiont shrinking. **c** Mars-analogue exposure: thylakoid degradation and partial collapse of the protoplast. **d** Mars-analogue exposure, 100 % T: pyrenoid-enlargement, protoplast in regular shape. **e** Mars-analogue exposure, 0.1 % T: pyrenoid-enlargement, thylakoid membranes reduced and diffused. **f** Frozen control: pyrenoglobuli in pyrenoid. Abbreviations: *cw* algal cell wall, *c* chloroplast, *tm* thylakoid membranes, *h* hyphe, *m* mucilage, *dt* degraded thylakoid, *cs* collapsed protoplast, *p* pyrenoid, *ep* enlarged pyrenoid, *pg* pyrenoglobuli. Scale bars indicate 5 μm in A, D, and 0.25 μm in B, C, E, F

light and UV screening abilities (Solhaug & Gauslaa 1996; Nybakken et al. 2004; Solhaug et al. 2010) efficiently protecting both symbionts. The amount of deposited parietin is stimulated by UV insolation in the natural habitat (Solhaug et al. 2003, Gauslaa & McEvoy 2005) mostly leading to a parietin-bearing cortical layer of 20–65 μm thickness on the cortex (Meeßen et al. 2013a). Thus, UVB, UVC and blue light are efficiently blocked by parietin in the upper cortex of the anhydrobiotic lichen (Gauslaa & Solhaug 2004; Solhaug et al. 2010, Meeßen et al. 2013b). This observation is stressed by the result that the different insolation regimes applied in LIFE did not correlate to the recognised differences of photobiont viability. As discussed below, we suggest another parameter of the exposure conditions to account in large part for the observed loss of photobiont viability.

Temporary Ultrastructural Changes in Anhydrobiosis The key factor of lichens to survive extreme environmental conditions is anhydrobiosis (Crowe et al. 1992; Kranner et al. 2008). Both symbionts in lichens are adapted to poikilohydry resisting wet-dry cycles in their natural habitats including thallus water fluctuations between <20 and >160 % water per thallus dry weight (Kappen 1988). Anhydrobiosis is accompanied by visible alterations of the cellular ultrastructure (Honegger et al. 1996; Honegger 2003; de los Ríos et al. 2004, 2010). Photobiont cells are known to collapse temporarily upon dehydration under terrestrial conditions which appeared to be normal in the course of desiccation and rehydration (Brown et al.

1987; Honegger et al. 1996; de los Ríos et al. 2004). Lichen photobionts quickly recover their spherical shape when re-hydrated (e.g. during TEM-preparation, Honegger et al. 1996; Honegger 2003).

Permanent Ultrastructural Damages by Long-Term Desiccation Permanent cellular collapses occur the more frequently the longer the dehydration period lasts and indicate desiccation-induced damage that may lead to death after six years of dry storage (Honegger 2003). In contrast, frozen storage (>9 years at -20°C) of desiccated *Trebouxia* photobionts preserved their viability (Honegger et al. 1996; Honegger 2003). Collapsed photobiont cells as well as the observed degradation of thylakoid membranes were recognised as suitable markers for desiccation-induced impairment in the present study. Vacuum desiccation is considered the main process affecting biological samples when exposed to space vacuum (Horneck et al. 2010) while pressure conditions similar to those of Mars (e. g. at the upper boundary of Earth's biosphere) create desiccation-related effects as well (Horneck et al. 2010). Consistently, TEM micrograph analysis revealed that both conditions, LEO-vacuum and the 10^3 Pa Mars-analogue atmosphere, caused an increased amount of collapsed protoplasts and cell walls, restricting the photobiont's capacity of rehydration. Concerning the degradation of the thylakoid membranes and pyrenoid enlargement, all exposed samples showed a higher frequency of both damage markers which were unrelated to certain exposure conditions but more pronounced than in the control groups. These results stress the deleterious effect of vacuum-induced, long-time desiccation in the space exposed samples, while - due to the higher atmospheric pressure - the desiccation condition under Mars-analogue conditions were less extreme and therefore the samples were less impacted.

Acknowledgments The authors would like to express their sincere gratitude to the German Federal Ministry of Economics and Technology (BMWi) and the German Aerospace Centre (DLR) for funding the work of Annette Brandt (50BW1216) and J.-P. de Vera (50WB0614). Our special thanks are due to ESA and to the simulation facilities at DLR Cologne, especially Elke Rabbow, for MGR simulation, sample integration, and for invaluable advice. We would also like to thank Joachim Meeßen for stimulating and critical discussions. Moreover, we thank the anonymous reviewers for constructive feedback.

References

- Ahmadjian V (1967) A guide to the algae occurring as lichen symbionts: isolation, culture, cultural physiology, and identification. *Phycologia* 6(2):127–160
- Ascaso C, Brown DH, Rapsch S (1988) The effect of desiccation on the pyrenoid structure in the oceanic lichen *Parmelia laevigata*. *Lichenologist* 20(1):31–39
- Ascaso C, Valladares F, de los Ríos A (1995) New ultrastructural aspects of pyrenoids of the lichen photobiont *Trebouxia* (Mikrothamniales, Chlorophyta). *J Phycol* 31(1):114–119
- Baqué M, Scalzi G, Rabbow E, Rettberg P, Billi D (2013) Biofilm and planktonic lifestyles differently support the resistance of the desert cyanobacterium *Chroococcidiopsis* under space and Martian simulations. *Orig Life Evol Biosph* 43(4–5):377–389
- Berger T, Hajek M, Bilski P, Körner C, Vanhavere F, Reitz G (2012) Cosmic radiation exposure of biological test systems during the EXPOSE-E mission. *Astrobiology* 12(5):387–392
- Brown DH, Ascaso C, Rapsch S (1987) Ultrastructural changes in the pyrenoid of the lichen *Parmelia sulcata* stored under controlled conditions. *Protoplasma* 136(2–3):136–144
- Brandt A, de Vera JP, Onofri S, Ott S (2015) Viability of the lichen *Xanthoria elegans* and its symbionts after 18 months of space exposure and simulated Mars conditions on the ISS. *Int J Astrobiol* 14(3):411–425
- Cockell CS, Rettberg P, Rabbow E, Olsson-Francis K (2011) Exposure of phototrophs to 548 days in low earth orbit: microbial selection pressures in outer space and on early Earth. *Isme J* 5(10):1671–1682

- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM (1992) Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 54(1):579–599
- de la Torre NR, Sancho LG, Pintado A, Rettberg P, Rabbow E, Panitz C, Deutschmann U, Reina M, Horneck G (2007) BIOPAN experiment LICHENS on the foton M2 mission: Pre-flight verification tests of the *Rhizocarpon geographicum*-granite ecosystem. *Adv Space Res* 40(11):1665–1671
- de la Torre R, Sancho LG, Horneck G, de los Ríos A, Wierzchos J, Olsson-Francis K, Cockell CS, Rettberg P, Berger T, de Vera JP, Ott S, Frías JM, Gonzalez PM, Lucas MM, Reina M, Pintado A, Demets R (2010) Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions—results of the LITHOPANSPERMIA experiments. *Icarus* 208(2):735–748
- de la Vega UP, Rettberg P, Reitz G (2007) Simulation of the environmental climate conditions on Martian surface and its effect on *Deinococcus radiodurans*. *Adv Space Res* 40(11):1672–1677
- de los Ríos A, Wierzchos J, Sancho LG, Ascaso C (2004) Exploring the physiological state of continental Antarctic endolithic microorganisms by microscopy. *FEMS Microbiol Ecol* 50(3):143–152
- de los Ríos A, Ascaso C, Wierzchos J (2010) Study of lichens with different state of hydration by the combination of low temperature scanning electron and confocal laser scanning microscopies. *Int Microbiol* 2(4):251–257
- de Vera JP, Horneck G, Rettberg P, Ott S (2003) The potential of the lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space—I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *Int J Astrobiol* 1(4):285–293
- de Vera JP, Horneck G, Rettberg P, Ott S (2004a) The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space—II: germination capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions. *Adv Space Res* 33(8):1236–1243
- de Vera JP, Horneck G, Rettberg P, Ott S (2004b) In the context of panspermia: may lichens serve as shuttles for their bionts in space? In: *Proceedings of the Third European Workshop on Exo-Astrobiology*, 18–20 Nov 2003, Madrid, ESA SP-545, ESA ESTEC, The Netherlands, pp. 197–198
- de Vera JP, Rettberg P, Ott S (2008) Life at the limits: capacities of isolated and cultured lichen symbionts to resist extreme environmental stresses. *Orig Life Evol Biosph* 38(5):457–468
- de Vera JP, Möhlmann D, Butina F, Lorek, A., Wernecke, R. & Ott S (2010) Survival potential and photosynthetic activity of lichens under Mars-like conditions: a laboratory study. *Astrobiology* 10(2):215–227
- de Vera JP, Ott S (2010) Resistance of symbiotic eukaryotes. Survival to simulated space conditions and asteroid impact cataclysms. In: Seckbach J, Grube M (eds) *Symbioses and Stress: Joint ventures in biology*. Springer, Netherlands, pp. 595–611
- Gauslaa Y, Solhaug KA (2004) Photoinhibition in lichens depends on cortical characteristics and hydration. *Lichenologist* 36(2):133–143
- Gauslaa Y, McEvoy M (2005) Seasonal changes in solar radiation drive acclimation of the sun-screening compound parietin in the lichen *Xanthoria parietina*. *Basic Appl Ecol* 6(1):75–82
- Hájek J, Váczi P, Barták M, Jahnová L (2012) Interspecific differences in cryoresistance of lichen symbiotic algae of genus *Trebouxia* assessed by cell viability and chlorophyll fluorescence. *Cryobiology* 64(3):215–222
- Honegger R (2003) The impact of different long-term storage conditions on the viability of lichen-forming ascomycetes and their green algal photobiont, *Trebouxia* spp. *Plant Biology* 5(3):324–330
- Honegger R, Peter M, Scherrer S (1996) Drought-induced structural alterations at the mycobiont-photobiont interface in a range of foliose macrolichens. *Protoplasma* 190(3–4):221–232
- Horneck G, Stöffler D, Ott S, Hornemann U, Cockell CS, Moeller R, Meyer C, de Vera JP, Fritz J, Schade S, Artemieva NA (2008) Microbial rock inhabitants survive hypervelocity impacts on Mars-like host planets: first phase of lithopanspermia experimentally tested. *Astrobiology* 8(1):17–44
- Horneck G, Klaus DM, Mancinelli RL (2010) Space microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 74(1):121–156
- Horneck G, Moeller R, Cadet J, Douki T, Mancinelli RL, Nicholson WL, Panitz C, Rabbow E, Rettberg P, Spry A, Stackebrandt E, Vaishampayan P, Venkateswaran KJ (2012) Resistance of bacterial endospores to outer space for planetary protection purposes—experiment PROTECT of the EXPOSE-E mission. *Astrobiology* 12(5):445–456
- Kappen L (1988) Ecophysiological relationships in different climatic regions. *Handbook of Lichenology* 2:37–100
- Kranner I, Beckett R, Hochman A, Nash III TH (2008) Desiccation-tolerance in lichens: a review. *Bryologist* 111(4):576–593
- Meeßen J, Sánchez FJ, Brandt A, Balzer EM, de la Torre R, Sancho LG, de Vera JP, Ott S (2013a) Extremotolerance and resistance of lichens: comparative studies on five species used in astrobiological research I. Morphological and anatomical characteristics. *Orig Life Evol Biosph* 43(3):283–303
- Meeßen J, Sánchez FJ, Sadowsky A, de la Torre R, Ott S, de Vera JP (2013b) Extremotolerance and resistance of lichens: comparative studies on five species used in astrobiological research II. Secondary lichen compounds. *Orig Life Evol Biosph* 43(6):501–526
- Meeßen J, Backhaus T, Sadowsky A, Mrkalj M, Sánchez FJ, de la Torre R, Ott S (2014) Effects of UVC 254 nm on the photosynthetic activity of photobionts from the astrobiologically relevant lichens *Buellia frigida* and *Circinaria gyrosa*. *Int J Astrobiol* 13(4):340–352

- Nybakken L, Solhaug KA, Bilger W, Gauslaa Y (2004) The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats. *Oecologia* 140(2):211–216
- Olsson-Francis K, de la Torre R, Cockell CS (2010) Isolation of novel extreme-tolerant cyanobacteria from a rock-dwelling microbial community by using exposure to low Earth orbit. *Appl Environ Microbiol* 76(7): 2115–2121
- Onofri S, Selbmann L, Zucconi L, Pagano S (2004) Antarctic microfungi as models for exobiology. *Planet Space Sci* 52(1):229–237
- Onofri S, de la Torre R, de Vera JP, Ott S, Zucconi L, Selbmann L, Scalzi G, Vankateswaran KJ, Rabbow E, Sánchez Iñigo FJ, Horneck G (2012) Survival of rock-colonizing organisms after 1.5 years in outer space. *Astrobiology* 12(5):508–516
- Øvstedal DO, Lewis Smith RI (2001) Lichens of Antarctica and South Georgia. *Cambridge University Press*, pp. 361–363
- Rabbow E, Rettberg P, Barczyk S, Bohmeier M, Parpart A, Panitz C, Horneck G, von Heise-Rotenburg R, Hopenbrouwers T, Willnecker R, Baglioni P, Demets R, Dettmann J, Reitz G (2012) EXPOSE-E: an ESA astrobiology mission 1.5 years in space. *Astrobiology* 12(5):374–386
- Raggio J, Pintado A, Ascaso C, de la Torre R, de los Ríos A, Wierzchos J, Horneck G, Sancho LG (2011) Whole lichen thalli survive exposure to space conditions: results of LITHOPANSPERMIA experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* 11(4):281–292
- RedShift Report: Reviewers: van Bavinchove C, Beuselink T (2011) EXPOSE: Environmental history by calculation - EXPOSE-E simulation results. Ref: EXP-RP-017-RS ISS. A(2). RedShift Design and Engineering BVBA (125 pp)
- Sánchez FJ, Mateo-Martí E, Raggio J, Meeßen J, Martínez-Frías J, Sancho LG, Ott S, de la Torre R (2012) The resistance of the lichen *Circinaria gyrosa* (nom. Provis.) towards simulated Mars conditions—a model test for the survival capacity of an eukaryotic extremophile. *Planet Space Sci* 72(1):102–110
- Sánchez FJ, Meeßen J, Ruiz M, Sancho LG, Ott S, Vélchez C, Horneck G, Sadowsky A, de la Torre R (2014) UV-C tolerance of symbiotic *Trebouxia* sp. in the space-tested lichen species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: role of the hydration state and cortex/screening substances. *Int J Astrobiol* 13(1):1–18
- Sancho LG, de la Torre R, Horneck G, Ascaso C, de los Ríos A, Pintado A, Wierzchos J, Schuster M (2007) Lichens survive in space: results from the 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology* 7(3):443–454
- Scalzi G, Selbmann L, Zucconi L, Rabbow E, Horneck G, Albertano P, Onofri S (2012) LIFE experiment: isolation of cryptoendolithic organisms from Antarctic colonized sandstone exposed to space and simulated Mars conditions on the International Space Station. *Orig Life Evol Biosph* 42(2–3):253–262
- Solhaug KA, Gauslaa Y (1996) Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina*. *Oecologia* 108(3):412–418
- Solhaug KA, Gauslaa Y, Nybakken L, Bilger W (2003) UV-induction of sun-screening pigments in lichens. *New Phytol* 158(1):91–100
- Solhaug KA, Larsson P, Gauslaa Y (2010) Light screening in lichen cortices can be quantified by chlorophyll fluorescence techniques for both reflecting and absorbing pigments. *Planta* 231(5):1003–1011
- Stöffler D, Horneck G, Ott S, Hornemann U, Cockell CS, Moeller R, Meyer C, de Vera JP, Fritz J, Artemieva NA (2007) Experimental evidence for the potential impact ejection of viable micro-organisms from Mars and Mars-like planets. *Icarus* 186(2):585–588

5.4 STARLIFE VI: Simulated space radiation: Impact of four different types of high-dose ionizing radiation on the lichen *Xanthoria elegans*

A. Brandt, J. Meeßen, R. U. Jänicke, M. Raguse & S. Ott

Astrobiology

Der Artikel wurde am 21.12.2015 eingereicht. *In review.*

Impact Faktor: 2,585 (2014, 2015)

Der Artikel wurde vollständig vom Erstautor verfasst.

STARLIFE VI: Simulated space radiation: Impact of four different types of high-dose ionizing radiation on the lichen *Xanthoria elegans*

Annette Brandt¹, Joachim Meeßen¹, Reiner U. Jänicke², Marina Raguse³, Sieglinde Ott¹

¹*Institute of Botany, Heinrich-Heine-University (HHU), Düsseldorf, Germany*

²*Laboratory of Molecular Radiooncology, University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany*

³*Department of Radiation Biology, Institute of Aerospace Medicine, German Aerospace Center (DLR), Cologne, Germany*

Corresponding author: SieglindeOtt
phone / fax: 0049 211 8113537/ 8112881
e-mail: otts@hhu.de

Running title

Xanthoria elegans under simulated space radiation

Abstract

This study addresses the viability of the lichen *Xanthoria elegans* after high-dose ionizing irradiation in the frame of the two-part STARLIFE campaign. STARLIFE 1 was intended to resemble several types of Galactic Cosmic Radiation (GCR) as present beyond the magnetic shield of Earth. STARLIFE 2 applied γ -radiation up to 113 kGy to test the limit of lichen resistance to ionizing radiation. Entire thalli of *Xanthoria elegans* were irradiated in the anhydrobiotic state. After STARLIFE 1, the metabolic activity of both symbionts was quantified by live/dead staining using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). The photosynthetic activity was measured after STARLIFE 1 and 2 assessing the ability of the symbiotic green

algae to restore photosynthesis after irradiation. The STARLIFE campaign complements the results of the LIFE experiments at the EXPOSE-E facility on the ISS by testing the model organism *Xanthoria elegans* on its resistance to hazardous radiation that might be accumulated during long-term space exposure. In addition, the photosynthetic activity of metabolically active lichen was investigated after X-ray irradiation up to 100 Gy. Since previous astrobiological experiments were mostly performed with anhydrobiotic lichen, these experiments will broaden our knowledge on the correlation of physiological state and astrobiological stressors.

Keywords

Astrobiology, Extremotolerance, Gamma Rays, Ionizing Radiation, Lichens, Viability

Introduction

For the last two decades, astrobiological model organisms have been exposed to simulated or real space conditions (Koike et al. 1992, de Vera et al., 2010; de la Torre et al., 2010; Cockell et al. 2011, Horneck et al., 2012; Moeller et al., 2012; Onofri et al., 2012; Vaishampayan et al., 2012; Kawaguchi et al. 2013) to investigate their post-exposure viability and resistance. Besides several simulation studies, the lichen *Xanthoria elegans*, a symbiosis composed of a fungus and a coccal green alga, revealed remarkable resistance to space and Mars-analogue conditions during the LIFE experiment on EXPOSE-E on the International Space Station (ISS; Brandt et al., 2015, 2016). However, that 1.5 year space exposure did not report doses of ionizing radiation higher than 215 ± 16 mGy (Berger et al., 2012). To characterize the effects of GCR, solar flares, and solar cosmic radiation (SCR; Reitz, 2008; Berger et al., 2012), this study tested the metabolic activity and photosynthetic activity of the lichen *X. elegans* after irradiation with three types of space-relevant ionizing radiation: accelerated helium and iron ions (both particulate radiation), and X-rays (electro-magnetic radiation) with doses up to 2 kGy. Helium ions make for c. 14 % of baryonic GCR and 5-10 % of SCR and iron ions make for c. 0.03 % of GCR and less than 1 % of SCR (Horneck et al., 2010), while X-rays are a crucial part of SCR (Reitz, 2008). Despite their low occurrence, accelerated heavy ions are an important source of damage according to their high potential of energy deposition (Horneck et al., 2010) by for instance ionisations of molecules when decelerated in organic material. STARLIFE 2 tested the limit of resistance of *X. elegans* to γ -radiation (up to 113 kGy) which is a crucial part of primary cosmic radiation (Kraushaar et al., 1972), cosmic γ -ray bursts (Klebesadel et al., 1973; Verter, 1982), and solar flares (Ajello et al., 2014).

In STARLIFE 1 the metabolic activity of both lichen symbionts was quantified by LIVE/DEAD staining with FUN-1[®] and Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). After both STAR-

LIFE experiments the photosynthetic activity of the lichen photobiont (PB; *Trebouxia* sp.) was analyzed by chlorophyll *a* fluorescence as a valid measure of lichen post-exposure viability (Sánchez et al., 2014; Brandt et al., 2015). We focused on the PB only, since it is reported to be the more radio-sensitive lichen symbiont (Gannutz, 1972). As most of the previous studies, STARLIFE tested lichens only in anhydrobiosis which is a metabolically inactive state induced by desiccation (Crowe et al., 1992; Kramer et al., 2008) that invokes protective mechanisms and facilitates enduring harmful environmental conditions. Therefore, an additional X-ray irradiation was conducted with metabolically activated lichens (AL/ALOS) to assess the resistance of photosynthetic activity to doses up to 100 Gy when wet. Testing the effects of ionizing radiation on the model lichen *Xanthoria elegans* complements the results of the LIFE experiment and is an appropriate simulation for future deep space exposure experiments.

Material and Methods

***Xanthoria elegans* (Link) Th. Fr. (1860):** Samples were collected in August 2013 from their alpine habitat, Col du Sanetsch, Valais, Switzerland (46°21'48"N, 07°17'51"E) at c. 2140 m a.s.l. and stored at -25°C until further use. The thalli were derived from the same habitat as those of previous simulation experiments and of the LIFE experiment (de Vera et al., 2010; Brandt et al., 2015, 2016).

Sample preparation: For all experiments, c. 0.25 mg of desiccator-dried, i.e. anhydrobiotic, thallus samples were transferred to 0.2 ml reaction tubes. Additionally, we used two sets of wet thalli with diameters of 0.2-0.5 cm, one set was prepared from its substrate (AL) and the other remained on schist rock (ALOS) to test the effect of X-rays on metabolically active lichens. These samples were fixed in petri-dishes for all experimental phases of re-activation, exposure and chlorophyll *a* fluorescence measurements. The re-activation was performed for 4 days by spraying with water once a day and directly before the measurements. The photosynthetic activity directly before the experiment served as control.

Irradiation: The particulate radiation was applied at the HIMAC facility at the National Institute of Radiological Sciences (NIRS) in Chiba, Japan. One set of *X. elegans* samples was irradiated with highly accelerated iron ions (500 MeV/n, LET 200 keV/μm at doses of 50, 100, 250, 500, 1,000, and 2,000 Gy, 12 Gy/min, 3 replicates each), and a second one with accelerated helium ions (150 MeV/n, LET 2.2 keV/μm, at doses of 50, 100, 500, and 1,000 Gy, 4 Gy/min, 3 replicates each). The X-ray irradiation was performed at DLR Cologne by a X-ray tube (Mueller Type MG 180, Germany) with doses of 50, 100, 250, 500, 1,000, and 2,000 Gy (200 keV/15 mA, LET 1-2 keV/μm, 3 replicates each). The γ-irradiation was realized with a ⁶⁰Cobalt source (1.17 and 1.33 MeV/n, LET 0.3 keV/μm), applying doses of 6, 12, 18, 24, 47, 72, and 113 kGy to 6 replicates each. All experiments included lab controls (kept at -20 °C) and non-irradiated transport controls. For an extensive coverage of the technical details,

please refer to Raguse et al. (2016, *this issue*). The tests with metabolically active *X. elegans* samples were performed with an X-ray device (Gulmay RS225 Isodose Control, Bochum, Germany) at the Molecular Radiooncology in Düsseldorf, Germany. Three replicates each were exposed to acute X-ray doses of 1, 5, 10, 25, 50, and 100 Gy (175 keV/15 mA, LET 1-2 keV/μm) with a rate of 3-3.3 Gy/min.

Metabolic activity: Thallus cross-sections of 120 μm were dyed with FUN-1[®] and analyzed by CLSM to allow discrimination and quantification of metabolically active and inactive photo- and mycobiont cells (as described in Brandt et al., 2015). Therefore, 4–8 micrographs of each replicate were analyzed and the results are shown as mean percentage ± SD of active cells over total cells counted.

Chlorophyll *a* fluorescence: The photosynthetic activity was assessed by measuring the maximum quantum yield (QY; Fv/Fm) by a pulse-amplitude-modulated fluorometer (PAM; Heinz Walz GmbH, Germany; refer to Meeßen et al., 2014). All samples were re-activated as described above. The samples were dark adapted for 30 min prior to all measurements, measured during initial activation (0 min, 5 min, 1 h), and after 24, 48, 72 h of regeneration. The already hydrated and active AL/ALOS-samples were measured directly after the X-ray radiation (5 min, 1 h) and after 24, 48, 72 and 96 h of recovery.

Statistics: All statistics, including one- and two-way ANOVA, regression and standard deviation were performed using Microsoft[®] Excel 2010 and GraphPad InStat 3 software.

Results

STARLIFE 1

Irradiation with highly accelerated iron ions: Iron ions elicited an effect on the metabolic activity of the photobiont (PB) and the mycobiont (MB; **Fig.1a**). Nonetheless, a clear dose-dependent reduction of metabolic activity did not occur. The metabolic activity rates of the PB were 72 % in the lab and 51 % in the transport control, while it ranged from 57 % (100 Gy) to 32 % (250 Gy) in the irradiated samples. The PB was affected by iron ions at all doses > 100 Gy. The metabolic activity of the MB revealed 84 % in the lab and 69 % in the transport control, and ranged from 69 % (100 Gy) to 43 % (250 Gy) in the irradiated samples. Compared to the control, the metabolic activity of the MB is less affected than the PB, which also holds true for all other conditions of STARLIFE 1. The highest applied dose (2 kGy) reduced the metabolic activity of the PB to 37 % and of the MB to 66 %.

The results of the photosynthetic activity show that recovery from the anhydrobiotic state took about 24 h (**Fig. 1b**). Afterwards, all irradiated samples showed QY values at about 0.7, well conforming the QY of the controls. The photosynthetic activity was not affected by irradiation with iron ions.

Irradiation with accelerated helium ions: Helium ions evoked a reduction of metabolic activity in both symbionts, but again, a clear dose-dependent correlation was not given (**Fig. 1c**). The PB showed metabolic activity rates of 72 % and 48 % in the lab and transport control while the irradiation doses of 100, 500, and 1000 Gy reduced metabolic activity rates to 57 %, 22 %, and 27 %, respectively. The MB showed metabolic activity rates of 84 % and 65 % in the lab and transport control while the metabolic activity rates at 100, 500, and 1000 Gy reached 83 %, 62 %, and 49 %, respectively. The decrease of the metabolic activity of both symbionts was clearly affected by the helium ions but their impairment is insignificantly dose-related.

The photosynthetic activity is impaired at a dose of 100 Gy only (**Fig. 1d**). After 48 and 72 h of recovery the QY values of the 500 and 1000 Gy samples reached the level of the control samples. As seen in the live/dead assay, high variety among the replicates showed a heterogeneous impairment of the samples.

Irradiation with X-rays: The X-ray irradiation caused the most pronounced decrease in metabolic activity concerning the photobiont (**Fig. 1e**). Significant and roughly dose-related decreases of metabolic activity were observed in the PB of all samples exposed from 100 to 2,000 Gy, ranging from 47 % (100 Gy) to 9 % (500 Gy), with 27 % at 2,000 Gy. The MB showed a roughly dose-related decrease of metabolic activity from 67 % (100 Gy) to 53 % (2,000 Gy) with significant decreases above 250 Gy.

In contrast, the photosynthetic activity (**Fig. 1f**) did not reveal any difference to the control groups, regardless of the applied X-ray doses up to 2,000 Gy.

CLSM-micrographs of the live/dead assay: The micrographs (**Fig. 2**) exemplify the discrimination of metabolically active (fluorescence shown in yellow to red colour) and inactive (green coloured) MB and PB in the cross-section of *X. elegans*. Additionally, massively deformed, dead PB had been observed.

STARLIFE 2

Irradiation with γ -radiation: The experiment revealed the limits of resistance towards γ -rays as a significant and dramatic dose-dependent decrease was observed (**Fig. 3**). The decrease was the more pronounced the longer the post-irradiation recovery period was. With a dose of 6 kGy no decrease of photosynthetic activity was recognized, but with all irradiation doses > 12 kGy there was a significant decrease of photosynthetic activity after recovery periods of 48 and 72 h. While a dose of 18 kGy evoked a residual photosynthetic activity of c. 0.25, all applied γ -radiation doses \geq 24 kGy inactivated the photosynthetic activity completely (QY < 0.1) during the 72 h recovery period. The results revealed the limit of the PB to resist acute high-dose γ -irradiation between 12 and 18 kGy.

AL/ALOS

Activated, metabolizing and photosynthesizing lichens were irradiated with acute X-ray doses ≤ 100 Gy and the PB was investigated by QY measurements (**Fig. 4**). The recovery period was extended to 96 h. The X-ray irradiation did not affect the photosynthetic activity of the activated samples in the 96 h duration of the experiment and all measurements corresponded to the controls. Solely with activated lichens on schist (ALOS) after a dose of 100 Gy, the QY measurements revealed a temporary but significant dose-dependent impairment of photosynthetic activity directly after irradiation (5 min, 1 h) that vanished with increasing recovery time.

Discussion

In STARLIFE 1, a fraction of cells of both symbionts survived all tested quantities and qualities of ionizing radiation. Different radiation qualities are for instance characterized by their potential to cause ionisations and excitations in the passed-by molecules of a traversed matter. In this process accelerated ions get decelerated by passing their acceleration energy to the biological matter. Ionisations and excitations impose direct and indirect damage to functional biological molecules (DNA, enzymes; Krieger, 2004; Gómez-Tejedor & Fuss, 2012). The amount of ionisation events per μm is referred to as linear energy transfer (LET). Despite its high LET (200 keV/ μm), iron ions produced less inactivated cells than X-rays and helium ions. In contrast, X-rays caused a stronger decrease of metabolically active cells, as the photons passed its energy effectively to the lichen thallus. The survival of cells and the effects of the different radiation qualities might be explained by the following phenomena: (i) The high energy of Bragg peak events, i.e. the final energy deposition of decelerated ions (Hirao et al., 1992) did not occur frequently in dry lichen thalli due to the high acceleration energy especially of iron ions and the very small physical dimension of the lichen. (ii) Decreasing effectiveness with increasing LET of accelerated ions (as iron ions) has been observed in biological samples before (Zirkle et al., 1953) partially explainable by overkill effects (Mehnati et al., 2005). (iii) The destructive potential of X-rays is realized by a cascade of secondary electrons (i.e. pair production, Compton scattering) with multiplied interactions events. Secondary electrons can sufficiently induce DNA strand breaks and molecular fragmentation (Boudaïffa et al., 2000; Hunter & Muirhead, 2009). High energy secondary electrons are not considered at LET value measurements. (iv) The radiation weighting factors (ω_R) which are 1 for γ - and X-rays and 20 for both ions and rely on observed biological damages in hydrated, metabolizing cells resp. tissues (ICRP, 2007), are biased. The production of free radicals from the radiolysis of water and therefore the damage by reactive species (Kovács & Keresztes, 2002) is significantly reduced in dry samples. (v) Plant cells do not necessarily die, when damaged

(Esnault et al. 2010). The effect of radiation especially on DNA might be delayed, and showing not until the next mitotic cell division. This may also explain why neither *X. elegans* nor the isolated PB of *Circinaria gyrosa* could be cultivated despite the demonstrated metabolic activity (Meeßen et al., 2016, *this issue*).

While the photosynthetic activity is not significantly impaired by radiation up to 2,000 Gy (**Fig. 1b, d, f**), the metabolic activity decreased, more pronounced for the PB (**Fig. 1a, c, e**). This might be explained by a different sensitivity of the two test systems. Concerning the photosynthetic activity after high-dose γ -ray exposure, the QY values of *X. elegans* are comparable to those recorded for the isolated *Trebouxia* sp.-PB of *C. gyrosa* and for *C. gyrosa* itself (Meeßen et al., 2016; de la Torre et al., 2016; *both this issue*) but the isolated PB showed no growth after any of the applied γ -ray doses. Therefore, the QY measurements or live/dead staining may just demonstrate the upper limit of lichen resistance, as explained above (v). The impairment of metabolic activity was not or only roughly dose related, showing for instance higher rates of metabolic activity after 2000 Gy than after 500 Gy X-ray. The effects of irradiation on living cells are known to be stochastic and therefore not dose-related (Leenhouts & Chadwick, 1989; Little, 2003). In addition, the occurrence of such damages might be considerably delayed in the biological phase of radiation effects (Dertinger & Jung, 1969).

Another aspect of resistance to ionizing radiation is the low water content of anhydrobiotic lichen thallus, which is < 5 % of thallus dry weight under ambient conditions; (Jahns, 1984) and may be lower under extremely desiccating space or Mars conditions. Ionizing radiation causes the radiolysis of water which is the primary source of free radicals in cells which subsequently damage crucial cellular compounds (Riley, 1994; Kovács & Keresztes, 2002). Moreover, fungal and algal cells are adapted to desiccation stress and harbour a protective enzyme inventory to counteract increased levels of radicals (Kranner et al., 2005; 2008).

In addition, lichens are modular organisms composed of septate fungal hyphae and unicellular algal cells with minor differentiation in both symbionts. No one cell is more critical for survival than another (Gannutz, 1972) and compromised cells can be replaced. The superior resistance of the MB might be due to its polykaryotic, syncytial organization where septal pores and anastomoses allow the relocation of cytoplasm, cell organelles, and nuclei (Gow & Gadd, 1995). Therefore, DNA damages might be compensated by increased gene copy numbers or by replacing damaged nuclei. Thus, the present study stresses that the viability of the more (radio)-sensitive PB is the limiting factor of lichen survival, as already found in previous studies (de Vera & Ott, 2010; Brandt et al., 2015; Meeßen et al., 2015). Previous studies on irradiated lichens mostly refer to chronic radiation of active lichens in their natural habitats, revealing lichens resp. their symbionts to be among the most radiation-tolerant organisms in an irradiated forest or at the Nevada test site (Woodwell et al., 1967; Shields & Rickard, 1961). Isolated lichen symbionts were irradiated in wet state with by Gannutz (1972), showing a 50% survival of isolated lichen photobionts after 90-480 Gy of γ -rays. In the same experiment the

mycobionts forming crustose lichens showed even higher resistance towards acute γ -irradiation.

While STARLIFE 1 revealed metabolic impairment with doses > 100 Gy, the AL/ALOS experiments indicated that photosynthetic activity is not inhibited by acute X-ray doses < 100 Gy when the lichen is metabolically active (**Fig. 1e**). The temporary, dose-dependent impairment of photosynthetic activity was only evident in samples on natural substrate. This might be due to enhancing effects of the substrate, such as additional scattered radiation reflected to the lichen. The putative alterations of radiation, caused by materials surrounding an organism irradiated with *i.e.* GCR, might be of interest for astrobiological research. The results of our experiments emphasize a certain degree of resistance of extremotolerant lichens as *Xanthoria elegans* to ionizing radiation and indicate their relevance for future astrobiological experiments in deep space beyond LEO.

Acknowledgements

The authors thank the Department of Radiation Biology at the DLR in Cologne, Germany, and the HIMAC team at the NIRS in Chiba, Japan, especially Ralf Moeller, Marina Raguse, and Ryuichi Okayasu for the opportunity to take part in the STARLIFE campaign. We also thank the DLR Project Funding Agency for funding the work of Annette Brandt (50BW1216). Finally, we thank the anonymous reviewers for their comments and suggestions.

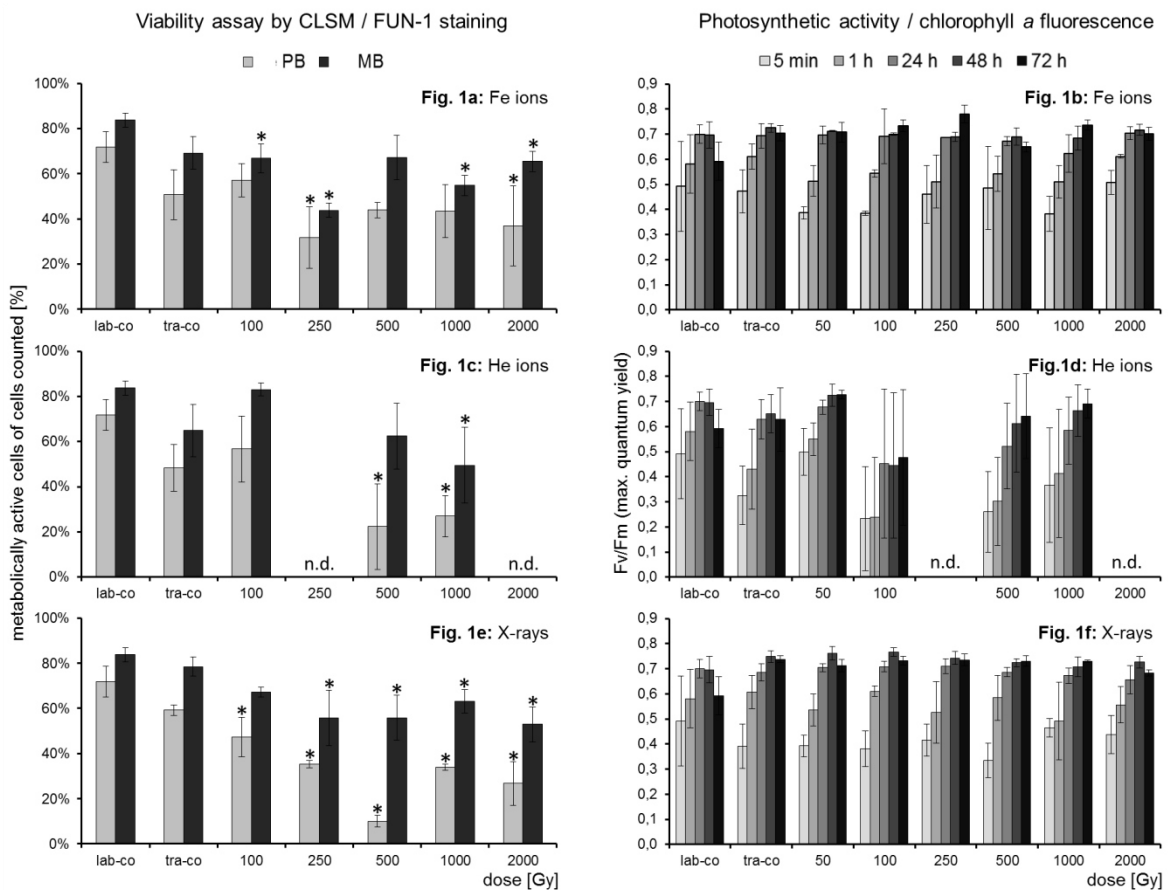
References

- Ajello, M., Albert, A., Allafort, A., Baldini, L., Barbiellini, G., Bastieri, D., et al. (2014) Impulsive and long duration high-energy gamma-ray emission from the very bright 2012 March 7 solar flares. *Astrophys J* **789**(1) doi.org/10.1088/0004-637X/789/1/20
- Beck-Bornholdt, H.P., Dubben, H.H., Willers, H. (1997) Proliferationsrate und Strahlenempfindlichkeit. *Strahlentherapie und Onkologie* **173** (6):335-337.
- Berger, T., Hajek, M., Bilski, P., Körner, C., Vanhavere, P., Reitz, G. (2012) Cosmic radiation exposure of biological test systems during the EXPOSE-E mission. *Astrobiology* **12**(5):387-392.
- Boudaïffa, B., Cloutier, P., Hunting, D., Huels, M.A., Sanche, L. (2000) Resonant formation of DNA strand breaks by low-energy (3 to 20 eV) electrons. *Science* **287**(5458):1658-1660.
- Brandt, A., de Vera, J.-P., Onofri, S., Ott, S. (2015) Viability of the lichen *Xanthoria elegans* and its symbionts after 18 months of space exposure and simulated Mars conditions on the ISS. *Int J Astrobiol* **14**(3):411-425.
- Brandt, A., Posthoff, E., de Vera, J.-P., Onofri, S., Ott, S. (2016). Characterization of viability, growth and ultrastructural effects of the *Xanthoria elegans* photobiont after 1.5 years of space exposure on the International Space Station. *Orig Life Evol Biosph* **46**:311-32.
- Cockell, C. S., Rettberg, P., Rabbow, E., Olsson-Francis, K. (2011). Exposure of phototrophs to 548 days in low Earth orbit: microbial selection pressures in outer space and on early earth. *The ISME journal* **5**(10): 1671-1682.
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., Crowe, L. M. (1992) Anhydrobiosis. *Ann Rev Physiol* **54**(1):579-599.

- de la Torre, R., Sancho, L.G., Horneck, G., de los Ríos, A., Wierzchos, J., Olsson-Francis, K., et al. (2010) Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions – Results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus* **208** (2):735-748.
- de la Torre, R., Miller, A.Z., Cubero, B., Martín-Cerezo M.L., Raguse, M., Meeßen, J. (2016) STARLIFE VII: The effect of high-dose ionizing radiation on the astrobiological model lichen *Circinaria gyrosa*. *Astrobiology* (this issue).
- de Vera, J.-P., Möhlmann, D., Butina, F., Lorek, A., Wernecke, R., Ott, S. (2010). Survival potential and photosynthetic activity of lichens under Mars-like conditions: a laboratory study. *Astrobiology* **10**(2):215-227.
- de Vera, J.-P., Ott S (2010) Resistance of symbiotic eukaryotes. Survival to simulated space conditions and asteroid impact cataclysms. In: *Symbioses and stress: Joint ventures in biology. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology* **17**, edited by Seckbach, J. and Grube, M., Springer, Dordrecht, pp 595-611.
- Dertinger, H., Jung, H. (1969) *Molekulare Strahlenbiologie: Vorlesungen über die Wirkung ionisierender Strahlen auf elementare biologische Objekte* (Vol. 57). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Esnault, M.A., Legue, F., Chenal, C. (2010) Ionizing radiation: advances in plant response. *Env Exp Bot* **68**(3):231-237.
- Gannutz, T.P. (1972) Effects of gamma radiation on lichens—i. acute gamma radiation on lichen algae and fungi. *Radiation Bot* **12**(5):331-338.
- Gómez-Tejedor, G.G., Fuss, M.C. (Eds.). (2012). *Radiation Damage in Biomolecular Systems*. Springer Science & Business Media.
- Gow, N.A.R., & Gadd, M.G., Eds. (1995) *The growing fungus*. Chapman and Hall, London. pp 75-134.
- Hirao, Y., Ogawa, H., Yamada, S., Sato, Y., Yamada, T., Sato, et al. (1992) Heavy ion synchrotron for medical use - HIMAC project at NIRS-Japan. *Nuclear Physics A* **538**:541-550.
- Horneck, G., Klaus, D.M., Mancinelli, R.L. (2010) Space microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**(1):121-156.
- Horneck, G., Moeller, R., Cadet, J., Douki, T., Mancinelli, R.L., Nicholson, W.L., et al. (2012) Resistance of bacterial endospores to outer space for planetary protection purposes - experiment PROTECT of the EXPOSE-E mission. *Astrobiology* **12**(5):445-456.
- Hunter, N., Muirhead, C.R. (2009) Review of relative biological effectiveness dependence on linear energy transfer for low-LET radiations. *J Radiat Protection* **29**(1):5.
- ICRP, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. *Ann. ICRP* **37**:2-4.
- Jahns, H.M. (1984) Morphology, reproduction and water relations - a system of morphogenetic interactions in *Parmelia saxatilis*. *Nova Hedwiga*, Suppl. **79**:715-738.
- Kawaguchi, Y., Yang, Y., Kawashiri, N., Shiraishi, K., Takasu, M., Narumi, I., ... Momoki, Y. H. (2013). The possible interplanetary transfer of microbes: Assessing the viability of *Deinococcus* spp. under the ISS environmental conditions for performing exposure experiments of microbes in the Tanpopo mission. *Orig Life Evol Biosph* **43**:411-428.
- Koike, J., Oshima, T., Koike, K. A., Taguchi, H., Tanaka, R., Nishimura, K., Miyaji, M. (1992). Survival rates of some terrestrial microorganisms under simulated space conditions. *Advances in Space Research* **12**(4): 271-274.
- Kovács, E., Keresztes, Á. (2002) Effect of gamma and UV-B/C radiation on plants cells. *Micron* **33**:199-210.
- Klebesadel, R.W., Strong, I.B., & Olson, R.A. (1973) Observations of Gamma-Ray Bursts of Cosmic Origin. *Astrophys J* **182**:L85-L88.
- Kranner, I., Beckett, R., Hochman, A., Nash, T.H. (2008) Desiccation-tolerance in lichens: a review. *Bryologist* **111**(4):576-593.
- Kranner, I., Cram, W.J., Zorn, M., Wornik, S., Yoshimura, I., Stabentheiner, E., Pfeifhofer, H.W. (2005) Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proc Nat Acad Sci* **102**(8):3141-3146.
- Kraushaar, W.L., Clark, G.W., Garmire, G.P., Borke, R., Higbie, P., Leong, V., et al. (1972) High-energy cosmic gamma-ray observations from the OSO-3 satellite. *Astrophys J* **177**:341-363.
- Leenhouts, H.P., Chadwick, K.H. (1989) The molecular basis of stochastic and nonstochastic effects. *Health Phys* **57**(Suppl 1):343-8.
- Little, M.P. (2003) Risks associated with ionizing radiation environmental pollution and health. *British Medical Bulletin* **68**(1):259-275.

- Meeßen, J., Backhaus, T., Sadowsky, A., Mrkalj, M., Sánchez, F.J., de la Torre, R., et al. (2014) Effects of UVC_{254nm} on the photosynthetic activity of photobionts from the astrobiologically relevant lichens *Buellia frigida* and *Circinaria gyrosa*. *Int J Astrobiol* **13**(4):340-352.
- Meeßen, J., Wuthenow, P., Schille, P., Rabbow, E., de Vera, J.-P., Ott, S. (2015) Resistance of the lichen *Buellia frigida* to simulated space conditions during the pre-flight tests for BIOMEX – viability assay and morphological stability. *Astrobiology* **15**(8):601-615.
- Meeßen, J., Backhaus, T., Brandt, A., Raguse, M., de Vera, J.-P., de la Torre, R. (2016) STARLIFE VIII: The effect of high dose ionizing radiation on the isolated photobiont of the astrobiological model lichen *Circinaria gyrosa*. *Astrobiology (this issue)*.
- Mehnati, P., Morimoto, S., Yatagai, F., Furusawa, Y., Kobayashi, Y., Wada, S., et al. (2005) Exploration of the “over kill effect” of high LET Ar- and Fe-ions by evaluating the fraction of non-hit cell and interphase death. *J Radiat Res* **46**(3):343-350.
- Moeller, R., Reitz, G., Nicholson, W.L. and the PROTECT Team, Horneck, G. (2012) Mutagenesis in bacterial spores exposed to space and simulated Martian conditions: Data from the EXPOSE-E spaceflight experiment PROTECT. *Astrobiology* **12**(5):457-468.
- Onofri, S., de la Torre, R., de Vera, J.-P., Ott, S., Zucconi, L., Selbmann, L., et al. (2012) Survival of rock-colonizing organisms after 1.5 years in outer space. *Astrobiology* **12**(5):508-516.
- Raguse, M., Berger, T., Hellweg, C.E., Fujimori, A., Okayasu, R., STARLIFE Team, Moeller, R. (2016) STARLIFE I: Studying the effects of galactic cosmic radiation on astrobiological model systems: introducing the STARLIFE intercomparison initiative. *(this issue)*.
- Reitz, G. (2008) Characteristics of the radiation field in low Earth orbit and in deep space. *Z Med Phys* **18**(4):233-243
- Riley, P.A. (1994) Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Rad Biol* **65**(1):27-33.
- Sánchez, F.J., Meeßen, J., Ruiz, M., Sancho, L.G., Ott, S., Vílchez, C., et al. (2014) UV-C tolerance of symbiotic *Trebouxia* sp. in the space-tested lichen species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: role of the hydration state and cortex/screening substances. *Int J Astrobiol* **13**(1):1-18.
- Shields, L.M., Rickard, W.H. (1961). A preliminary evaluation of radiation effects at the Nevada test site. *In: Recent Advances in Botany*, University of Toronto Press New York, 1387-1390.
- Vaishampayan, P.A., Rabbow, E., Horneck, G., Venkateswaran, K.J. (2012) Survival of *Bacillus pumilus* spores for a prolonged period of time in real space conditions. *Astrobiology* **12**(5):487-497.
- Verter, F (1982) Cosmic gamma-ray bursts. *Physics Reports* **81**(4):293-349.
- Woodwell, G.M., Gannutz, T.P. (1967) Effects of chronic gamma irradiation on lichen communities of a forest. *American J Bot* **54**(10):1210-1215.
- Zirkle, R.E., Cornelius, A.T. (1953) Effects of ploidy and linear energy transfer on radiobiological survival curves. *Arch Biochem Biophys* **47**(2):282–306.

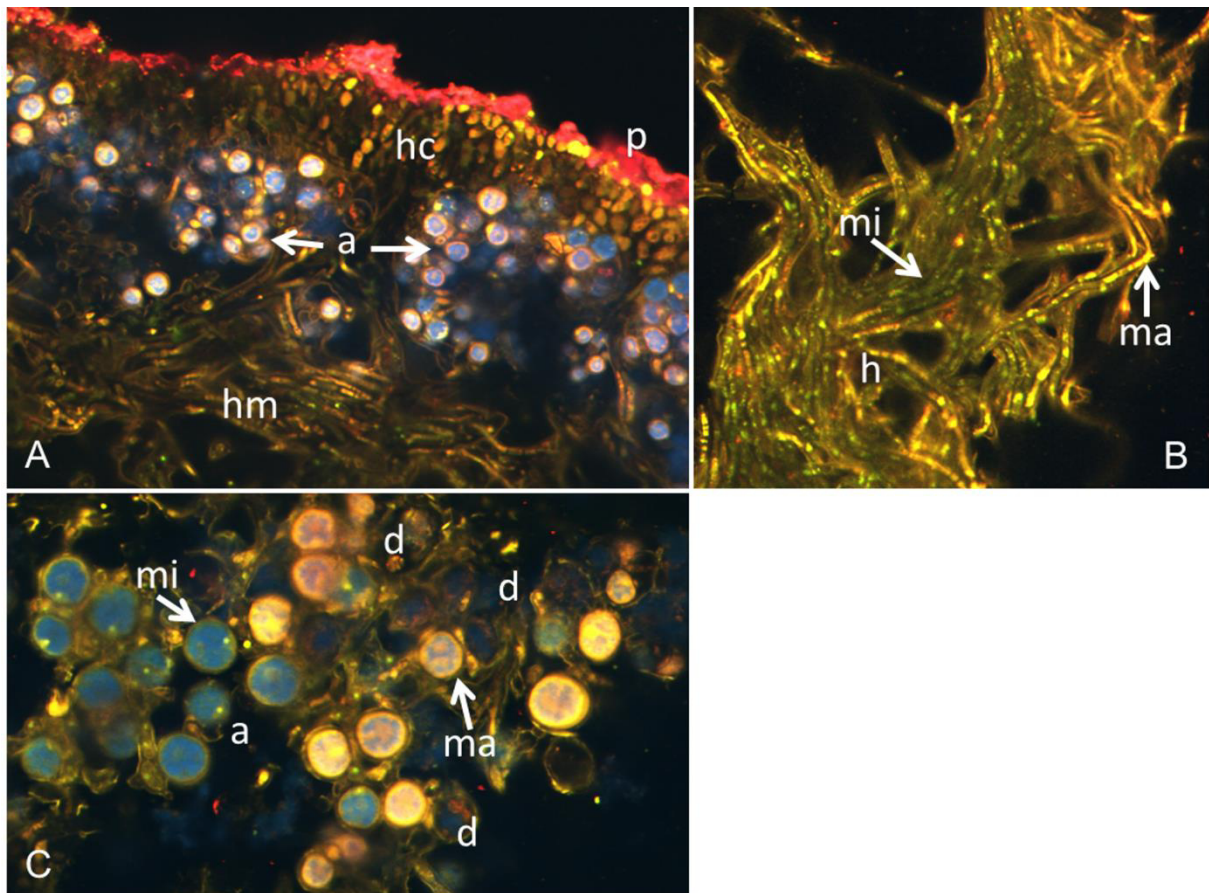
Fig. 1: Metabolic activity and photosynthetic quantum yield after STARLIFE 1



Iron ions (1a,b), helium ions (1c,d) and X-rays (1e,f) were applied in doses of 100-2,000 Gy. Left tablet: mean percentage of metabolically active cells in irradiated samples and untreated controls achieved by live/dead staining.

Right tablet: mean values of the maximum quantum yield, measured during recovery from anhydrobiosis (5 min, 1 h) and for three following days (24, 48, 72 h) in the activated state.

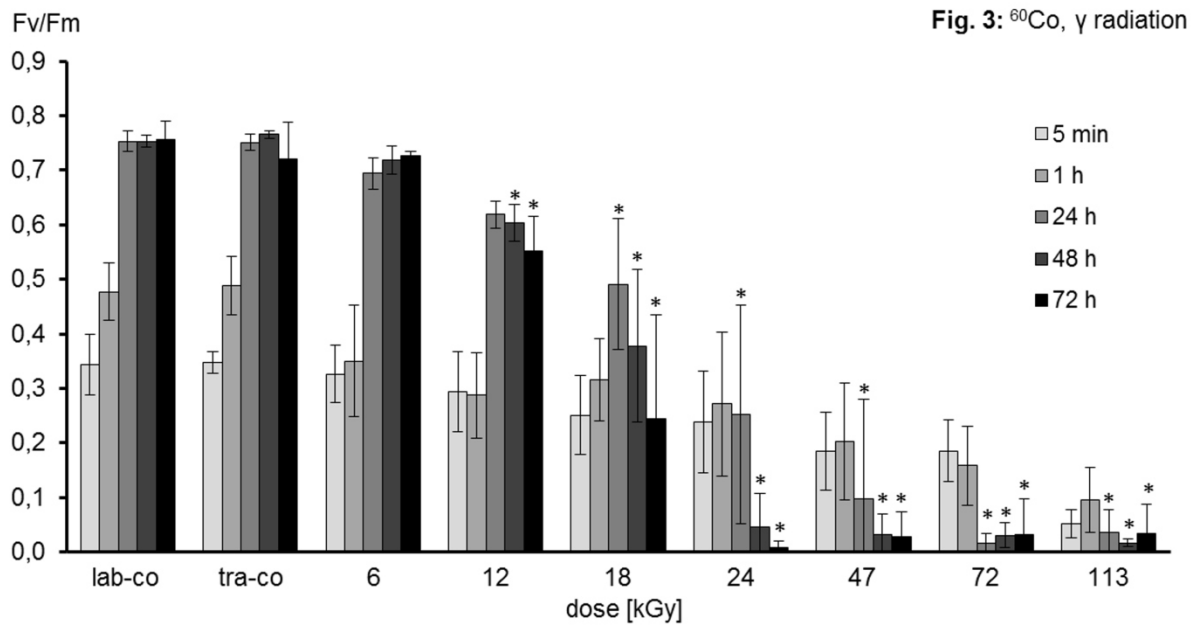
Fig. 2: *Xanthoria elegans*, FUN-1 stained CLSM images



2A, lab control: lichen thallus cross-section, p pigmented cortex, hc cortical hyphae (MB), a PB in algal layer, mostly metabolically active (chlorophyll fluorescence in blue), hm MB in loose medulla.

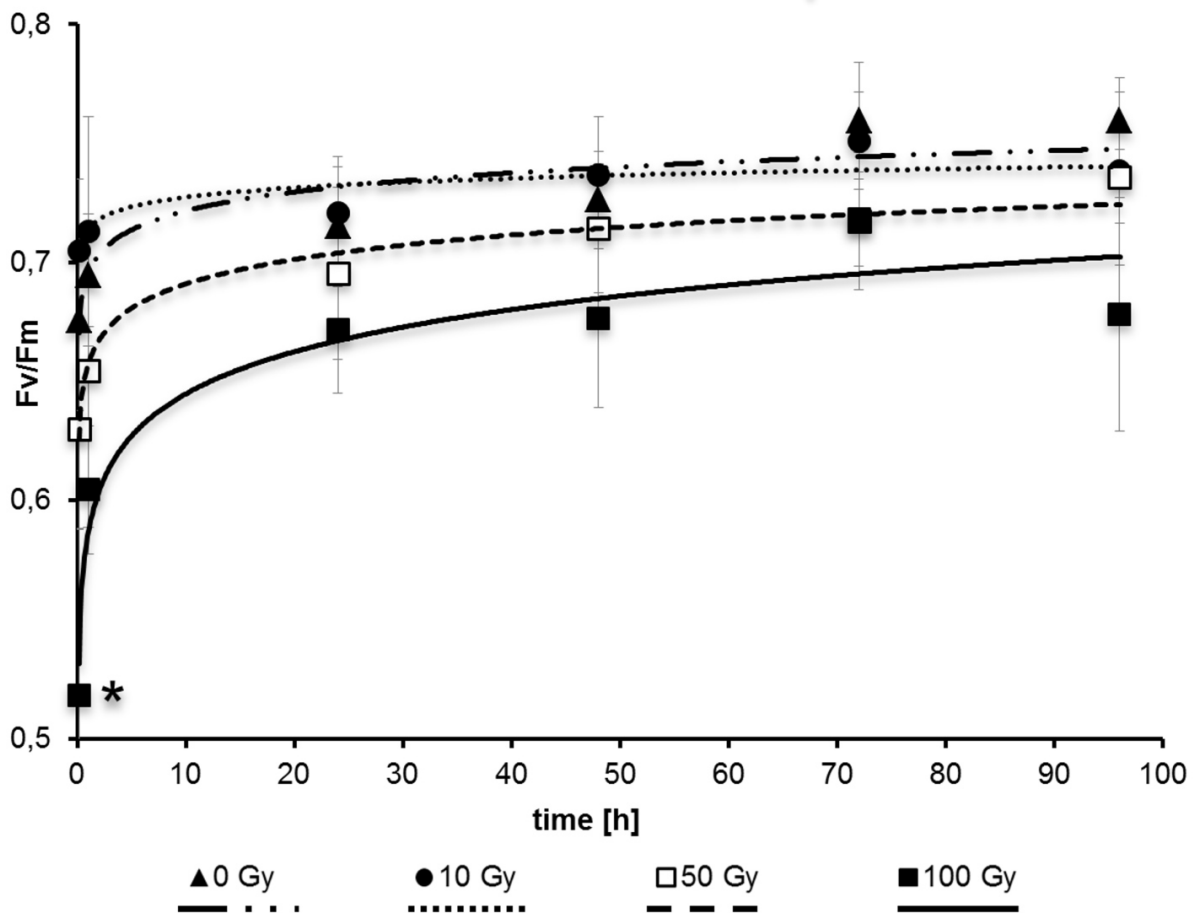
2B, transport control: hyphae of MB. 2C, iron ions, 1000 Gy: PB and adherent MB hyphae. mi metabolically inactive (green), ma metbolically active (yellow-red), d degenerated/dead algae.

Fig. 3: Photosynthetic quantum yield after STARLIFE 2



Lichen samples experienced γ -ray irradiation of 6-113 kGy. Mean values of the maximum quantum yield (QY, n=6), measured during recovery from anhydrobiosis (5 min., 1 h) and for three following days (24, 48, 72 h) in the activated state.

Fig. 4: Photosynthetic quantum yield after ALOS



X-ray irradiation of 1-100 Gy of activated lichen on schist revealed a significant but temporary dose-related decrease of photosynthetic activity directly (5 min., 1 h) after the irradiation.

5.5 STARLIFE VIII: The effect of high-dose ionizing radiation on the isolated photobiont of the astrobiological model lichen *Circinaria gyrosa*

J. Meeßen, T. Backhaus, A. Brandt, M. Raguse, U. Böttger, J.-P. de Vera & R. de la Torre

Astrobiology

Der Artikel wurde am 21.12.2015 eingereicht. *In review.*

Impact Faktor: 2,585 (2014, 2015)

20% der Auswertung und Interpretation sowie 10% der Labortätigkeit für diesen Artikel wurden als Teil der vorliegenden Dissertation vom 3. Autor durchgeführt.

STARLIFE VIII: The effect of high-dose ionizing radiation on the isolated photobiont of the astrobiological model lichen *Circinaria gyrosa*

Joachim Meeßen¹, Theresa Backhaus¹, Annette Brandt¹, Marina Raguse², Ute Böttger³, Jean-Pierre de Vera⁴, and Rosa de la Torre⁵

¹*Institute of Botany, Heinrich-Heine-University (HHU), Duesseldorf, Germany*

²*Department of Radiation Biology, Institute of Aerospace Medicine, German Aerospace Center (DLR), Cologne, Germany*

³*Institute of Optical Sensor Systems, German Aerospace Center (DLR), Berlin, Germany*

⁴*Institute of Planetary Research, German Aerospace Center (DLR), Berlin, Germany*

⁵*Departamento de Observación de la Tierra, Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial (INTA), Madrid, Spain*

Corresponding author: Joachim Meeßen
phone / fax: 0049 211 8113262 / 8112881
e-mail: joachimmeessen@gmx.de

Running title

Effect of ionizing radiation on lichen photobionts

Abstract

Lichen symbioses between fungi and algae represent successful life strategies to colonize the most extreme terrestrial habitats. Consequently, space exposure and simulation experiments demonstrated their high capacity of survival and thus lichens became models in astrobiological research to fathom the limits and limitations of terrestrial life. The STARLIFE campaign investigated the resistance of astrobiological model organisms to Galactic Cosmic Radiation (GCR) which is one of the lethal stressors of extraterrestrial environments. Since previous studies identified the alga to be the more sensitive lichen symbiont, we choose the isolated photobiont of the astrobiological model *Circinaria gyrosa* to take part in the campaign. Therein, GCR was exemplified by γ -radiation up to 113 kGy and its effects were analyzed by

chlorophyll *a* fluorescence of photosystem II (PS II), cultivation assays, live/dead staining and Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM), and Raman Laser Spectroscopy (RLS). The results revealed dose-dependent impairment of photosynthesis, stop of cell proliferation, cellular damages, decrease of metabolic activity, and degradation of photosynthetic pigments. While previous investigations on other extraterrestrial stressors demonstrated a high potential of resistance, this study reveals the limits of photobiont resistance to ionizing radiation and characterizes γ -radiation induced damages. It also supports parallel STARLIFE studies on the lichens *Circinaria gyrosa* and *Xanthoria elegans* (de la Torre et al., 2016; Brandt et al., 2016; *both this issue*).

Keywords

Astrobiology, Gamma Rays, Extremotolerance, Ionizing Radiation, Lichens, Photobiont

Introduction

Most lichens represent an association of a fungus (mycobiont) and a photoautotrophic green alga (photobiont; PB). Both symbionts form a complex phenotype with multiple adaptations to extreme environments, such as morphological traits (Meeßen et al., 2013), protective secondary compounds (Meeßen et al., 2014a) and anhydrobiosis, which is a state of metabolic inactivity under desiccating conditions (Kraner et al., 2008). Therefore, lichens became models in astrobiology and subjects of space and simulated experiments (Sancho et al., 2008) to investigate post-exposure viability and damages. Our model, *Circinaria gyrosa*, is currently exposed to Low Earth Orbit (LEO) and simulated Mars conditions for 1.5 years during the BIOMEX-experiment on EXPOSE-R2 outside the ISS. *C. gyrosa* took also part in spaceflight experiments as LITHOPANSPERMIA on BIOPAN 6 (de la Torre et al., 2010; Raggio et al., 2011) and in simulations of Mars-like atmosphere, UVR, and temperatures (Sánchez et al., 2012; 2014). These experiments revealed high photosynthetic activity when the PB was protected by anhydrobiosis and within the lichen thallus. However, additional studies on isolated and metabolically active PBs showed a significant impairment of photosynthetic activity (Meeßen et al., 2014b; Backhaus et al., 2015).

As part of primary cosmic radiation (Kraushaar et al., 1972), cosmic γ -ray bursts (Klebesadel et al., 1973), and solar flares (Ajello et al., 2014), ionizing γ -radiation is a crucial factor of environments beyond the magnetic shielding of Earth, such as space, Mars and other planetary body. However, the effect of γ -rays on lichens has rarely been tested. Long-time LEO-exposure in the EXPOSE-E facility reported ionizing radiation of c. 0.2 Gy/a that did not affect lichen viability (Brandt et al., 2015a,b). Therefore, we seized the opportunity to expose the isolated PB of *C. gyrosa* in the high-dose γ -ray irradiation campaign STARLIFE II. The PB is considered more radiosensitive than the mycobiont (Gannutz, 1972) constituting the more

crucial symbiont to investigate. The experiment quantified the PB's resistance to ionizing radiation, characterized radiation-inflicted damages and fathomed its limits towards this non-terrestrial stressor. Photosynthetic activity measurements, cultivation assays, viability staining techniques by CLSM, and RLS have been used to test the effect of γ -rays of up to 113 kGy. Comparison with parallel studies on the entire lichens *Circinaria gyrosa* and *Xanthoria elegans* (de la Torre et al, 2016; Brandt et al., 2016; *both this issue*) will further broaden our knowledge.

Material and Methods

***Circinaria gyrosa* Sohrabi (2012):** The lichen originates from northern hemispheric steppes and is adapted to harsh environmental conditions. Specimen were collected in 2010 in central Spain (Zaorejas, 40°45'40"N, 02°12'08"E) at 1260 m a.s.l. and stored frozen at -22 °C. Isolation and cultivation of the PB (*Trebouxia* sp.) were performed as previously described (Meeßen et al., 2014b).

Preparation and irradiation: 800 μ l of axenic photobiont cultures (c. 2.6×10^6 cells/ml) were completely dried in an evacuated desiccator, sample dry weights ranged between 3–5 mg. The samples were distributed to the γ -irradiation facility with a ^{60}Co source (γ -rays at 1.17 and 1.33 MeV, low LET of 0.3 keV/ μ m) as described in Raguse et al. (2016, *this issue*), retrieved after 12 weeks, and stored at -25 °C until further analysis.

Chlorophyll *a* fluorescence: The samples were re-activated for 24 h in 200 μ l *Trebouxia* Organic Medium (TOM), transferred to sterile filter sections (Millipore, Germany) and set on TOM-agar plates with 5–9 replicates each. Directly after transfer and after recovery periods of 1, 2, 24, 48, 120, 168, 240, and 336 h. The photosynthetic activity of PS II was measured as previously described (Meeßen et al., 2014b) and all results were normalized to the quantum yield of the lab control (QY, 0.654 ± 0.018 , $n=5$). All samples were photo-documented after 0, 2, 5, 15, 30, and 60 d.

Cultivation: The assay tested the PB's ability of growth and colony-formation. 20 μ l of re-activated algal suspension were diluted with TOM to an optical density of $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.1$ ($\approx 20,000$ cells/ml), 100 μ l of the suspension were sterilely plated on TOM agar ($n=4$), and cultivated for 60 d at 12 °C under a 12 h daytime PPFD of 15–25 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. All samples were photo-documented after 0, 1, 2, 5, 7, 14, 30 and 60 d. A second assay was performed in 15 ml liquid TOM. The samples were inoculated with 200 μ l of algal suspension (initial $\text{OD}_{600\text{nm}}$ normalized to 1, $n=3$) and cultivated under the above conditions. The $\text{OD}_{600\text{nm}}$ was measured after 0, 1, 2, 5, 7, and 14 d.

Metabolic activity: After re-activation, the assay was performed by live/dead staining with the fluorescent dye FUN-1[®] (Molecular Probes, USA) and analyzed in the CLSM to differentiate metabolically inactive and active cells (Millard et al., 1997) as previously described (Brandt et al., 2015a). A dead control (by thermal sterilization) validated the assay. For each

experimental condition 10–17 CLSM-micrographs with an average of 173 ± 33 PB cells were analyzed. Unpaired Student's t-test on significance with $H_0 > 0.05$ were performed with GraphPad InStat 3.

Raman Laser Spectroscopy: This method was used to track degradation of photosynthetic pigments. Vacuum-dried PB samples were resuspended in water, placed on microscopic slides, air-dried, and investigated by the confocal WITEC Alpha 300 RLS system. The excitation wavelength was 532 nm at 0.25 mW, the focus size was 1.5 μm , and spectral resolution was kept at 4–5 cm^{-1} within a range of 100–3800 cm^{-1} . Time series spectra (1 s, 50 x) were measured. Comparable measurement positions were chosen to avoid fluorescence-induced signal repletion. Two replicates were measured with 10–12 spectra each and analyzed by comparing appearance, abundance, intensities, shifts and ratios of all peaks.

Results

Analysis of chlorophyll *a* fluorescence: The photosynthetic activity of PS II, measured as maximum quantum yield (QY), was clearly impaired with increasing γ -ray doses (**Fig 1a**). The increase in all controls to a comparable QY of 0.75 is due to progressing metabolic re-activation after long-term desiccation. The γ -ray doses of 6 and 12 kGy insignificantly impaired the photosynthetic activity of the *C. gyrosa*-PB during the 14 d course of the experiment with initial QYs of 83 % and 75 % of the lab control and final QYs of 89 % and 81 %, respectively. The dose of 18 kGy evoked an initial QY of 58 % that decreased to 29 % after 14 d. The higher γ -ray doses of 24, 47, 72, and 113 kGy revealed initial QY values of 55, 22, 8, and 7 % of the lab control which decreased to 5 % in the 24 kGy-samples and to zero in all others. The photo-documentation revealed proceeding growth of the algal cells in all control samples that is characterized by spreading, densifying, and upwelling of the algal mat on the filters during the course of cultivation (**Fig 1b-d**). In contrast, none of the irradiated samples showed algal growth except the formation of one single algal colony in the 72 kGy-samples. All samples irradiated with ≥ 12 kGy revealed progressive chlorophyll bleaching that was observed the sooner the higher the doses of irradiation were (**Fig 1b-d**). The retention of chlorophyll pigmentation in the 6 and 12 kGy-samples corresponded to their retention of photosynthetic activity (**Fig 1a**).

Cultivation assays: The cultivation assay in liquid TOM (**Fig 2a**) revealed an increase of $\text{OD}_{600\text{nm}}$ by a factor of 4.3, 3.7, and 3.8 in the lab, DLR, and transport control, indicating cell proliferation in all control samples. The 6 kGy-samples irradiated with revealed a 2.3-fold increase in $\text{OD}_{600\text{nm}}$ and those irradiated with 12 kGy a 1.6-fold increase during the 14 d duration of the experiment. Samples irradiated with ≥ 24 kGy showed no significant increase of, demonstrating a lack of cell proliferation. Samples irradiated with 6 and 12 kGy showed an intermediate to minor increase only. In the much longer cultivation assay on TOM-agar (**Fig 2b-d**) the samples displayed intense photobiont growth in the controls but no formation of

algal colonies in any of the irradiated samples – except one single algal colony in samples irradiated with 18 kGy. Despite the OD_{600nm}-increase in liquid cultures of 6 and 12 kGy samples, the cultivation on TOM-agar demonstrate that 6 kGy of γ -rays effectively inhibit proliferation and colony-formation of the *C. gyrosa*-PB.

FUN-1[®]/CLSM-based analysis of metabolic activity: When compared to fresh and lab control, the results revealed a significant decrease of metabolic activity after irradiation with ≥ 12 kGy (**Fig. 3**). While metabolic activity at 6 kGy (75.8 ± 7.2 %) is comparable to the fresh control (78.4 ± 9.3 %), the activity rate is continuously decreasing to 31.8 ± 7.2 % at 113 kGy. Additionally, we quantified the number of degenerated PB cells that were characterized by shrinkage of the lumen or its partial/complete inward recession from the cell wall. Irradiation doses of ≥ 24 kGy revealed significantly higher values than the fresh and the lab control (**Fig. 3**). Nonetheless, both parameters revealed significant damages in the transport control. Since vacuum-induced desiccation is a major threat to space exposed lichen samples (Brandt et al., 2015a,b) and the type of damage is similar to those observed before, we conclude that this damage is due to the drying procedure. However, doses ≥ 47 kGy increase cell degeneration and doses ≥ 72 kGy decreased the metabolic activity significantly when compared to the transport control, demonstrating the damaging effect of the γ -ray irradiation itself.

Raman analysis of photosynthetic pigments: The spectra were characterized by the distinct β -carotene peak pattern of three main peaks at 1002, 1152, and 1518 cm^{-1} (**Fig 4a**), overlying a broad chlorophyll fluorescence pattern of with a bulge at c. 1150 cm^{-1} and progressively increasing fluorescence (FL) intensity beyond a minimum at c. 3250 cm^{-1} (**Fig 4a**). The Raman spectra revealed no significant effect of γ -rays on β -carotene in terms of peak appearance, peak intensity and peak shift. Nonetheless, several characteristics discerned the Raman spectra in four distinct classes (**Fig. 4a-d**): I: three clear main-peaks of β -carotene, clear side-peaks of β -carotene at 869, 1194, 1268 cm^{-1} (**Fig 4a**), $FL_{1150} \leq FL_{3250}$, good signal/noise-ratio; II: three clear main-peaks, $FL_{1150} > FL_{3250}$; III: at least two main-peaks detectable; IV: no peaks of β -carotene detectable, $FL_{1150} \gg FL_{3250}$. These classes represent states of signal quality, ranging from distinct β -carotene spectra and characteristic chlorophyll FL (class I, **Fig 4a**) to spectra that reveal unspecific fluorescence only (class IV, **Fig 4d**). In average, decreasing signal quality comes along with the increasing intensity of the FL bulge maximum at c. 1150 cm^{-1} and a shift of the FL minimum to higher wavenumbers, *i.e.* from a mean of 3047 in class I to 3534 cm^{-1} in class IV. The distribution of signal classes revealed decreasing occurrence of clear β -carotene signals (class I) as well as increasing occurrence of low quality and absent signals (classes III and IV) with increasing doses of ionizing radiation (**Fig. 4e**).

Discussion

Kovács & Keresztes (2002) classified the biological effects of γ -radiation into direct interaction with critical cell targets by ionization, dissociation and excitation and indirect interaction by forming free radicals that damage crucial cell components as nucleic acids, and proteins. Radiolysis of intracellular water is the most significant source of free radicals. These effects are supposed to cause the observed damages in the PB, but radiolytically induced damages should be reduced by the anhydrobiotic state of the samples during exposure.

Exposure studies of lichen to γ -rays demonstrated their detrimental effects on growth rate (Snyder & Platt, 1973), thallus integrity (Erbisch, 1974), nitrate reduction, membrane stability and respiration (Nifontova et al., 1995). Moreover, γ -rays reduced viability, growth and colony-formation in lichen PBs (Gannutz, 1972). These three aspects are confirmed by the present results. The former studies also revealed that anhydrobiotic lichens more than active ones, and mycobionts more than photobionts (Nifontova et al., 1995). The resistance of the PB is limiting lichen survival under ionizing conditions (Gannutz 1972). Astrobiological studies confirmed the important role of anhydrobiosis and the higher sensitivity of the PB, which represents the limiting partner of the lichen symbiosis under (simulated) space conditions (Brandt et al., 2015a; Meeßen et al., 2014b; 2015; Backhaus et al., 2015).

Irradiation with γ -rays affects photosynthesis by damaging chloroplast ultrastructure, pigment stability and pigment synthesis (Kovács & Keresztes, 2002). The photobiont of *Cladonia mitis* revealed no cellular damage below 100 Gy while 20-30 % of the photobiont cells were damaged at 10 kGy in terms of a 50 % reduction of photosynthetic rate and a 95 % decrease of carbon assimilation (Barstow & Erbisch, 1977). The present results support these findings: The Raman results point to a dose-dependent degradation of photosynthetic pigments (**Fig 4e**) while γ -ray doses > 12 kGy led to chlorophyll bleaching and impaired photosynthetic activity (**Fig 1a-c**). In accordance, the ADAPT experiment on EXPOSE-E revealed degradation of β -carotene in dependence of provided insolation (Cockell et al. 2011) and γ -irradiation up to 80 kGy degraded all types of photosynthetic pigments in cyanobacteria (Dartnell et al. 2011). Moreover, Gannutz (1972) determined a LD₅₀ of 100-470 Gy and a LD₉₀ of 470-970 Gy for seven wet-irradiated *Trebouxia*-PBs. This is much lower than the lowest dose tested in the present study where – consistently – the ability of proliferation and colony-formation is completely inhibited even at the lowest dose of 6 kGy (**Fig 2b-d**). However, with 6 and 12 kGy – and partially with 18 kGy – the photosynthetic activity of the *C. gyrosa*-PB is retained at least for 14 d (**Fig 1a**) Thus, the PB might be considered as 'viable but not cultivable' after irradiation with all doses but as dead with doses \geq 18 kGy.

The residual metabolic activity in the live/dead assay (**Fig 3**) even after the highest γ -ray dose may be explained by cells that did not yet induce the next cell division where lethal DNA damages may become manifest or just entered the process of programmed cell death (PCD). In *Chlorella saccharophila* – also a Trebouxiophyceae – PCD is accompanied by cell shrink-

age and membrane detachment from the cell wall (Zuppini et al., 2007). That was also observed in the present study, indicating severe cellular damages and supporting the results of the cultivation assay. In contrast, the remaining photosynthetic activity after irradiation with 6, 12, and 18 kGy is confirmed by photosynthetic activities measured in entire lichen thalli of *Circinaria gyrosa* and *Xanthoria elegans* under identical irradiation conditions (de la Torre et al., 2016; Brandt et al., 2016, *both this issue*). We conclude that different levels of the photobiont cell, such as metabolism, photosynthesis and growth, are affected by ionizing γ -radiation to different extend. These results may help to better understand the effects of current and future exposure experiments on lichen models, such as *Buellia frigida* and *Circinaria gyrosa* in BIOMEX on EXPOSE-R2.

Acknowledgements

The authors thank Ralf Moeller (Department of Radiation Biology, DLR in Cologne, Germany) and Ryuichi Okayasu (HIMAC team, NIRS in Chiba, Japan) for the opportunity to take part in STARLIFE. We also thank the DLR Project Management Agency for funding the work of Joachim Meeßen (50BW1153). Our thanks are also due to Sieglinde Ott for valuable discussions and to the anonymous reviewers for their comments and suggestions.

References

- Ajello, M., Albert, A., Allafort, A., Baldini, L., Barbiellini, G., Bastieri, D., et al. (2014) Impulsive and long duration high-energy gamma-ray emission from the very bright 2012 March 7 solar flares. *Astrophys J* **789**(1) doi: doi.org/10.1088/0004-637X/789/1/20
- Backhaus, T., de la Torre, R., Lyhme, K., de Vera, J.-P., Meeßen, J. (2015) Desiccation and low temperature attenuate the effect of UVC_{254nm} in the photobiont of the astrobiologically relevant lichens *Circinaria gyrosa* and *Buellia frigida*. *Int J Astrobiol* **14**(3):479-488.
- Barstow, J.M., Erbsch, F.H. (1977) Effects of acute gamma radiation and winter temperature-light conditions on photosynthesis of *Cladonia mitis*. *Bryologist* **80**(2):83-87.
- Brandt, A., de Vera, J.-P., Onofri, S., Ott, S. (2015a) Viability of the lichen *Xanthoria elegans* and its symbionts after 18 months of space exposure and simulated Mars conditions on the ISS. *Int J Astrobiol* **14**(3):411-425.
- Brandt, A., Posthoff, E., de Vera, J.-P., Onofri, S., Ott, S. (2015). Characterization of viability, growth and ultrastructural effects of the *Xanthoria elegans* photobiont after 1.5 years of space exposure on the International Space Station. *Orig Life Evol Biosph*. doi: 10.1007/211084-015-9470-1.
- Brandt, A., Meeßen, J., Jänicke, R., Ott, S., (2016) STARLIFE VI: Simulated deep space radiation: Impact of four different types of high-dose ionizing radiation on the lichen *Xanthoria elegans*. *Astrobiology (this issue)*.
- Cockell, C.S., Rettberg, P., Rabbow, E., Olsson-Francis, K. (2011) Exposure of phototrophs to 548 days in low Earth Orbit: microbial selection pressures in outer space and on early Earth. *ISME Journal* **5**:1671-1682.
- Dartnell, L.R., Storrie-Lombardie, M.C., Mullineaux, C.W., Ruban, A.V., Wright, G., Griffiths, A.D., et al. (2011) Degradation of cyanobacterial biosignatures by ionizing radiation. *Astrobiology* **11**(10):997-1016.
- de la Torre Noetzel, R., Sancho, L.G., Pintado, A., Rettberg, P., Rabbow, E., Panitz, C., et al. (2007) BIOPAN experiment LICHENS on the Foton M2 mission: Preflight verification tests of the *Rhizocarpon geographicum*-granite ecosystem. *Adv Space Res* **40**(11):1665-1671.

- de la Torre, R., Sancho, L.G., Horneck, G., de los Ríos, A., Wierzechos, J., Olsson-Francis, K., et al. (2010) Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions – Results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus* **208**(2):735-748.
- de la Torre, R., Miller, A.Z., Cubero, B., Martín-Cerezo M.L., Raguse, M., Meeßen, J. (2016) STARLIFE VII: The effect of high-dose ionizing radiation on the astrobiological model lichen *Circinaria gyrosa*. *Astrobiology (this issue)*.
- Erbisch, F.H. (1974) Effects of acute and chronic gamma radiation on *Cladonia sylvatica* and *Parmelia sulcata*. Report for the U.S. Atomic Energy Commission, Contract No. AT(11-1)-2085:1-25.
- Gannutz, T.P. (1972) Effects of gamma radiation on lichens—i. acute gamma radiation on lichen algae and fungi. *Radiation Bot* **12**(5):331-338.
- Kovács, E., Keresztes, Á. (2002) Effect of gamma and UV-B/C radiation on plants cells. *Micron* **33**:199-210.
- Klebesadel, R.W., Strong, I.B., & Olson, R.A. (1973): Observations of Gamma-Ray Bursts of Cosmic Origin, *Astrophys J* **182**:L85-L88.
- Kranner, I., Beckett, R., Hochman, A., Nash, T.H. (2008) Desiccation-tolerance in lichens: a review. *Bryologist* **111**(4):576-593.
- Kraushaar, W.L., Clark, G.W., Garmire, G.P., Borken, R., Higbie, P., Leong, V., et al. (1972). High-energy cosmic gamma-ray observations from the OSO-3 satellite. *Astrophys J* **177**:341-363.
- Meeßen, J., Backhaus, T., Sadowsky, A., Mrkalj, M., Sánchez, F.J., de la Torre, R., et al. (2014b) Effects of UVC_{254nm} on the photosynthetic activity of photobionts from the astrobiologically relevant lichens *Buellia frigida* and *Circinaria gyrosa*. *Int J Astrobiol* **13**(4):340-352.
- Meeßen, J., Sánchez, F.J., Brandt, A., Balzer, E.M., de la Torre, R., Sancho, L.G., et al. (2013) Extremotolerance and resistance of lichens: Comparative studies on five species used in astrobiological research. I. Morphological and anatomical characteristics. *Orig Life Evol Biosph* **43**(3):283-303.
- Meeßen, J., Sánchez, F.J., Sadowsky, A., de Vera, J.-P., de la Torre, R., Ott, S. (2014a) Extremotolerance and resistance of lichens: Comparative studies on five lichen species used in astrobiological research II. Secondary lichen compounds. *Orig Life Evol Biosph* **43**(6):501-526.
- Meeßen, J., Wuthenow, P., Schille, P., Rabbow, E., de Vera, J.-P., Ott, S. (2015) Resistance of the lichen *Buellia frigida* to simulated space conditions during the pre-flight tests for BIOMEX – viability assay and morphological stability. *Astrobiology* **15**(8): doi: 10.1089/ast-2015.1281
- Millard, P.J., Roth, B.L., Thi, H.P., Yue, S.T., Haugland, R.P. (1997) Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Appl Environ Microbiol* **63**(7):2897-2905.
- Nifontova, M.G., Ravinskaya, A.P., Shapiro, I. A. (1995) Effect of acute gamma radiation on some physiological features of lichens. *Lichenologist* **27**(3):215-224.
- Raggio, J., Pintado, A., Ascaso, C., de la Torre, R., de los Ríos, A., Wierzechos, J., et al. (2011) Whole Lichen Thalli Survive Exposure to Space Conditions: Results of Lithopanspermia Experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* **11**(4):281-292.
- Raguse, M., Berger, T., Hellweg, C.E., Fujimori, A., Okayasu, R., the STARLIFE Team, Moeller, R. (2016) STARLIFE I: Studying the effects of galactic cosmic radiation on astrobiological model systems: introducing the STARLIFE intercomparison initiative. *Astrobiology (this issue)*.
- Sánchez, F.J., Mateo-Martí, E., Raggio, J., Meeßen, J., Martínez-Frías, J., Sancho, L.G., et al. (2012). The resistance of the lichen *Circinaria gyrosa* (nom. provis.) towards simulated Mars conditions – a model test for the survival capacity of a eukaryotic extremophile. *Planet Space Sci* **72**:102-110.
- Sánchez, F.J., Meeßen, J., Ruiz, M., Sancho, L.G., Ott, S., Vílchez, C., et al. (2014). UV-C tolerance of symbiotic *Trebouxia* sp. in the space-tested lichen species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: role of the hydration state and cortex/screening substances. *Int J Astrobiol* **13**(1):1-18.
- Sancho L.G., de la Torre, R., Pintado, A. 2008, Lichens, new and promising material from experiments in Astrobiology. *Fungal Biol Rev* **22**:103-109.
- Snyder, J.M., Platt, R.B. (1973) The effects of chronic gamma irradiation on the growth of a crustose lichen, *Trapelia ornata* (Sommerfelt) Hertel. *Radiation Bot* **13**(5):269-271.
- Zuppini, A., Andreoli, C., Baldan, B. (2007) Heat stress: an inducer of programmed cell death in *Chlorella saccharophila*. *Plant Cell Physiol* **48**(7):1000-1009.

Figures

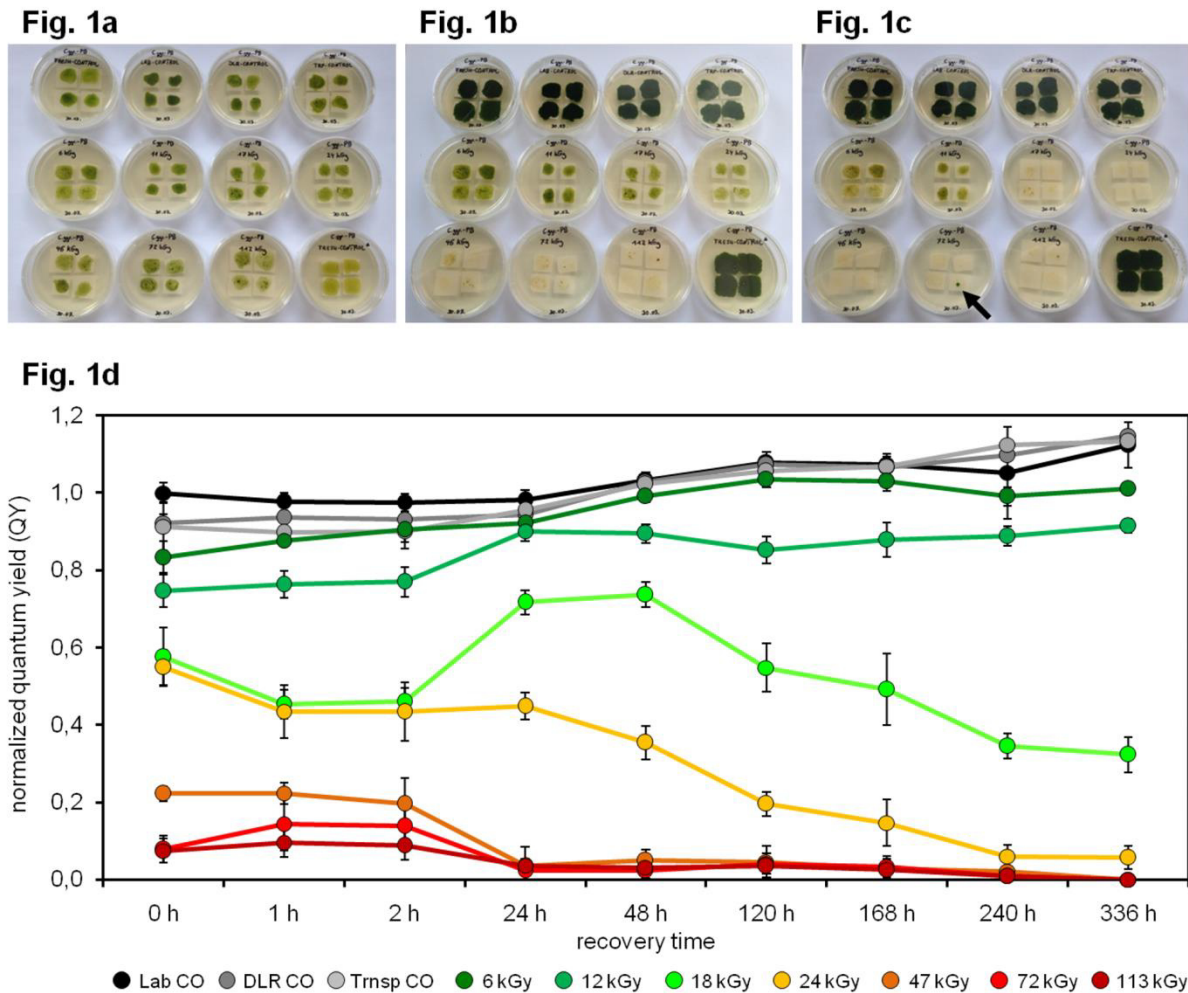


Fig. 1: Photosynthetic activity, growth and chlorophyll bleaching of the *C. gyrosa*-PB after γ -irradiation. Samples on filters after 1, 30, and 60 d of cultivation (**Fig. 1a-c**). From left to right: fresh, lab, DLR and transport controls (upper row), samples irradiated with 6, 12, 18, and 24 kGy (middle row), and with 47, 72, and 113 kGy (lower row, plus additional fresh control). Unaffected growth in all control samples. Retention of pigmentation in the 6 and 12 kGy-samples but progressive chlorophyll bleaching with all higher doses. One single colony is formed in the 72 kGy-samples (**Fig. 1c, arrow**). **Fig. 1d** shows the photosynthetic activity of PS II after recovery times up to 336 h (QY, mean \pm SD, n = 5–9). Initial QY is dose-dependently affected. 6 and 12 kGy-samples retain QY close to the control levels, samples irradiated with ≥ 24 kGy show ceasing QY.

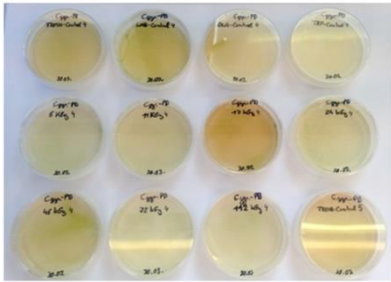
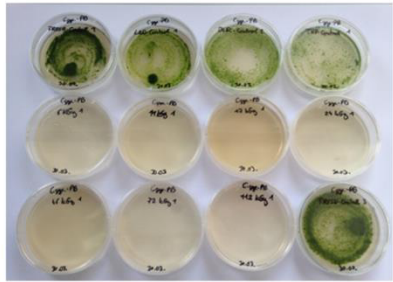
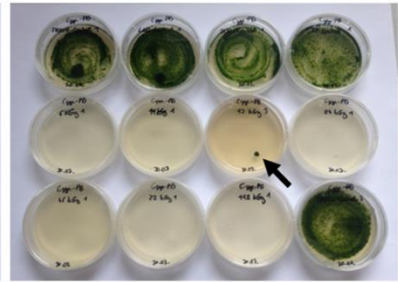
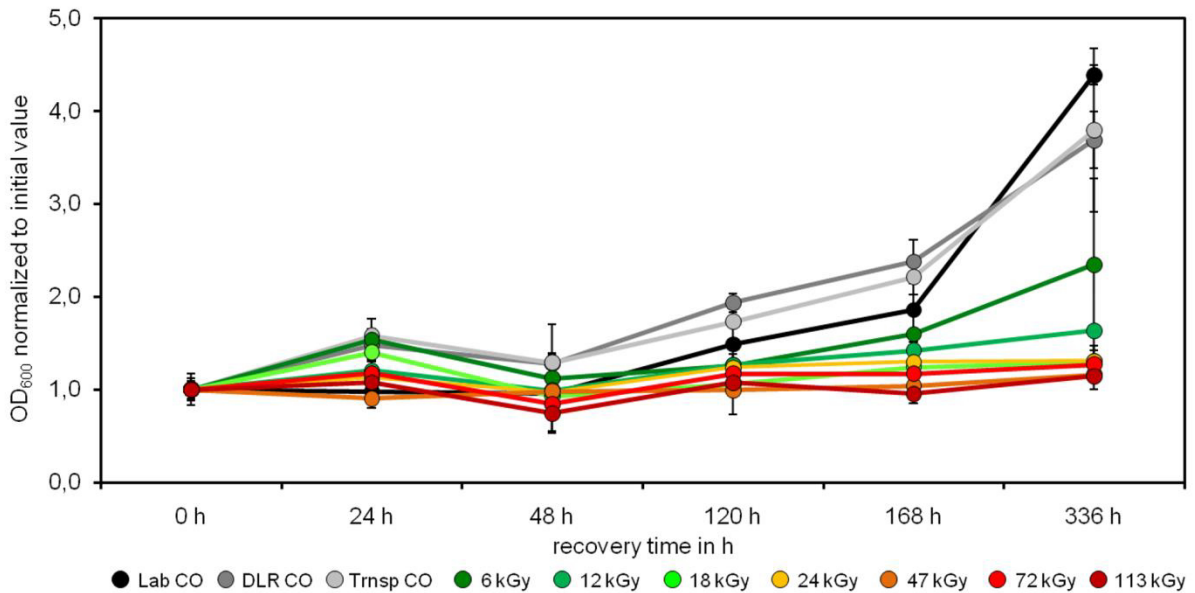
Fig. 2a**Fig. 2b****Fig. 2c****Fig. 2d**

Fig. 2: Growth and colony-formation of the *C. gyrosa*-PB after γ -irradiation. Aliquots cultivated on TOM-agar for 1, 30, and 60 d (**Fig. 2a-c**). From left to right: fresh, lab, DLR and transport controls (upper row), samples irradiated with 6, 12, 18, and 24 kGy (middle row), and with 47, 72, and 113 kGy (lower row, plus additional fresh control). Progressive growth in all controls. Neither growth nor colony-formation in the irradiated samples, except one colony in the 18 kGy-sample (**Fig. 2c**, arrow). **Fig. 2d** shows growth in liquid TOM-medium tested for 336 h by OD_{600nm} measurements. Proliferation in the control samples is clear, low in 6 and 12 kGy-samples and absent in samples irradiated with >12 kGy (mean \pm SD, n = 3).

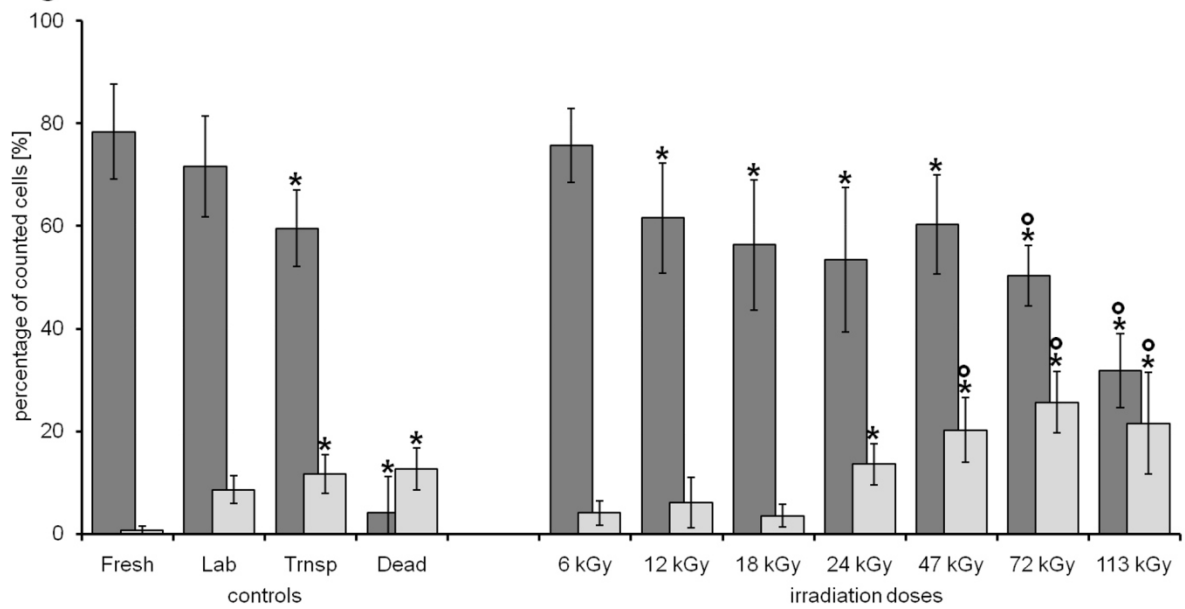
Fig. 3

Fig. 3: Percentage of metabolically active (dark grey) and degenerated cells (light grey) of the *C. gyrosa*-PB after γ -irradiation by FUN-1[®] / CLSM analysis. From left to right: fresh, lab, transport, and dead control, followed by irradiation doses of 6–113 kGy. Results given as percentage of metabolically active/degenerated cells (mean \pm SD with n = 10–17 analyzed CLSM-micrographs). Student's t-test with $H_0 > 0.05$: * = significant differences to fresh and lab controls, o = significant differences to transport control.

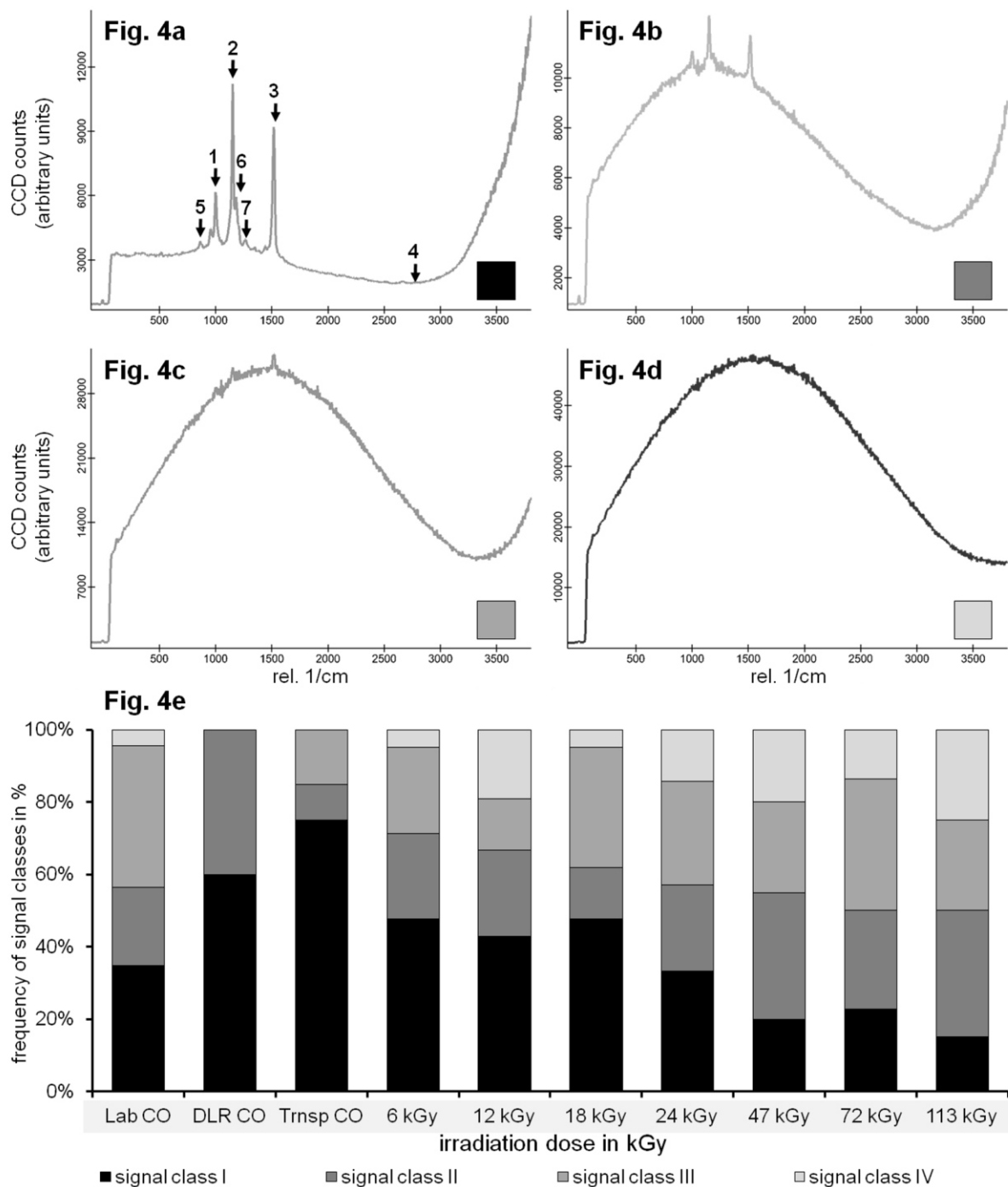


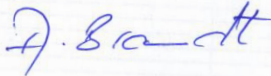
Fig. 4: RLS spectra of the *C. gyrosa*-PB after γ -irradiation showing 4 signal classes (**Fig. 4a-d**) and their incidence among the experimental sets (**Fig. 4e**). The signals revealed β -carotene peaks at 1002, 1152, 1518 cm⁻¹ (**1-3**), fluorescence minimum at c. 3250 cm⁻¹ (**4**), and side-peaks of β -carotene at 869, 1194, 1268 cm⁻¹ (**5-7**). Increasing γ -ray doses evoked a trend of decreasing frequency in classes I + II and increasing frequency in classes II + IV (n=20–24 for each experimental set, **Fig. 4e**).

Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 24.04.2016



(Annette Brandt)

Danksagung

Gerne danke ich Allen, die mich während dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben! Flechten haben den Weltraum erobert - und ich durfte daran teilhaben!

Frau Prof. Dr. Sieglinde Ott danke ich, weil Sie mir die Faszination von Flechten nahe gebracht hat und mich während dieser Arbeit als Betreuerin immer unterstützt und motiviert hat. Ihr kompetenter Rat, der stets auch Raum für bereichernde Diskussionen ließ, wird mir sicher oft fehlen. Frau Ott hat für mich die seltene Fähigkeit ihre Begeisterung weiterzugeben.

Dank gebührt auch meinem zweiten Betreuer Prof. Dr. Bill Martin für die bereitwillige, unkomplizierte Übernahme dieser Aufgabe.

Für die professionelle wissenschaftliche Unterstützung muss ich mich bei zahlreichen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Ott, dem DLR in Köln und in Berlin sowie an der HHU bedanken.

Ohne die tatkräftige, einfallsreiche Unterstützung von Dr. Joachim Meeßen wäre ich oft verzweifelt. Danke auch an die Kollegen, die dieses Projekt vor und mit mir bearbeitet haben und an alle Co-Autoren, insbesondere an Dr. de Vera, Dr. Elke Rabbow, Dr. Ralf Moeller, Prof. Dr. Silvano Onofri, Dr. de la Torre, Prof. Dr. Hausmann und Prof. Dr. Jänicke. Ein Extra-Dank geht an Frau Marion Nissen und Prof. Dr. Greven.

Danke an alle *reviewer* meiner eingereichten *paper* – vor allem an die, die viel kritisiert haben – nur so wird man besser.

Der International Symbiosis Society danke ich für den *Travel Grant* nach Lissabon.

Meinen AG-Kollegen, an die ich in der Tat lieber als Freunde denke, danke ich für die vielen interessanten Diskussionen, ihre Hilfe und Gesellschaft. Es hat viel Freude gemacht ein Teil dieser Arbeitsgruppe zu sein und in einem so spannenden Forschungsgebiet zu arbeiten. Allerdings hatte es auch einen Nachteil: Eine öde Arbeit mit spröden Kollegen hätte wahrscheinlich bewirkt, dass ich nach 18 Monaten fertig gewesen wäre.

Den benachbarten Arbeitsgruppen und Instituten danke ich für die vielen Dinge, die ich im Laufe der Zeit dort leihen oder schnorren durfte (Präparationschemie, diverse Chemikalien, Gaskartuschen, das Spektrometer, den freundlichen Heizschüttler, den Heidolph, Kuchen, BacLight, das Photo-Bino, Kekse, Kuchen und Schokolade).

Meinem Mann Oliver bin ich besonders dankbar. Er hat meine dynamisch wechselnden Tagesabläufe und Launen nicht nur ertragen, sondern miterlebt und insgesamt auch eine ziemliche Betreuungsleistung vollbracht. Das war bestimmt nicht immer erfreulich. Danke.