

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Biología Vegetal I  
(Botánica y Fisiología Vegetal)



## TESIS DOCTORAL

**Estudio de los mecanismos de resistencia de los líquenes a ambientes extremos relevantes para investigación espacial y cuerpos planetarios**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

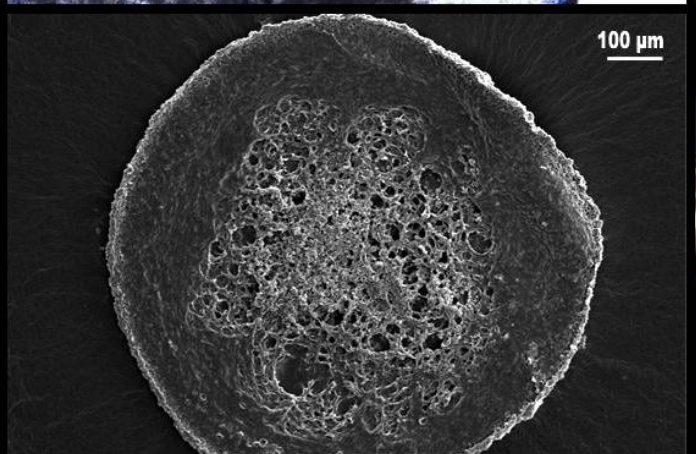
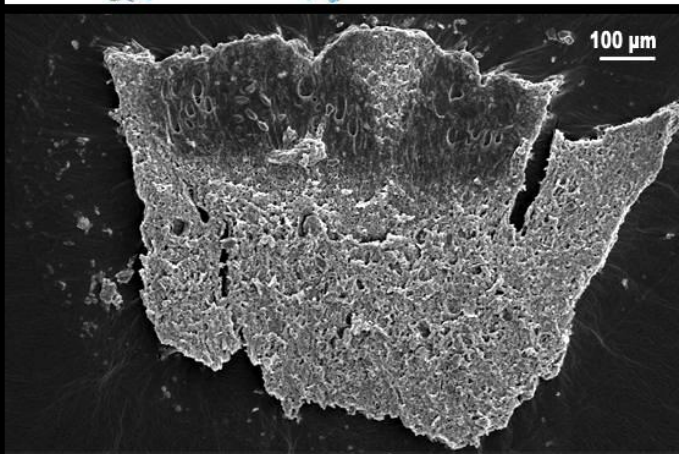
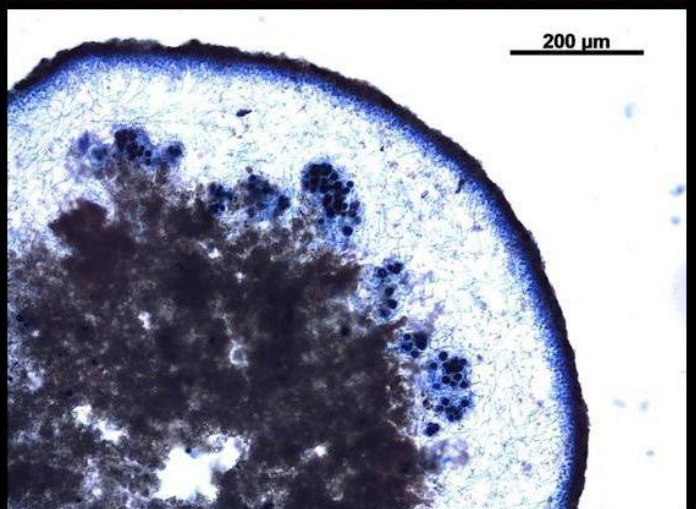
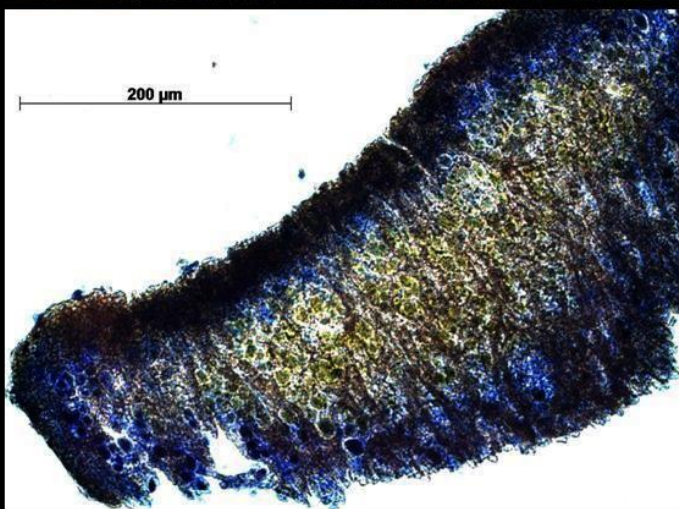
**Francisco Javier Sánchez Íñigo**

Directores

Rosa de la Torre Noetzel  
Lepoldo G<sup>a</sup> Sancho

**Madrid, 2014**

# ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA DE LOS LÍQUENES A AMBIENTES EXTREMOS RELEVANTES PARA INVESTIGACIÓN ESPACIAL Y CUERPOS PLANETARIOS



FRANCISCO JAVIER SÁNCHEZ ÍÑIGO



- TESIS DOCTORAL -





# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Vegetal I



TESIS DOCTORAL

## ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA DE LOS LÍQUENES A AMBIENTES EXTREMOS RELEVANTES PARA INVESTIGACIÓN ESPACIAL Y CUERPOS PLANETARIOS

---

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por el licenciado  
**Fco. Javier Sánchez Íñigo**

Tesis dirigida por:  
Dra. Rosa de la Torre Noetzel (INTA) y Dr. Leopoldo G.<sup>a</sup> Sancho (UCM)

Noviembre de 2013





**Doña Rosa de la Torre Noetzel**, Doctora en Ciencias Biológicas y Científica Superior del Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial y **Don Leopoldo García Sancho**, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Botánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid informan de que:

La presente tesis doctoral titulada “Estudio de los mecanismos de resistencia de los líquenes a ambientes extremos relevantes para investigación espacial y cuerpos planetarios” ha sido realizada bajo su dirección en el Área de Investigación e Instrumentación Atmosférica del Departamento de Observación de la Tierra, Teledetección y Atmósfera del INTA por el licenciado en Biología Fco. Javier Sánchez Íñigo. Al estar concluida y reunir todas las condiciones exigidas a los trabajos de tesis doctoral, autorizan su presentación para que sea juzgada por el tribunal correspondiente y el licenciado opte así al grado de Doctor. Y para que así conste firman el presente informe.

Madrid, a 20 de Noviembre de 2013

Fdo. Dra. Rosa de la Torre Noetzel

Área de Inv. e Inst. Atmosférica  
Dpto. Observación de la Tierra  
INTA

Fdo. Dr. Leopoldo G<sup>a</sup>. Sancho

Dpto. Biología Vegetal II  
Facultad de Farmacia  
UCM



*Dedicado a Tomás Sánchez y a Felipe Íñigo,  
dos modelos de honradez y esfuerzo que me acompañarán siempre.*



-¡Mochuelo!

Se arrojó de la cama, exaltado, y se asomó a la carretera. Allí abajo, sobre el asfalto, con una cantarilla vacía en la mano, estaba la Uca-uca. Le brillaban los ojos de una manera extraña.

-Mochuelo, ¿sabes? Voy a La Cullera a por la leche. No te podré decir adiós en la estación.

Daniel, el Mochuelo, al escuchar la voz grave y dulce de la niña, notó que algo muy íntimo se le desgarraba dentro del pecho. La niña hacía pendular la cacharra de la leche sin cesar de mirarle. Sus trenzas brillaban al sol.

-Adiós, Uca-uca -dijo el Mochuelo. Y su voz tenía unos trémolos inusitados.

-Mochuelo, ¿te acordarás de mí?

Daniel apoyó los codos en el alféizar y se sujetó la cabeza con las manos. Le daba mucha vergüenza decir aquello, pero era ésta su última oportunidad.

-Uca-uca... -dijo, al fin-. No dejes a la Guindilla que te quite las pecas, ¿me oyes? ¡No quiero que te las quite!

Y se retiró de la ventana violentamente, porque sabía que iba a llorar y no quería que la Uca-uca le viese. Y cuando empezó a vestirse le invadió una sensación muy vívida y clara de que tomaba un camino distinto del que el Señor le había marcado. Y lloró, al fin.

**MIGUEL DELIBES. *El Camino*, (1950).**



# Agradecimientos

El paso del tiempo y la rutina diaria hacen que, sin querer, olvidemos muchos de los encuentros que a menudo tienen lugar en nuestras vidas y que influyen en nuestro día a día. Ahora es mi deber echar la vista atrás para tratar de recordar, y sobre todo agradecer, a todo aquél que de una forma u otra ha contribuido al desarrollo de la presente tesis doctoral.

En primer lugar me gustaría dar las gracias al INTA por financiar la formación de nuevos investigadores y por haberme permitido desarrollar un completo programa formativo, incluyendo múltiples salidas al campo, congresos científicos y cursos de distinta índole. Gracias a María Jesús Gutiérrez de la Cámara Ara, directora del *Departamento de Observación de la Tierra, Teledetección y Atmósfera* y a Manuel Gil Ojeda, jefe del *Área de Investigación e Instrumentación Atmosférica* por promover esta beca y haberme apoyado durante los cuatro años en que formé parte del personal del Departamento en las instalaciones de Torrejón de Ardoz. También les tengo mucho que agradecer a David Núñez Clemente y a Alba Díaz Martín, que empezaron siendo meros compañeros de despacho pero con los que tras compartir tantas horas he forjado una gran amistad. Las a veces largas jornadas en el despacho D-2-003 del edificio C-04 se hicieron mucho más amenas con vosotros al lado. A ti, David, te agradezco especialmente el haberme introducido a la edición de textos con L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X, que se materializa en este documento. A Maribel, Ana y Agustín: muchas gracias por haber estado “encima mío” y haberos preocupado por mí durante todo este tiempo. A todos y cada uno de los compañeros que tuve tanto en el Área como en el Departamento desde Diciembre de 2008 hasta finales de 2012, gracias por haberme hecho sentir uno más.

También quisiera acordarme de Mer, Clara, Ana, Pepe y Chema del grupo de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), y agradecerles su cariño y cercanía, habiéndome tratado siempre como a uno más.

Es ist unverzichtbar für mich, meinen herzlichen Dank an die Gruppe von Professor Sieglinde Ott (Institut für Botanik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) zu richten. Besonders an Joachim Meeßen, denn mit seinem Enthusiasmus, seinem Interesse und seinem hilfsbereiten Engagement während meines Aufenthaltes hat er die Zeit dort maßgeblich gestaltet. Auch an Annette Brandt, Andres Sadowsky, Eva Posthoff und Eva-Maria Balzer sowie schließlich natürlich an Sieglinde Ott. Sie hat den Kurzaufenthalt ermöglicht und beaufsichtigt, der sowohl sehr lehrreich als auch bedeutsam für meine Doktorarbeit war.

A M<sup>a</sup>Carmen Ruíz Domínguez y Carlos Vílchez del grupo de Biotecnología de Algas de la Universidad de Huelva (UHU), por su esfuerzo y desinteresada implicación durante la realización del aislamiento y cuantificación de pigmentos presente en la publicación II y por sus palabras de aliento.

A Eva Mateo-Martí y a Jesús Martínez-Frías del CAB (INTA-CSIC), por sus ánimos, consejos y, por qué no, también por los buenos ratos y amenas comidas que compartimos durante cuatro años.

A Gilberto Herrero del departamento de Estratigrafía (Facultad de Ciencias Geológicas, UCM) por su disponibilidad, cercanía y buen humor a la hora de permitirme realizar la edición de muestras de *R. geographicum* en la máquina cortadora de su laboratorio.

Ich bin völlig dankbar mit Gerda Horneck (DLR-Cologne) für Ihre selbstlose Interesse am die Fortschritte von meiner Doktorarbeit.

Ich danke auch Jean Pierre de Vera (DLR-Berlin) für fügen Sie mich in dem BIOMEX Experiment und für finanzieren meine Teilnahme an dem Tagung in Viterbo (Italien).

A EANA (Asociación Europea de Redes de Astrobiología), por haberme becado sucesivamente para participar en los congresos anuales celebrados entre 2009 y 2012, en lo que fueron mis primeros congresos científicos.

A la ESA (Agencia Espacial Europea), por becarme junto a otros estudiantes europeos para participar en la asamblea científica COSPAR n<sup>o</sup>38 (Bremen, 2010) donde realicé más asustado que otra cosa mi primera presentación oral; así como para participar en el “ISS Symposium” (Berlín, 2012).

A Mariví, Fátima, Gloria, Lucía y Jose, personal de la biblioteca de Ibercaja en Guadalajara en la que tantas horas he pasado trabajando en esta tesis, sobre todo en su última fase.

A mis amigos en general. Por suerte, sois un montón y no os puedo citar a todos. Habéis contribuido enormemente a que mantuviese (casi intacta) la cordura durante todo este tiempo.

Llegados a este punto, es de justicia agradecer efusivamente a la Dra. Rosa de la Torre Noetzel y al Dr. Leopoldo G<sup>a</sup>. Sancho su interés, dedicación y profesionalidad a la hora de tutelar y dirigir el trabajo que ha conducido, no sin grandes esfuerzos por parte de todos, a la presentación en el día de hoy de la presente tesis doctoral.

Y por último, de forma especialmente intensa, querría expresar lo agradecido que estoy a mi familia. A Jose Luis y María del Carmen, mis padres, por haberme apoyado incodicionalmente; no ya sólo durante estos últimos años, sino desde que comencé a andar y a molestar por casa. Gracias a mi hermana Cristina, por saber estar ahí. A mi tía Mercedes y tío Antonio, abuelas Emilia y Victoria y primos simplemente por ser como sois. Espero que tengáis presente que sin vuestro apoyo, ésto no hubiese sido posible.

A todos y cada uno de vosotros, ¡MUCHAS GRACIAS!



Guadalajara, a 20 de Noviembre de 2013.

# Prefacio

El presente documento que lleva por título “*Estudio de los mecanismos de resistencia de los líquenes a ambientes extremos relevantes para investigación espacial y cuerpos planetarios*” compone una tesis doctoral en formato “compendio de publicaciones” y resume un proyecto original de investigación desarrollado durante un período aproximado de cuatro años.

Se presenta para su aceptación por parte de la Comisión de Doctorado de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y su posterior evaluación por parte del tribunal asignado por el departamento que se considere oportuno en la citada comisión. El objetivo final es, en caso de que el tribunal así lo considere, la obtención del título de Doctor en Ciencias por parte del licenciado Fco. Javier Sánchez Íñigo.

El marco legal vigente actualmente en la UCM en lo que respecta a los estudios de doctorado está definido por la regulación del Real Decreto 99/2011 de 28 de Enero de 2011 (BOE 10/02/2011) y más en concreto por la aplicación del mismo del BOUC nº14 publicado el 21 de Diciembre de 2012 y en el que se encuentra el *Acuerdo del Consejo de Gobierno de fecha 6 de noviembre de 2012 por el que se aprueba la Normativa de desarrollo del Real Decreto 99/2011 que regula los estudios de Doctorado en la UCM*.

Dado que se trata de una normativa de reciente aplicación y la elaboración de una tesis doctoral supone un proyecto de investigación a largo plazo poco susceptible a cambios de última hora, en la *Disposición adicional primera* de la citada normativa de desarrollo del Real Decreto 99/2011 se establece que:

## **Disposición adicional primera. Doctorandos conforme a anteriores ordenaciones**

**A los doctorandos que en la fecha de entrada en vigor del RD 99/2011 hubiesen iniciado estudios de doctorado conforme a anteriores ordenaciones, les será de aplicación las disposiciones reguladoras del doctorado y de la expedición del título de Doctor por las que hubieren iniciado dichos estudios. Los alumnos que hubieran iniciado sus estudios de doctorado en el curso académico 2011-2012 o en el 2012-2013 dispondrán hasta el 30 de septiembre de 2017 para la defensa de la tesis. En todo caso, se les aplicará el régimen relativo a tribunal, defensa y evaluación de la tesis doctoral previsto por el Real Decreto 99/2011 desde el 11 de Febrero de 2012.**

Es por ello que excepto en lo relativo a los artículos 11 (Tribunal), 12 (Defensa) y 13 (Evaluación) de la normativa de desarrollo del Real Decreto 99/2011 de la UCM, el marco legal de la tesis doctoral será aquél de aplicación en el momento de matricularla.

Para el caso concreto de esta tesis doctoral el marco legislativo es el contenido en el BOUC nº 14, publicado en este caso el 20 de Noviembre de 2008 y en el que se encuentra la *Normativa de Desarrollo del Régimen Relativo a Elaboración, Tribunal, Defensa y Evaluación de la Tesis Doctoral del Real Decreto 1393/2007 por el que se establece la ordenación de las enseñanzas universitarias oficiales de la Universidad Complutense de Madrid* y que supone la aplicación normativa del Real Decreto 1393/2007 de 29 de Octubre (BOE 30 de Octubre de 2007).

Esta tesis se ha realizado como compendio de publicaciones. A este respecto se recogen en el punto 4.4 de la normativa de desarrollo de la UCM del Real Decreto 1393/2007 unas consideraciones a las que habrá que atenerse:

## **4.4. Se podrán presentar tesis doctorales en formato publicaciones entendiéndose-**

se como tal las tesis constituidas básicamente por publicaciones editadas o aceptadas para su publicación. Estas publicaciones serán en revistas indexadas y previa autorización por escrito de los coautores de las publicaciones si los hubiere. Tales publicaciones han de estar relacionadas entre sí y con el tema reflejado en el título de la tesis. En todo caso, en este formato deberá incluirse en español una introducción que incluya una revisión del estado actual del tema, los objetivos y/o hipótesis, una discusión integradora y las conclusiones.

De acuerdo a la normativa reguladora, en la presente tesis doctoral en formato publicaciones el doctorando se encuentra como primer firmante de dos de los artículos incluidos y como coautor de otros dos del total de cuatro que componen el núcleo de la tesis.

Finalmente, para la redacción de la presente tesis doctoral se han incluido los capítulos que el solicitante, una vez entendida la normativa de la UCM que regula los estudios de doctorado, ha considerado adecuados para hacer una memoria lo más completa posible, habiéndose seguido siempre las recomendaciones amablemente ofrecidas por los codirectores de la tesis: Dra. Rosa de la Torre Noetzel (INTA) y Dr. Leopoldo G<sup>a</sup> Sancho (UCM).

# Índice general

Agradecimientos	IX
Prefacio	XI
<b>I Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción general</b>	<b>3</b>
1.1. Estructura . . . . .	3
1.2. Tema de investigación . . . . .	4
1.2.1. Astrobiología . . . . .	4
1.2.2. Organismos extremófilos y extremotolerantes . . . . .	5
1.2.3. Líquenes . . . . .	5
1.2.4. Líquenes y astrobiología . . . . .	7
1.2.5. Publicaciones . . . . .	8
1.3. Motivación . . . . .	8
<b>II Revisión de conocimientos</b>	<b>11</b>
<b>2. Estado actual de la investigación</b>	<b>13</b>
2.1. Experimentos de simulación espacial . . . . .	13
2.2. Experimentos espaciales y tests de transferencia interplanetaria . . . . .	15
2.2.1. Experimento LICHENS II . . . . .	17
2.2.2. Experimento LITHOPANSPERMIA . . . . .	18
2.2.3. Experimento STONE . . . . .	19
2.2.4. Experimento LIFE . . . . .	20
2.2.5. Experimento BIOMEX . . . . .	21
2.3. Experimentos de impacto a hipervelocidad y de simulación planetaria . . . . .	22
2.4. Mecanismos de resistencia propuestos . . . . .	25
<b>3. Objetivos a corto, medio y largo plazo identificados a partir de los antecedentes consultados</b>	<b>27</b>
<b>III Investigación realizada</b>	<b>29</b>
<b>4. Hipótesis y objetivos</b>	<b>31</b>
4.1. Hipótesis de trabajo . . . . .	31
4.1.1. Hipótesis inicial publicación I . . . . .	31
4.1.2. Hipótesis inicial publicación II . . . . .	31
4.1.3. Hipótesis inicial publicación III . . . . .	32
4.1.4. Hipótesis inicial publicación IV . . . . .	32
4.2. Objetivos . . . . .	32
4.2.1. Objetivos Publicación I . . . . .	32

4.2.2. Objetivos Publicación II . . . . .	32
4.2.3. Objetivos Publicación III . . . . .	33
4.2.4. Objetivos Publicación IV . . . . .	33
<b>5. Metodología</b>	<b>35</b>
5.1. Material biológico . . . . .	35
5.1.1. <i>Circinaria gyrosa</i> . . . . .	35
5.1.1.1. Caracterización específica . . . . .	35
5.1.1.2. Caracterización fisiológica, morfológica y anatómica . . . . .	35
5.1.1.3. Caracterización geográfica . . . . .	36
5.1.2. <i>Rhizocarpon geographicum</i> . . . . .	37
5.1.2.1. Caracterización específica . . . . .	38
5.1.2.2. Caracterización fisiológica, morfológica y anatómica . . . . .	38
5.1.2.3. Caracterización geográfica . . . . .	38
5.2. Tratamientos aplicados . . . . .	39
5.2.1. Publicación I: Simulaciones marcianas . . . . .	39
5.2.2. Publicación II: Irradiaciones UV-C bajo distintas condiciones experimentales . . . . .	40
5.2.3. Publicación III: Experimento LIFE . . . . .	41
5.3. Pruebas analíticas de viabilidad . . . . .	42
5.3.1. Análisis de rendimiento fotosintético . . . . .	42
5.3.2. Análisis de intercambio gaseoso . . . . .	44
5.3.3. Análisis de pigmentos por HPLC . . . . .	45
<b>IV Copia de las publicaciones</b>	<b>47</b>
<b>Publicación I</b>	<b>49</b>
<b>Publicación II</b>	<b>61</b>
<b>Publicación III</b>	<b>81</b>
<b>Publicación IV</b>	<b>93</b>
<b>V Discusión y conclusiones</b>	<b>117</b>
<b>6. Discusión y síntesis de resultados</b>	<b>119</b>
6.1. Publicación I: Simulaciones marcianas . . . . .	119
6.2. Publicación II: Irradiaciones UV-C bajo distintas condiciones experimentales . . . . .	121
6.3. Publicación III: Experimento LIFE . . . . .	123
6.4. Publicación IV: Anatomía comparada de cinco líquenes relevantes en astrobiología . . . . .	124
6.5. Visión de conjunto . . . . .	125
6.6. Relación con otras publicaciones . . . . .	127
<b>7. Conclusiones</b>	<b>129</b>
7.1. Conclusiones Publicación I . . . . .	129
7.2. Conclusiones Publicación II . . . . .	130
7.3. Conclusiones Publicación III . . . . .	130
7.4. Conclusiones Publicación IV . . . . .	130
7.5. Conclusiones generales . . . . .	131
<b>VI Anexos</b>	<b>141</b>
<b>Summary in English</b>	<b>153</b>

# Lista de figuras

2.1. Distintos aspectos del experimento LICHENS II . . . . .	18
2.2. Distintos aspectos del experimento LITHOPANSPERMIA . . . . .	20
2.3. Distintos aspectos del experimento STONE . . . . .	20
2.4. Distintos aspectos del experimento LIFE . . . . .	22
5.1. Imagen de tres muestras (escala en cm) . . . . .	36
5.2. Representación gráfica de dos secciones transversales de <i>C. gyrosa</i> . . . . .	37
5.3. Imagen de la zona de recogida de <i>C. gyrosa</i> (Zaorejas) . . . . .	37
5.4. Talo estándar del líquen epilítico <i>R. geographicum</i> . . . . .	38
5.5. Sección de un fragmento de talo de <i>R. geographicum</i> . . . . .	39
5.6. Imagen de la zona de recogida de muestras de <i>R. geographicum</i> (Navacerrada) . . . . .	39
5.7. Vista general de la cámara de simulación de atmósferas y superficies planetarias (PASC) . . . . .	40
5.8. Vista general de la cámara de irradiación. . . . .	41
5.9. Aspecto y funcionamiento del fluorómetro Mini-PAM . . . . .	43
5.10. Análisis de intercambio gaseoso . . . . .	45
5.11. Identificación y cuantificación de pigmentos por HPLC . . . . .	46



# Lista de tablas

1.1. Clasificación y ejemplos de organismos extremófilos . . . . .	6
2.1. Experimentos de simulación espacial realizados con líquenes hasta la fecha . . . . .	14
2.2. Experimentos espaciales realizados con líquenes hasta la fecha . . . . .	16
2.3. Experimentos de simulación marciana y de impactos a hipervelocidad realizados con líquenes hasta la fecha . . . . .	23
5.1. Dosis UV-C aplicadas y duración . . . . .	41



# Lista de publicaciones

Los siguientes artículos publicados en revistas indexadas tras un proceso de revisión por expertos están incluidos en la presente tesis doctoral:

1. 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 72:102-110
2. Sánchez, F.J.; Meeßen, J.; Ruiz, M.C.; Sancho, L.G<sup>a</sup>; Ott, S.; Vílchez, C.; Horneck, G.; de la Torre, Rosa. 2014. ***Trebouxia* sp. in the space-tested lichens species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: role of the hydration state and cortex/screening substances.** International Journal of Astrobiology 13 (1): 1-18
3. Onofri, S.; de la Torre, R.; de Vera, J.P.; Ott, S.; Zucconi, L.; Selbmann, L.; Scalzi, G.; Venkateswaran, K.J.; Rabbow, E.; Sánchez, F.J.; Horneck, G. 2012. **Survival of rock-colonizing organisms after 1.5 year in outer space.** Astrobiology 12 (5): 508-516
4. Meeßen, J.; Sánchez, F.J.; Brandt, A.; Balzer, E.-M.; de la Torre, R.; Sancho, L.G<sup>a</sup>; de Vera, J.-P.; Ott, S. 2013. **Extremotolerance and resistance towards space conditions in 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

Asimismo, se considera oportuno incluir en el apartado VI (**Anexos**) de la presente memoria un artículo que ha constituido parte de la base formativa del doctorando y en el cual ha participado como coautor:

- Böttger, U.; Meeßen, J.; Martínez-Frías, J.; Hübers H.-W.; Rull, F.; Sánchez, F. J.; de la Torre, R.; 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



# Acrónimos

**AEMET** Agencia Estatal de Meteorología

**ANOVA** *Analysis of Variance* (Análisis de Varianza)

**ATP** Adenosín Trifosfato

**BIOMEX** “*Biology and Mars*” *Experiment* (Experimento “Biología y Marte”)

**CAB** Centro de Astrobiología

**CLSM** *Confocal Laser Scanning Microscopy* (Microscopía Confocal Láser de Barrido)

**DLR** *Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt* (Centro Aeroespacial Alemán)

**DNA** *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxiribonucleico)

**EEUU** Estados Unidos de América

**EP** Elaboración Propia

**EPS** *Extracellular Polymeric Substances* (Sustancias Poliméricas Extracelulares)

**EuTEF** *European Technology Exposure Facility* (Instalación Europea para la Exposición de Tecnología)

**HHU** *Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf* (Universidad Heinrich-Heine)

**HPLC** *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia)

**IAL** *International Association for Lichenology* (Asociación Internacional de Liquenología)

**INTA** Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial

**IRGA** *Infrared Gas Analyzer* (Analizador de Gas Infrarrojo)

**ISS** *International Space Station* (Estación Espacial Internacional)

**LEO** *Low Earth Orbit* (Baja Órbita Terrestre)

**LHC** *Light Harvesting Complexes* (Complejos Captadores de Luz)

**LIFE** “*Lichens and Fungi*” *Experiment* (Experimento “Líquenes y Hongos”)

**LTSEM** *Low Temperature Scanning Electron Microscopy* (Microscopía Electrónica de Barrido de Baja Temperatura)

**MQY** *Maximum Quantum Yield* (Máximo Rendimiento Cuántico)

**NAI** *NASA Astrobiology Institute* (Instituto de Astrobiología de la NASA)

**NASA** *National Aeronautics and Space Administration* (Administración Nacional de Aeronáutica y del Espacio de los EEUU)

**NDIR** *Non-dispersive Infrared Analyzer* (Sensor de Infrarrojo No Dispersivo)

- PAM** *Pulse Amplitude Modulation* (Modulación por Amplitud de Pulsos)
- PAR** *Photosynthetically Active Radiation* (400-700nm) (Radiación Fotosintéticamente Activa (400-700nm))
- PASC** *Planetary Atmospheres and Surfaces Chamber* (Cámara de Simulación de Atmósferas y Superficies Planetarias)
- PPFD** *Photosynthetic Photon Flux Density* (Densidad de Flujo de Fotones Fotosintéticos)
- PSII** *Photosystem II* (Fotosistema II)
- SEM** *Scanning Electron Microscopy* (Microscopía Electrónica de Barrido)
- SLC** *Secondary Lichen Compound* (Compuesto Liquéxico Secundario)
- TEM** *Transmission Electron Microscopy* (Microscopía Electrónica de Transmisión)
- TDW** *Thallus Dry Weight* (Peso Seco de Talo)
- UHU** Universidad de Huelva
- UHV** *Ultra High Vacuum* (Vacío Ultra Alto)
- UCM** Universidad Complutense de Madrid
- UVR** *Ultraviolet Radiation* (200-400nm) (Radiación Ultravioleta (200-400nm))

**Parte I**

**Introducción**



# Capítulo 1

## Introducción general

### 1.1. Estructura

La presente tesis doctoral está dividida en seis partes bien diferenciadas entre sí (a su vez subdivididas en distintos capítulos):

La **Introducción** (I) es un apartado aclaratorio en el que se describe el marco conceptual de la investigación realizada y la motivación que llevó a la realización de los estudios y experimentos que dan cuerpo a esta tesis doctoral. El objetivo de esta parte es facilitar a los encargados de la evaluación del presente documento su labor inicial, al permitirles una correcta ubicación teórica.

En la **Revisión de conocimientos** (II) trataremos de ofrecer una versión resumida de la investigación realizada, y de los conocimientos alcanzados hasta la fecha con líquenes extremófilos y extremotolerantes en relación con investigación astrobiológica. Tras esa recopilación bibliográfica se hace una enumeración de aquellos objetivos que se plantean en la bibliografía, dando así una visión global de los asuntos a los que actualmente se está prestando una mayor atención, y que se cree que deberían sentar las bases de la investigación en este campo durante los próximos años.

En el apartado **Investigación realizada** (III) se enumeran las hipótesis y objetivos de las publicaciones que componen la presente tesis doctoral, poniendo de relieve los aspectos innovadores de esta investigación y la necesidad de la misma. Asimismo, se describen aspectos relacionados con la metodología empleada en los experimentos realizados y que no están incluidos en las publicaciones que componen esta tesis por distintos motivos, pues se cree que pueden ser de algún modo enriquecedores.

Tras la descripción de los aspectos más destacables de la investigación realizada, en el apartado IV (**Copia de las publicaciones**) se encuentran las publicaciones I, II, III y IV; incluidas en la presente tesis doctoral constituyendo el cuerpo de esta memoria. En cada una de ellas existe una descripción detallada del contexto, estado del arte, materiales y métodos, conclusiones específicas y discusión de cada uno de los experimentos en ellas tratados. En las publicaciones III y IV se incluyen resultados experimentales de especies de líquenes extremotolerantes distintas de *Rhizocarpon geographicum* y *Circinaria gyrosa*, aunque en la presente tesis doctoral nos ceñiremos a éstas.

Consideramos que la **Discusión y conclusiones** (V) es la parte más importante de la presente memoria, pues aquí se analizan los resultados desde un punto de vista holístico, considerando los problemas encontrados durante la realización de estos estudios, así como las cuestiones que quedan pendientes de resolver en el futuro. En las conclusiones se hace una recopilación general de todas aquellas conclusiones, particulares y generales, que pueden extraerse de los estudios que se han hecho y publicado en los diferentes artículos incluidos en la tesis.

Por último, en los **Anexos** (VI) se encuentra un artículo relacionado con la investigación realizada en la presente tesis doctoral y en cuya redacción el doctorando ha participado activamente, habiendo sido importante para su proceso formativo.

## 1.2. Tema de investigación

### 1.2.1. Astrobiología

Si ha habido una inquietud permanente para el ser humano a lo largo de su historia, ésta es el origen de la vida. Esa cuestión fundamental se ha abordado históricamente desde perspectivas tan distintas como la religión o la ciencia ficción, habiendo dado lugar a antiquísimos mitos sobre la creación o a obras maestras de la literatura y el cine. Más recientemente se ha convertido en un objetivo científico al que dar respuesta, posiblemente el más importante que haya existido nunca. La astrobiología, como parte de la ciencia moderna, no sólo trata de descifrar las claves sobre el origen de la vida. Va más allá y estudia la evolución, influencia y distribución de la vida no únicamente en la Tierra, sino que también se plantea la posibilidad de que en otros lugares del Universo se den o hayan dado condiciones que hayan permitido la existencia de seres vivos [35]. El nacimiento de la astrobiología como disciplina científica se produjo en 1998, junto con la creación del *Nasa Astrobiology Institute* (NAI) en los EEUU. Las preguntas fundamentales que los científicos interesados en esta disciplina tratan de responder son: ¿cómo surgió la vida en la Tierra?, ¿existe o ha existido alguna forma de vida en el Universo distinta a la conocida? Si es así, ¿cómo podríamos detectarla? o ¿cuál es el futuro de la vida en la Tierra y en el Universo? Dada la naturaleza de las preguntas (algunas de ellas de marcado carácter filosófico), sus respuestas no pueden venir de una única rama del conocimiento, sino que es necesaria una aproximación transdisciplinar, integrando los conocimientos y métodos de disciplinas como la biología, geología, física (incluyendo a la astronomía y a la astrofísica), química, matemáticas e ingenierías a distintos niveles y desde distintas perspectivas. Esta naturaleza marcadamente transdisciplinar es característica de la investigación en astrobiología.

La disciplina astrobiológica se ocupa de la búsqueda de ambientes habitables, tanto dentro de nuestro Sistema Solar como fuera del mismo. Asimismo, busca evidencias que demuestren la existencia (presente o pasada) de química prebiótica en otros cuerpos planetarios, habiéndose centrado hasta ahora fundamentalmente en Marte. También se realiza investigación de laboratorio y de campo en relación con el origen y evolución de la vida en la Tierra y, cómo no, se estudia el potencial de las distintas formas de vida presentes en la Tierra para adaptarse a condiciones extremas. En línea con este último objetivo, se ha estudiado con mucho interés una gran variedad de organismos extremófilos y extremotolerantes, habiéndose considerado la posibilidad de extrapolar su capacidad para sobrevivir en ambientes extremos con una posible adaptación para poder sobrevivir, o incluso desarrollarse, en otras zonas del Universo con condiciones ambientales distintas a las existentes en la Tierra.

Dentro de la astrobiología se enmarca la hipótesis de la Panspermia. Esta hipótesis, propuesta en 1865 por H.E. Richter [70], desarrollada unos años más tarde por S. Arrhenius [1] y actualizada recientemente por Fajardo-Cavazos et al. (2005, [30]) hacia la actual hipótesis de la Litopanspermia, propone la posibilidad de que distintas formas de vida (microorganismos, estructuras reproductivas, etc.) presentes en las eyecciones de impacto producidas por un meteorito, pudieran desarrollarse en otra zona del universo donde las condiciones fueran favorables. La transferencia de vida entre planetas requeriría tres fases: un proceso de escape (salida al espacio) causado por un impacto, el recorrido por el espacio hasta alcanzar otro cuerpo planetario y el proceso de entrada y depósito.

Esta idea ha sido sometida a diversas críticas a lo largo del tiempo transcurrido desde su proposición, con argumentos como que no puede ser demostrada experimentalmente, que ningún organismo vivo podría sobrevivir a las duras condiciones del espacio, o que no resuelve la cuestión sobre el origen de la vida, sino que lo traslada a otro lugar del Universo fuera de la Tierra. El paso del tiempo, el avance de la tecnología, y la existencia de investigadores interesados por la viabilidad de este proceso, ha permitido que se lleven a cabo diversos estudios que han aportado nuevos datos sobre la posibilidad de un transporte de vida interplanetario. La alta resistencia frente a la radiación UV y a las bajas temperaturas del espacio profundo [92], la supervivencia de esporas bacterianas en el espacio por períodos de hasta seis años [47], la habilidad de las bacterias para sobrevivir hasta cierto punto el proceso explosivo de un impacto, o el descubrimiento de distintos compuestos orgánicos en el meteorito marciano ALH84001 y la todavía discutida existencia de cadenas de magnetita fosilizadas de posible origen microbiológico en el mismo meteorito [61][34], son algunos de los hallazgos que hacen más plausible esta teoría.

### 1.2.2. Organismos extremófilos y extremotolerantes

Por organismo extremófilo se entiende un ser que se desarrolla bajo condiciones físicas o geoquímicas extremas en cuanto que son perniciosas para la mayoría de seres vivos de la Tierra. Por otro lado, los organismos que crecen en ambientes más moderados, pero son capaces de resistir parámetros ambientales extremos durante un tiempo determinado y bajo unas condiciones específicas, son conocidos como extremotolerantes.

Desde que en 1969 se produjese el descubrimiento del primer organismo extremófilo (microorganismo termófilo *Thermus aquaticus*) en el Parque Nacional de Yellowstone (EEUU), los investigadores han descubierto vida en ambientes con condiciones tan extremas, que se creían restringidos para albergar a cualquier ser vivo. Tras más de cuarenta años de investigación, se han descubierto organismos extremófilos pertenecientes a los tres dominios de clasificación taxonómica, *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya* (Ver tabla 1.1). Esto demuestra que la extremofilia no es una característica restringida a formas de vida simples, sino que existe una gran diversidad en cuanto al nivel de complejidad de estos seres, desde los microorganismos más simples hasta animales superiores como los tardígrados o quironómidos. Estos hallazgos no han dejado de asombrar a la comunidad científica, y se ha dedicado un gran esfuerzo a tratar de comprender la fisiología de las formas de vida que sobreviven e incluso se desarrollan bajo condiciones ambientales extremas. De esta forma, en el período de tiempo pasado desde el descubrimiento de estos organismos, han podido ampliarse las barreras del conocimiento, redefiniéndose los límites de la vida e incluso el propio concepto de ser vivo.

### 1.2.3. Líquenes

La liquenología es la rama de la micología que se encarga del estudio científico de los líquenes, dentro de la botánica. Esta disciplina trata de encontrar respuestas a todas aquellas cuestiones relacionadas con los líquenes. A pesar de los numerosos años de investigación ya transcurridos, a día de hoy no se ha alcanzado un consenso respecto a la definición de liquen que satisfaga a toda la comunidad científica [2][43]. En 1982 la Asociación Internacional de Liquenología (IAL) aceptó la siguiente definición como válida [51]:

*Un liquen es la asociación entre un hongo y un simbionte fotosintético que resulta en un talo estable y con una estructura específica.*

Posteriormente se ha visto que para la buena comprensión de la biología y evolución de los líquenes, hay que tener en cuenta otros aspectos no recogidos en la anterior definición, como los distintos tipos de simbiosis o el número de componentes de cada relación simbiótica. Por ello, una definición más completa podría ser:

*Una asociación entre un hongo y un simbionte fotosintético en la que el hongo es el "exhabitante", que resulta en un talo estable con una estructura específica y que es capaz de mantenerse a sí mismo.*

Lo que es común para todos ellos es que la relación se establece entre el *micobionte*, que es la parte fúngica y heterótrofa formada en el 96 % de especies de líquenes por un hongo de tipo ascomiceto [68], y el *fotobionte*, el socio fotosintético, que puede ser una cianobacteria (procariota) o un alga verde unicelular (eucariota), siendo estos últimos los fotobiontes presentes en aproximadamente las dos terceras partes del total de especies liquénicas [46]. También hay casos en que los dos tipos de fotobiontes conviven con un micobionte en un mismo talo. La interacción entre ambas partes origina el *holobionte*, talos liquénicos complejos con una morfología, fisiología y ecología específicas. Dentro del talo, la parte fúngica suele ser la mayoritaria y crea una estructura que proporciona soporte y protección al alga, que a su vez y gracias al proceso de fotosíntesis, genera los nutrientes necesarios para el desarrollo de ambos.

Desde un punto de vista evolutivo la simbiosis liquénica constituyó un éxito, a pesar de tratarse de seres poiquilohídricos y poiquilotermos. Hoy en día se cree que existen aproximadamente 17500 especies de líquenes que dominan alrededor del 8 % de la superficie de la Tierra, lo que puede ayudarnos a imaginar la viabilidad evolutiva de estos organismos [10]. Además, en muchos casos el holobionte ha sido capaz de colonizar ambientes no asequibles al resto de hongos o a otros vegetales [4].

PARÁMETRO	TIPO	DEFINICIÓN	EJEMPLOS
Temperatura	Hipertermófilos	Crecimiento >80 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i> , 113 °C
	Termófilos	60 - 80 °C	<i>Synechococcus lividis</i>
	Mesófilos	15 - 60 °C	<i>Homo sapiens</i>
	Psicrófilos	<15 °C	<i>Psychrobacter</i> spp.
Radiación		Toleran altas dosis de radiación UV-C (254 nm)	<i>Deinococcus radiodurans</i>
Presión	Piezófilos	Crecimiento bajo altas presiones	<i>Halomonas</i> spp.
Gravedad	Hipergrávidos	> 1 g	Desconocido
	Hipográvidos	< 1 g	Desconocido
Vacío		Toleran condiciones de vacío	Tardígrados, insectos, microorganismos, semillas
Desecación	Xerófilos	Anhidrobióticos	<i>Artemia salina</i> , nematodos, microorganismos, hongos, <b>líquenes</b>
Salinidad	Halófilos	Crecen en medios con alta concentración de sales (2-5 M NaCl)	Halobacteriaceae, <i>Dunaliella salina</i>
pH	Alcalófilos	pH > 9	<i>Natronobacterium</i> , <i>Bacillus firmus</i> OF4, <i>Spirulina</i> spp. (todos pH ≈ 10,5)
	Acidófilos	Crecen en condiciones de bajo pH	<i>Cyanidium caldarium</i> , <i>Ferroplasma</i> sp. (ambos pH ≈ 0)
Tensión de O <sub>2</sub>	Anaerobios	No toleran O <sub>2</sub>	<i>Methanococcus jannaschii</i>
	Microaerófilos	Toleran bajas concentraciones de O <sub>2</sub>	<i>Clostridium</i>
	Aerobios	Requieren O <sub>2</sub>	<i>Homo sapiens</i>
Extremos químicos	Gases		<i>C. caldarium</i> (CO <sub>2</sub> puro)
	Metales	Metalotolerantes	<i>Ferropasma acidarmanus</i> (Cu, As, Cd, Zn)

**Tabla 1.1:** Clasificación y ejemplos de organismos extremófilos

Modificado de *Rothschild, L.J. and Mancinelli, R.L.*(2001). **Life in extreme environments**. [71]

Desde un punto de vista ecológico, los líquenes pueden ser considerados *microecosistemas* [78] dado que:

- Integran en un único ser los dos procesos metabólicos principales existentes entre los seres vivos: Autotrofia y Heterotrofia
- Un mismo talo incorpora dos (o tres) organismos, que pueden proceder de tres reinos distintos: Fungi (Dominio *Eukarya*) junto con Cyanobacteria (Dominio *Bacteria*) y Plantae (Dominio *Eukarya*).

Sistemáticamente los líquenes no constituyen un grupo homogéneo, pues no tienen un mismo origen. Se trata de organismos con un origen polifilético que han llegado a tener características similares por convergencia evolutiva [4]. Se considera que ésto es así por, entre otros motivos, la alta diversidad y concurrencia mixta de especies fúngicas liquenizadas y no liquenizadas (42 y 58 % respectivamente) dentro del filo *Ascomycota* [58]. Se estima que para los líquenes ascomicetos, el proceso de liquenización ha tenido lugar aproximadamente en cinco ocasiones a lo largo de la evolución, además de creerse que la capacidad de liquenizar por parte de los micobiontes se ha adquirido y perdido varias veces [81].

Existen multitud de líquenes extremotolerantes, siendo aquellos que han demostrado ser organismos muy resistentes en términos de temperatura, radiación y desecación. En la bibliografía se encuentran estudios realizados en los hábitats más extremos de la tierra (desde los “Valles Secos” en la Antártida hasta el desierto de Atacama en Chile) que muestran datos asombrosos de supervivencia y desarrollo liquénico. Tanto es así, que los líquenes están considerados entre los organismos eucariotas más resistentes a las condiciones extremas de la tierra [54][78]: son capaces de recuperarse tras 10 años de inactividad en estado totalmente seco, se ha demostrado que son metabólicamente activos (realizan intercambio gaseoso) a  $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; sobreviven a la inmersión en Nitrógeno líquido y pueden ser los primeros en colonizar un nuevo hábitat o los últimos supervivientes en zonas con altas tasas de contaminación radioactiva. Se ha propuesto que esta elevada resistencia esté basada en propiedades como la presencia de un grueso córtex (capa superficial pigmentada), que actúa como agente protector. Otra opción es que una serie de compuestos liquénicos secundarios (SLCs) como la parietina, el caroteno, la melanina o el ácido úsnico (entre otros), junto con la presencia de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), tengan parte de responsabilidad en la extraordinaria resistencia detectada. Por otra parte, también se cree que el hecho de que se trate de sistemas poiquilohídricos (varían su contenido en agua en función de la disponibilidad ambiental de este compuesto) puede ser la clave para la elevada resistencia detectada. Al encontrarse en condiciones adversas, los talos liquénicos pierden hasta el 97% de su contenido en agua, entrando en un estado de latencia reversible caracterizado por ser extremadamente resistente. La mayor parte de investigaciones apuntan a que una combinación de todas las características anteriormente mencionadas junto con otras todavía no descubiertas, sean las que otorguen a los líquenes extremófilos su extraordinaria resistencia.

#### 1.2.4. Líquenes y astrobiología

En el contexto de la astrobiología, los ensayos espaciales y de simulación planetaria permiten:

- Profundizar en el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia de estos organismos simbióticos.
- Obtener más datos sobre los límites de la vida.
- Probar experimentalmente la plausibilidad de alguna de las fases que la hipótesis de la Liotopanspermia propone y realizar una primera aproximación experimental al potencial de habitabilidad de distintos cuerpos planetarios con respecto a estos organismos extremófilos y/o extremotolerantes.

Debido a las características reseñadas anteriormente, se planteó la posibilidad de evaluar la resistencia y tolerancia de especies seleccionadas de líquenes extremotolerantes, junto con algas unicelulares y bacterias bajo condiciones espaciales [18][78]. Para ello se realizaron los experimentos espaciales LICHENS II a bordo de BIOPAN 5/FOTON M2 en 2005 [77], LITHOPANSPERMIA Y STONE en 2007 a bordo de BIOPAN6/FOTON M3 [17] [18] [69] y LIFE (Lichens and Fungi Experiment) en 2008 a bordo de EXPOSE-E/EuTEF [66] [80], que son explicados en profundidad en los apartados 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3 y 2.2.4 respectivamente. Para estos experimentos se seleccionaron las especies de líquenes *Rhizocarpon geographicum*, *Xanthoria elegans* y *Circinaria gyrosa* así como sus estructuras reproductivas [27] por su elevado grado de resistencia a las condiciones espaciales.

El objetivo principal de estos experimentos realizados con líquenes extremotolerantes (entre otros organismos) era evaluar la capacidad de supervivencia y grado de adaptación de estos organismos a las duras condiciones presentes en órbita baja terrestre (Low Earth Orbit-LEO, distancia menor o igual a 500 km desde la superficie de la tierra). Tras la exposición a unas condiciones caracterizadas por amplias fluctuaciones de temperatura (de  $-23^{\circ}\text{C}$  a  $+60^{\circ}\text{C}$ ), alto vacío de aproximadamente  $10^{-6}\text{Pa}$  (que provoca una deshidratación extrema) y radiación solar y cósmica sin filtrar, los resultados fueron asombrosamente positivos. Los dos primeros experimentos demostraron unos niveles de supervivencia muy elevada y valores de vitalidad similares a los registrados previamente al vuelo. El tercer experimento que conllevó la exposición de las muestras a un período de aproximadamente un año y medio a las condiciones previamente mencionadas afectó seriamente la viabilidad de las muestras.

Una vez demostrada la tolerancia a exposiciones cortas bajo condiciones espaciales, era necesario estudiar en profundidad los mecanismos de resistencia y tolerancia concretos que estos organismos poseen para presentar unos niveles de resistencia tan elevados. Éste fue el objetivo fundamental que se planteó al inicio de esta tesis sobre las especies de líquenes *Rhizocarpon geographicum* y *Circinaria gyrosa*, líquenes extremotolerantes de la península Ibérica. Posteriormente y como desarrollo de la anterior idea, surgió la posibilidad de investigar si estos organismos podrían ser resistentes a las condiciones presentes en otros planetas, concretamente en el planeta Marte. Para alcanzar ambos objetivos, era necesario adentrarse en la fisiología de las especies de líquenes extremotolerantes arriba mencionadas, lo que hicimos desde una perspectiva distinta en las cuatro publicaciones incluidas en la presente tesis doctoral, tratando de dar respuesta a algunas preguntas concretas.

Hasta ahora, la hipótesis más ampliamente aceptada para explicar la elevada tolerancia de estos organismos a los parámetros físicos extremos del espacio era su carácter poiquilohídrico (explicado anteriormente). De la misma manera, se creía también que el fotobionte era la parte más sensible y susceptible de sufrir algún tipo de daño. En la presente tesis doctoral, se demuestra la gran importancia de la poiquilohidria como mecanismo de resistencia de los líquenes además de aportar datos para abrir una discusión sobre la sensibilidad del fotobionte.

Por la propia naturaleza de la investigación, y teniendo en cuenta el desconocimiento que existe actualmente al respecto, la cuestión se abordó desde un punto de vista global. Desde la perspectiva fisiológico-botánica, se pretendió ampliar el conocimiento de los mecanismos de resistencia que expliquen la elevada tolerancia a distintos factores ambientales extremos detectada en las especies de líquenes *R. geographicum* y *C. gyrosa*. Desde un punto de vista astrobiológico, además de aumentar el conocimiento actual sobre los límites de la vida; la obtención de resultados positivos de resistencia a radiación UV supondría un apoyo a la hipótesis de la Litopanspermia.

### 1.2.5. Publicaciones

En la Publicación I (Parte IV) se estudió la respuesta del líquen *C. gyrosa* a condiciones marcianas, gracias a la utilización de una cámara de simulación. El objetivo era analizar la influencia de distintas combinaciones de parámetros marcianos simulados (y de vacío espacial) sobre la fisiología del líquen. Para ello se evaluó por un lado el estado del fotobionte mediante el análisis del rendimiento cuántico de conversión de energía fotoquímica durante la fotosíntesis y por otro, el estado del talo completo mediante el análisis de intercambio gaseoso dependiente de luz. Ambos análisis de vitalidad revelaron una elevada resistencia a las combinaciones de condiciones marcianas (y de vacío espacial) aplicadas.

La Publicación II (Parte IV) expone un estudio sobre una serie continuada de irradiaciones con radiación UV-C, siendo la dosis máxima equivalente a la radiación de esa longitud de onda que se recibiría en LEO durante aproximadamente 67 días de exposición. El objetivo del experimento, era analizar el efecto de la radiación UV-C sobre el fotobionte *Trebouxia* sp. en las especies de líquenes extremotolerantes *R. geographicum* y *C. gyrosa* bajo distintas condiciones experimentales. Por un lado comparando el efecto del estado fisiológico del talo y por otro la presencia de estructuras/sustancias fotoprotectoras.

En la Publicación III (Parte IV) se recogen los resultados del proyecto LIFE (2.2.4), que ha supuesto el experimento de exposición a condiciones espaciales más largo (1,5 años) llevado hasta la fecha con líquenes. En él, muestras de los líquenes *Xanthoria elegans* y *Rhizocarpon geographicum* se enfrentaron a las condiciones presentes en LEO. Aquí describiremos los resultados obtenidos para *Rhizocarpon geographicum* y sus implicaciones.

Por último, en la Publicación IV (Parte IV) se realiza una comparación de las características anatómico-morfológicas que pueden explicar parte de la resistencia y/o tolerancia de los líquenes extremotolerantes enviados al espacio. Nos ceñiremos a los resultados obtenidos con las especies *R. geographicum* y *C. gyrosa*, pues fue en estos organismos en los que estuvo centrada nuestra participación.

## 1.3. Motivación

El carácter incipiente de la disciplina astrobiológica unido a la elevada e inesperada vitalidad registrada tras simulaciones y exposiciones espaciales reales hicieron que la fuerza de trabajo de

esta tesis doctoral se enfocara en el estudio de los mecanismos de resistencia de líquenes extremotolerantes en el contexto de la investigación astrobiológica. Lo anterior, unido a las líneas de investigación abiertas actualmente en relación con organismos extremófilos y extremotolerantes, y la cantidad y calidad de instituciones que investigan en este campo, hacen que la línea de estudio de esta tesis doctoral sea una de las más prometedoras en relación a la investigación de los límites de la vida y de la resistencia a condiciones extremas. Además, la cantidad de preguntas pendientes de respuesta, hacen que se trate de una línea con grandes posibilidades de desarrollo. La investigación en astrobiología es investigación básica con, *a priori*, pocas posibilidades de aplicación práctica, pero que se plantea preguntas básicas y elementales para el ser humano. La perspectiva botánica, y más en concreto el trabajar con líquenes de la península Ibérica supuso una motivación extra.



## Parte II

# Revisión de conocimientos



## Capítulo 2

# Estado actual de la investigación

En 2002, durante el estudio en profundidad de las propiedades de adaptación de algunas especies de líquenes a las condiciones medioambientales extremas presentes en los hábitats en que se desarrollan, se detectaron altos niveles de resistencia en cuanto a radiación UV-B, sequedad y temperaturas extremas. Fue entonces cuando se planteó por primera vez la posibilidad de utilizar líquenes extremófilos y extremotolerantes en astrobiología [13]. En aquel momento, el inicio formal de la disciplina era muy reciente, y los buenos resultados obtenidos hacían presagiar una investigación fructífera en este campo. Los líquenes, como comunidades simbióticas eucariotas, suponían un avance importante en esta línea de estudio, pues hasta la fecha la investigación se había restringido a seres procariotas (unicelulares).

### 2.1. Experimentos de simulación espacial

Ese mismo año (2002) y como requisito previo al experimento espacial LICHENS I se realizaron en la sede de Colonia del Centro Aeroespacial Alemán (DLR) los primeros ensayos de simulación espacial con líquenes. El objetivo era estudiar la tolerancia de las especies *Rhizocarpon geographicum* y *Xanthoria elegans* a los parámetros ambientales a los que tendrían que enfrentarse durante una exposición en LEO. Para ello, muestras de las anteriores especies fueron expuestas a una dosis acumulativa de radiación ultravioleta (UVR) espacial (200 - 400 nm) equivalente a una exposición de 15 días en LEO, y sometidas a 20 h de vacío espacial de  $3 \times 10^{-4}$  mbar. Para evaluar su estado fisiológico, se determinó antes y después de la simulación, el rendimiento fotosintético de las muestras. Los valores pre-exposición se tomaron como referencia del estado del fotobionte en condiciones estándar. Los análisis post-simulación mostraron altas tasas de vitalidad, no detectándose diferencias significativas con respecto a las medidas pre-simulación [15]. De esta forma se confirmó la viabilidad del experimento LICHENS I y se dio vía libre a su integración en BIOPAN, dispositivo diseñado para la exposición de experimentos biológicos y de materiales en el espacio.

Desgraciadamente durante el lanzamiento del satélite FOTON M1, a bordo del cual se encontraba el dispositivo BIOPAN-4 de la ESA con el experimento LICHENS I en su interior, algo falló en el cohete propulsor e hizo que todo el conjunto explotase [15]. De forma fortuita en la primavera de 2003, se encontraron los restos del satélite cerca del cosmódromo Plesetsk en el norte de Rusia. Tras recuperar y enviar a los investigadores la parte correspondiente al experimento LICHENS I, los análisis mostraron que las muestras de *R. geographicum* no habían sufrido daños significativos, mientras que en las de *X. elegans* sí se detectó una disminución importante de vitalidad [15]. Desde entonces, la investigación en este campo no ha parado de avanzar.

Simultáneamente se profundizó en el estudio de las propiedades extremotolerantes de estos organismos a las condiciones extremas de su ambiente [16], [17], como base ecológica sobre la que fundamentar los buenos resultados de supervivencia obtenidos en la simulación espacial. Más adelante se llevaron a cabo más experimentos de simulación, con el objetivo de probar el potencial de supervivencia y viabilidad de estos organismos simbióticos y sus respectivos biontes a las condiciones espaciales bajo condiciones controladas en laboratorio (tabla 2.1). Estos estudios demostraron de forma generalizada para estos organismos altas tasas de supervivencia y viabilidad frente a parámetros espaciales como el vacío o el espectro completo de UVR [14], [15], [28], [27], [26], [24].

TIPO DE SI-MULACIÓN	LIQUEN	DISPOSITIVO SI-MULACIÓN	SIMULACIÓN	DURACIÓN	PARÁMETROS SIMULACIÓN	ENSAYOS VIABILIDAD	DE REFERENCIA
Espacial	<i>R. geographica</i> , <i>X. elegans</i>	simulador solar (SPASOLAB, INTA, Madrid) y cámaras simulación espacial (DLR Colonia)	(1) UV + VIS + NIR (200-900 nm) en SPASOLAB, (2) vacío + UV + VIS + NIR (3 x 10 <sup>-7</sup> bar, 200-900 nm) en DLR Colonia	10, 20 h	(1) vacío (10 <sup>-5</sup> Pa), (2) UV (160-400 nm, 2,8+8,8+0,7 W/m <sup>2</sup> ), (3) vacío + UV (10 <sup>-5</sup> Pa, 160-400 nm, 2,8+8,8+0,7 W/m <sup>2</sup> )	actividad PSII	de la Torre et al. 2004 [15]
Espacial	<i>F. bracteata</i> , <i>X. elegans</i> , <i>X. parietina</i>	cámaras simulación espacial (DLR Colonia)	4, 8, 16 h	(1) vacío (10 <sup>-5</sup> Pa), (2) UV (160-400 nm, 2,8+8,8+0,7 W/m <sup>2</sup> ), (3) vacío + UV (10 <sup>-5</sup> Pa, 160-400 nm, 2,8+8,8+0,7 W/m <sup>2</sup> )	tinción vital (FumI, Sytox Green), tasa de germinación de ascosporas [27]	de Vera et al. 2003 [28], de Vera et al. 2004a [27]	
Espacial	<i>F. bracteata</i> , <i>X. elegans</i>	cámaras simulación espacial (DLR Colonia)	1, 5, 15, 30 min, 1, 2, 4, 8, 16 h	(1) vacío (10 <sup>-5</sup> Pa), (2) UV (200-400 nm, 40, 466, 3347 kJ/m <sup>2</sup> ), (3) vacío + UV (10 <sup>-5</sup> Pa, 200-400 nm, 40, 466, 3347 kJ/m <sup>2</sup> ), (4) vacío + UV (10 <sup>-3</sup> Pa, 160-400 nm, 8,1 W/m <sup>2</sup> )	tinción vital (FumI, Sytox Green), tasa de germinación de ascosporas	de Vera et al. 2004b [26]	
Espacial	<i>X. elegans</i>	cámaras simulación espacial (DLR Colonia)	5 min, 2, 4, 8, 16 h	vacío (2,8 x 10 <sup>-1</sup> -3,6 x 10 <sup>-5</sup> Pa) y UV (200-400 nm, 2,8 W/m <sup>2</sup> )	tinción vital (FumI, Sytox Green), cultivo de biontes	de Vera et al. 2008 [24]	
Espacial	<i>B. frigida</i> , <i>P. aphthosa</i>	cámaras simulación espacial (DLR Colonia)	5, 15, 30, 60, 120, 240, 480 min	UVC (254 nm, 2,1-201,8 J/m <sup>2</sup> )	tinción vital (FumI, Sytox Green)	de Vera and Ott 2010b [22]	

Tabla 2.1: Experimentos de simulación espacial realizados con líquenes hasta la fecha

Traducido y modificado de Meeßen, J.; Sánchez, F. J.; Brandt, A.; Balzer, E.-M.; de la Torre, R.; Sancho, L. G. A.; de Vera, J.-P.; Ott, S. (2013). Extremotolerance and resistance towards space conditions in lichens: Comparative studies on five species used in astrobiological research I. Morphological and anatomical characteristics. [62]

Tras todos los ensayos de simulación espacial realizados con líquenes, los análisis realizados para evaluar la supervivencia y viabilidad de las muestras mostraron una tendencia positiva. Así, no sólo se obtuvieron nuevas evidencias acerca de la adaptación de algunos de estos organismos simbióticos a los parámetros extremos del espacio (demostrándose una vez más su elevado potencial e indiscutible interés astrobiológico), sino que se re-confirmó la adecuación de estos organismos para su inclusión en próximos experimentos espaciales. Además, los buenos resultados permitieron plantearse la posibilidad de aumentar la intensidad, duración y combinación de parámetros extremos a analizar, tratando de alcanzar los límites de supervivencia de las especies ya evaluadas.

En línea con la investigación iniciada, se realizaron varios envíos más de muestras de líquenes extremotolerantes al espacio (ver tabla 2.2). En esos experimentos espaciales se detectaron altas tasas de resistencia (con matices en función de la duración de la exposición) [77], [17], [18], [69], [66], [80], [20]. En muchos casos, los análisis realizados tras la exposición a condiciones espaciales reales para comprobar la vitalidad y viabilidad de los líquenes y/o de sus estructuras, mostraron una tendencia similar a la registrada antes del vuelo. Por ejemplo, las medidas de actividad del PSII llevadas a cabo para evaluar el estado del fotobionte, fueron en muchos casos prácticamente iguales a las medidas antes del vuelo. Los estudios de intercambio gaseoso y ultraestructurales revelaron cambios mínimos en la fisiología [18] y en la anatomía [77] de las muestras analizadas. Estos resultados fueron inesperados, pues la recuperación total de la actividad fotosintética de los fotobiontes tras la exposición a un porcentaje próximo al 99% de radiación solar extraterrestre era altamente improbable, al ser el espectro completo de UVR (junto con el vacío y la radiación cósmica) uno de los factores espaciales más letales para los seres vivos [77].

Estos experimentos impulsaron más la investigación astrobiológica con líquenes, revalidando las expectativas creadas tras las simulaciones realizadas (tabla 2.1). Los resultados obtenidos aportaron más luz sobre las posibilidades reales de estos organismos frente a las duras condiciones espaciales, aumentando los argumentos de debate a favor de la hipótesis de la Litopanspermia.

Existen multitud de restricciones que han hecho que hasta ahora no haya sido posible el envío de muestras biológicas a otros planetas: desde dificultades técnicas pasando por razones meramente económicas o las no menos importantes cuestiones éticas que ese supuesto implicaría. Como alternativa, se han desarrollado las cámaras de simulación de ambientes y atmósferas planetarias, que como su nombre indica, tratan de emular de la forma más fiel posible las condiciones ambientales presentes en la superficie de otros planetas [52]. Tras muchas décadas de investigación espacial, a día de hoy se tiene constancia de la práctica totalidad de parámetros ambientales presentes en planetas “ceranos” a la Tierra, como por ejemplo Marte. De esta forma es posible recrear la mayor parte de condiciones termofísicas presentes en la superficie de esos cuerpos planetarios gracias a las cámaras de simulación. Se han realizado estudios de este tipo con líquenes y hasta la fecha han mostrado que las especies analizadas sobreviven durante cortos períodos de tiempo a distintas combinaciones de condiciones marcianas, siempre que los talos estén en estado latente [23], [74].

Los buenos resultados obtenidos tanto en experimentos en el espacio como en simulaciones espaciales y planetarias han hecho que se proponga a estos organismos como uno de los mejores candidatos para sobrevivir las condiciones extremas presentes en el espacio [78].

A pesar de todo lo anterior, todavía no se tiene un conocimiento en profundidad sobre cuáles son los mecanismos implicados en la elevada tolerancia y resistencia detectada en estos organismos y sólo podemos inferir algunas de las estrategias que utilizan para sobrevivir bajo condiciones ambientales que ningún otro organismo vivo es capaz de soportar.

## 2.2. Experimentos espaciales y tests de transferencia interplanetaria

Tal y como ya se ha dicho, el experimento LICHENS I fue el primer proyecto espacial con líquenes. Se desarrolló en 2002 por varias instituciones españolas (UCM, INTA, CSIC) y estuvo liderado por el profesor Leopoldo G<sup>a</sup> Sancho (UCM). Desde entonces numerosos estudios se han sucedido en la misma línea, habiéndose demostrado en casi todos ellos un elevado nivel de resistencia de estos organismos a los parámetros espaciales reales. En este apartado trataremos de hacer una descripción resumida de los experimentos con líquenes llevados a cabo en el espacio hasta la fecha desde una perspectiva astrobiológica, y cuáles han sido sus resultados.

EXPERIMENTO LIQUEN	PLATAFORMA EXPOSICIÓN	DURACIÓN	PARÁMETROS DE EXPOSICIÓN	ENSAYOS DE VIABILIDAD	REFERENCIA
LICHENS I <i>R. geographi- cum, X. ele- gans</i>	BIOPAN-4 / FOTON M1	minutos	muestras recuperadas tras exposición durante lanzamiento	actividad PSII	de la Torre et al. 2004 [15]
LICHENS II <i>R. geographi- cum, X. ele- gans</i>	BIOPAN-5 / FOTON M2	16 d	exposición espacial, $\lambda > 170$ , $> 280$ , $> 320$ , $> 400$ nm, (UVA + UVB a $2,2 \times 10^4$ kJ/m <sup>2</sup> )	Actividad PSII, CLSM+tinción vital, LTSEM, TEM	Sancho et al. 2007 [77]; Sancho et al. 2008 [78]
LITHOPANS -PERMIA <i>C. gyrosa, R. geographicum, X. elegans</i>	BIOPAN-6 / FOTON M3	10 d	exposición espacial, $\lambda > 110$ , $> 200$ , $> 290$ , $> 400$ nm	actividad PSII, CLSM+tinción vital, LTSEM, intercambio gaseoso en respuesta a la luz	de la Torre et al. 2010 [18]; Raggio et al. 2011 [69]
STONE	<i>R. geographi- cum</i> BIOPAN-6 / FOTON M3	10 d	exposición espacial seguida de re-entrada a la atmósfera	Actividad PSII debido a carbonización de muestras durante re-entrada	de la Torre et al. 2010 [18]
LIFE	<i>R. geographi- cum, X. ele- gans</i> EXPOSE-E / EuTEF	559 d	temperaturas LEO, radiación UV ( $\lambda > 110$ nm, $7 \times 10^3$ - $5 \times 10^6$ kJ/m <sup>2</sup> ), ( $\lambda > 200$ - $400$ nm, $9,2 \times 10^2$ - $6,3 \times 10^5$ kJ/m <sup>2</sup> ) y cósmica ( $\leq 190$ mGy), vacío ( $10^{-4}$ - $10^{-7}$ Pa) o atmósfera marciana (100% CO <sub>2</sub> , 7 mbar)	tinción vital (FunI, Bac Light), actividad PSII, fxSEM, TEM, cultivo de biontes, fotoproductos	Onofri et al. 2012 [66]; Scalzi et al. 2012 [80], análisis aún en proceso
BIOMEX	<i>B. frigida, C. gyrosa</i> EXPOSE-R2 / Zvezda	12-18 meses	temperaturas LEO, radiación ( $> 190$ nm hasta $8 \times 10^5$ kJ/m <sup>2</sup> ), vacío ( $10^{-4}$ - $10^{-7}$ Pa) o atmósfera marciana (100% CO <sub>2</sub> , 7 mbar, 100% humedad relativa)	tinción vital (FunI, Bac Light), actividad PSII, fxSEM, TEM, LTSEM, cultivo de biontes y desarrollo	programados para 2014-2015, ensayos EVT y SVT en desarrollo

Tabla 2.2: Experimentos espaciales realizados con líquenes hasta la fecha

Traducido y modificado de Meeßen, J.; Sánchez, F. J.; Brandt, A.; Balzer, E.-M.; de la Torre, R.; Sancho, L. G.<sup>a</sup>; de Vera, J.-P.; Ott, S. (2013). **Extremotolerance and resistance towards space conditions in lichens: Comparative studies on five species used in astrobiological research I. Morphological and anatomical characteristics.** [62]

### 2.2.1. Experimento LICHENS II

Dado que el experimento fallido LICHENS I y sus resultados ya se han descrito al comienzo del capítulo, comenzaremos con la descripción del experimento LICHENS II [77], que fue una copia de su predecesor. Este experimento se llevó a cabo con éxito en 2005, siendo por lo tanto el primero de varios estudios de resistencia llevados a cabo con líquenes en el espacio.

El objetivo fundamental de este experimento fue el mismo que el del anterior, y consistió en evaluar la capacidad de supervivencia de las especies extremotolerantes *Rhizocarpon geographicum* y *Xanthoria elegans*) a los parámetros espaciales presentes en LEO [77]. Para ello, los líquenes (tras un proceso de corte, pues ambas especies son epilíticas) fueron ubicados en un soporte físico o “hardware” (Fig. 2.1b) especialmente diseñado para la misión, y que consistía en unos huecos cilíndricos dispuestos en dos niveles. Ese soporte con las correspondientes muestras incluidas en las celdas, se integró en el interior del dispositivo BIOPAN-5 (Fig. 2.1c) de la Agencia Espacial Europea (ESA).

El dispositivo BIOPAN fue el nombre que se dio a un contenedor de experimentos diseñado en los años noventa, con el objetivo de crear una plataforma experimental de exposición para evaluar el efecto del ambiente espacial sobre muestras biológicas [19]. BIOPAN tenía una forma y dimensiones similares a las de una cacerola (38 cm de diámetro, 23 cm de altura y 27 kg de peso). Se fijaba en el exterior de los satélites rusos FOTON transportando experimentos con un peso máximo de 3,5 kg. Una vez en órbita, la tapa era abierta por control remoto gracias a que estaba motorizada y así quedaban expuestos los experimentos contenidos en su interior al espectro completo de radiación solar, rayos cósmicos, vacío y fluctuaciones de temperatura (parámetros que eran monitorizados continuamente). Una vez terminada la exposición y de forma previa a la reentrada a la atmósfera terrestre, la tapa se cerraba nuevamente para evitar un calentamiento excesivo de las muestras.

En el caso que nos ocupa, BIOPAN-5 fue ubicado en la aeronave rusa FOTON M2 (Fig. 2.1d). El conjunto fue puesto en órbita el 20 de Junio de 2005 gracias a un lanzador Soyuz desde el cosmódromo de Baikonur (Kazajstán). Tras el lanzamiento, y una vez en órbita, la tapa del dispositivo BIOPAN-5 se abrió por telecomando, exponiendo las muestras contenidas en el interior a las condiciones espaciales durante un período aproximado de dos semanas (16 días). En concreto, en el experimento LICHENS II las muestras del nivel superior del hardware se enfrentaron a la totalidad de condiciones presentes en LEO: vacío espacial de unos  $10^{-6}$  Pa, radiación electromagnética solar extraterrestre ( $\lambda > 170$  nm) hasta una cantidad total de  $22 \text{ MJ m}^{-2}$ , radiación cósmica hasta una dosis de 3 mGy y fluctuaciones de temperatura de unos  $10$  °C cada 90 minutos (se registró una fluctuación máxima de 42 °C). Las muestras ubicadas en el nivel inferior actuaron como muestras control, al no estar sometidas al estrés radiativo UV espacial.

Para evaluar la supervivencia y estado fisiológico de los biontes de *R. geographicum* y *X. elegans* se eligieron dos métodos analíticos. En primer lugar se realizó un análisis de fluorescencia de clorofila *a* mediante un fluorómetro Mini-PAM (Walz, Alemania), para determinar el rendimiento cuántico del PSII y evaluar así el estado del fotobionte. A continuación fueron llevados a cabo estudios de microscopía confocal (Confocal Scanning Laser Microscopy, CSLM) en combinación con tinción vital, microscopía electrónica de barrido a baja temperatura (Low Temperature Scanning Electron Microscopy, LTSEM) y microscopía de transmisión (Transmission Electron Microscopy, TEM) para evaluar la integridad de ambos simbioses [77].

Los resultados de este experimento fueron un éxito rotundo. La actividad del PSII se recuperó en un 90 % tras sólo 3 h de revitalización. La actividad fotosintética de la totalidad de las muestras líquénicas que habían sido expuestas era prácticamente la misma a la registrada antes del vuelo, siendo además capaces de recuperar por completo su actividad metabólica en 24 horas. La técnica de tinción vital mediante un kit “LIVE/DEAD BacLight” fue empleada para determinar la relación de células vivas y muertas por comparación de aquellas que mantienen la integridad de las membranas celulares frente a las que no. Esta técnica reveló que una proporción significativa de células algales (83 % en *X. elegans* y un 71 % en *R. geographicum*) mantuvieron su integridad, mientras que un porcentaje algo menor (60 %) de las células de ambos micobiontes demostró que sus membranas estaban intactas. Los estudios de microscopía electrónica revelaron que no se habían producido cambios ultraestructurales significativos en los talos líquénicos, ni en las células algales ni en las fúngicas, incluidas las células del córtex que habían estado en un contacto más directo con las

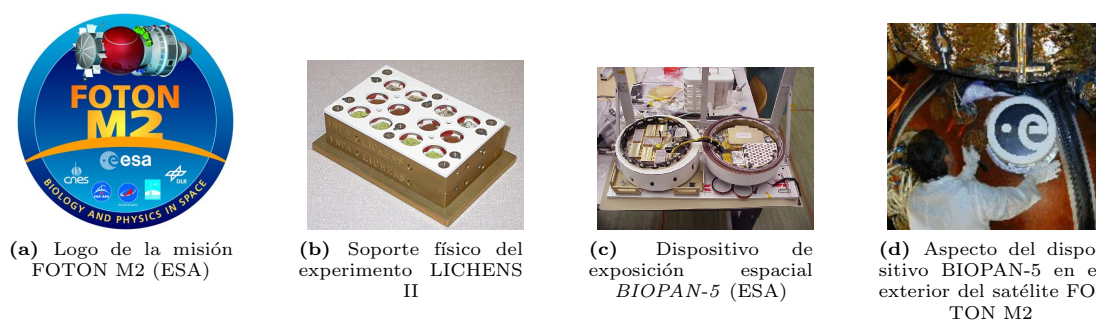


Figura 2.1: Distintos aspectos del experimento LICHENS II

condiciones espaciales [77].

### 2.2.2. Experimento LITHOPANSPERMIA

Como desarrollo del anterior estudio se diseñó el experimento LITHOPANSPERMIA (2007) [18] cuyo principal objetivo fue el de investigar y profundizar en el conocimiento de los mecanismos de resistencia de comunidades microbianas y líquénicas a las condiciones espaciales. En esta ocasión, y dados los buenos resultados obtenidos en la anterior misión, el soporte de exposición o *hardware* (Fig. 2.2b) fue de mayor tamaño, permitiendo la exposición simultánea de un mayor número de muestras (36 en total), de nuevo en dos niveles: uno superior expuesto a todos los parámetros presentes en LEO y un nivel inferior que actuó como control de vuelo no expuesto a la radiación UV. Gracias a la utilización de distintos filtros ópticos de paso largo (*long-pass*), las muestras ubicadas en el nivel superior estuvieron expuestas a las siguientes longitudes de onda del espectro electromagnético extraterrestre:  $\lambda > 110, 200, 290$  y  $400$  nm.

En el experimento LITHOPANSPERMIA, aparte de las dos especies de líquenes estudiadas en el experimento anterior (*R. geographicum* y *X. elegans*), se evaluó la capacidad de supervivencia de una nueva especie de líquen, la otrora *Aspicilia fruticulosa* y actualmente renombrada como *Circinaria gyrosa* [88], además de algunas especies de microorganismos. La duración de la exposición fue de un total de 10 días durante los cuales los líquenes y comunidades de microorganismos estuvieron expuestos a condiciones similares a las del experimento anterior en el interior del dispositivo BIOPAN-6 (Fig. 2.2c) a bordo de la cápsula rusa FOTON M3 (Fig. 2.2d) [18].

Una completa batería de análisis post-vuelo fue llevada a cabo para analizar los efectos de la exposición a condiciones espaciales y el grado de supervivencia de las muestras de líquenes y bacterias después del experimento. Se utilizaron las siguientes técnicas: medidas de actividad del PSII para estudiar la actividad fotosintética y el estado del fotobionte, microscopía láser confocal (CSLM) combinada con tinción vital para obtener un índice de células vivas frente a células muertas, capacidad de germinación y/o crecimiento de las ascosporas tras la exposición espacial para evaluar el efecto del entorno espacial sobre las estructuras reproductivas de estos organismos, y estudios ultraestructurales para analizar los posibles daños producidos a nivel celular.

Centrándonos en los líquenes, los resultados de los análisis anteriormente enumerados revelaron una elevada tasa de supervivencia y un moderado nivel de daño al ser comparados con los datos de los controles que se quedaron en la Tierra [18]. En cuanto a la actividad del PSII, el análisis tras un período de 72 h de revitalización mostró altas tasas de recuperación en las muestras intactas expuestas al espectro solar completo ( $\lambda > 110$  nm, *R. geographicum* 94,5%, *X. elegans* 91,4% y *C. gyrosa* 99,5%) con ligeras variaciones entre las especies analizadas. Las pruebas de tinción vital se realizaron sobre *R. geographicum* y *X. elegans* y mostraron peores valores de viabilidad en aquellas muestras expuestas al espectro UV más amplio  $\lambda > 110$  nm ( $52,3 \pm 9,9\%$  y  $69,6 \pm 5,7\%$  respectivamente) en comparación con las muestras control del nivel inferior ( $78,7 \pm 8,8\%$  y  $82,4 \pm 6,2\%$  respectivamente), produciéndose en todas las muestras analizadas una reducción del índice de viabilidad. Los análisis de germinación revelaron que la capacidad germinativa de las ascosporas de las especies de líquenes *R. geographicum* y *X. elegans* (no se han encontrado esporas en *C. gyrosa*, cuya forma de reproducción preferente es asexual a partir de fragmentos del talo) se vio poco afectada, mostrando índices de germinación de 81-100% y 75-90% respectivamente tras

un período de 1-3 días de incubación, siendo las expuestas al total del espectro electromagnético solar ( $\lambda > 110$  nm) las que presentaron índices más bajos. Los estudios ultraestructurales realizados sobre ejemplares de *C. gyrosa* expuestos a la radiación solar sin filtrar ( $\lambda > 110$  nm) mostraron una integridad total tanto de las células algales como de las hifas fúngicas. Las comunidades microbianas de cianobacterias sometidas antes del vuelo a la simulación espacial con resultados positivos, mostraron una resistencia mucho menor en el espacio frente a las distintas muestras de líquenes analizadas. Por último, Sancho et al. [78] realizaron análisis de intercambio gaseoso sobre muestras de *C. gyrosa* incluidas en el experimento LITHOPANSPERMIA. Estos estudios revelaron valores normales de respiración y fotosíntesis.

Más adelante, Raggio et al. [69] llevaron a cabo un estudio pormenorizado ampliando los análisis realizados hasta ese momento sobre las muestras de *C. gyrosa* expuestas durante el experimento LITHOPANSPERMIA. El objetivo era obtener una visión global sobre la capacidad de supervivencia de este líquen ya que había mostrado los mejores resultados entre los líquenes analizados. Se realizaron nuevas medidas de fluorescencia de clorofila *a* para evaluar el rendimiento fotosintético del fotobionte. También se llevaron a cabo medidas de asimilación de CO<sub>2</sub> en respuesta a la luz para analizar el estado de las células algales, así como se midió también la respiración oscura para evaluar el estado fisiológico del micobionte tras la exposición a condiciones espaciales. Para completar el estudio se realizaron medidas de microscopía de dos tipos: por un lado microscopía electrónica de barrido a baja temperatura (LTSEM) para evaluar el estado estructural de las muestras y por otro se tomaron imágenes de microscopía electrónica de transmisión para analizar la integridad de las células de ambos simbioses.

Los resultados de rendimiento fotosintético mostraron que tras un período de revitalización de 72 h, todas las muestras recuperaban los valores previos al vuelo, incluida aquella expuesta al espectro completo de radiación solar extraterrestre ( $\lambda > 110$  nm) que mostró el valor  $Fv/Fm$  más bajo al inicio del período de revitalización de entre las que habían sido expuestas a distintas longitudes de onda UV mediante la utilización de los filtros ópticos previamente descritos [69]. Las medidas de intercambio de CO<sub>2</sub> revelaron que todas las muestras seguían siendo sensibles a la luz mientras sus talos estaban húmedos (y por lo tanto fisiológicamente activos), fotosintetizando a un ritmo normal (mostrando un valor de fotosíntesis neta media de  $1,4 \pm 0,2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg} / \text{dw s}$ ). Todas las muestras mostraron similares valores de actividad metabólica, tanto en términos de fotosíntesis neta (fotobionte) como de respiración oscura (micobionte) [69]. Por último, los análisis de microscopía mostraron algunas diferencias entre las muestras expuestas a condiciones espaciales y los controles. Por un lado, las muestras que actuaron como controles de vuelo y que no fueron expuestas a la radiación UV presentaron más pirenoglóbulos que los controles *Tierra*, así como se cree que la existencia de cuerpos densos en las vacuolas citoplasmáticas y entre los tilacoides indicaba estrés o algún tipo de daño. Las muestras expuestas a radiación solar mostraron como aspectos destacables: pirenoides con una matriz densa y numerosas membranas tilacoidales, estructuras lipídicas membranosas y vacuolas citoplasmáticas vacías o con cuerpos densos (indicador de estrés). En las células del micobionte se detectó una falta de cuerpos concéntricos con mitocondrias en aparente buen estado. Las vacuolas presentaban depósitos electrodensos. Se estimó que los cambios ultraestructurales observados eran reversibles o, al menos, no suficientemente graves como para afectar el metabolismo general del líquen [69].

Los resultados obtenidos tras el experimento LITHOPANSPERMIA en su conjunto apoyaron los obtenidos en el experimento LICHENS y confirmaron la extraordinaria capacidad de resistencia, tanto de las especies de líquenes anteriormente estudiadas *R. geographicum* y *X. elegans*, como de *C. gyrosa*, interpretándose en líneas generales que los líquenes estudiados pueden sobrevivir durante cortos períodos de tiempo en el espacio.

### 2.2.3. Experimento STONE

En el mismo satélite y de forma paralela al experimento LITHOPANSPERMIA, se llevó a cabo el experimento STONE (2007) [18], que consistió en analizar la viabilidad de la fase 3 (reentrada a la atmósfera) de la hipótesis de la Litopanspermia. Se pretendía simular la entrada de un meteorito en la atmósfera terrestre, para evaluar el potencial de supervivencia de los organismos en él incluidos e identificar las modificaciones físicas, químicas y biológicas causadas por la entrada atmosférica del meteorito.

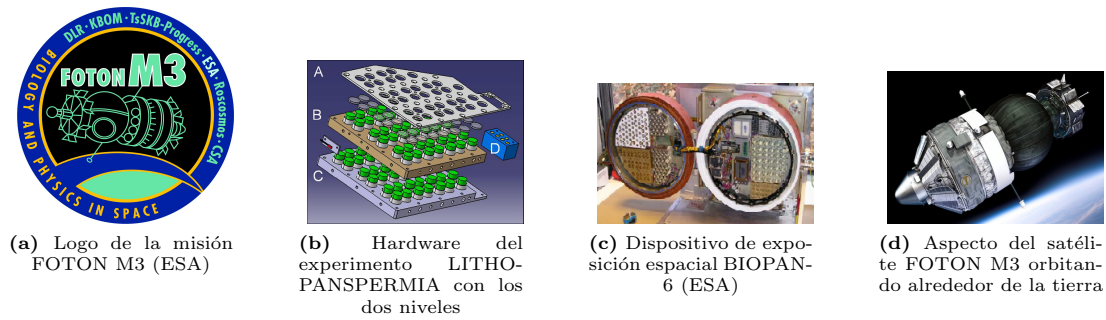


Figura 2.2: Distintos aspectos del experimento LITHOPANSPERMIA

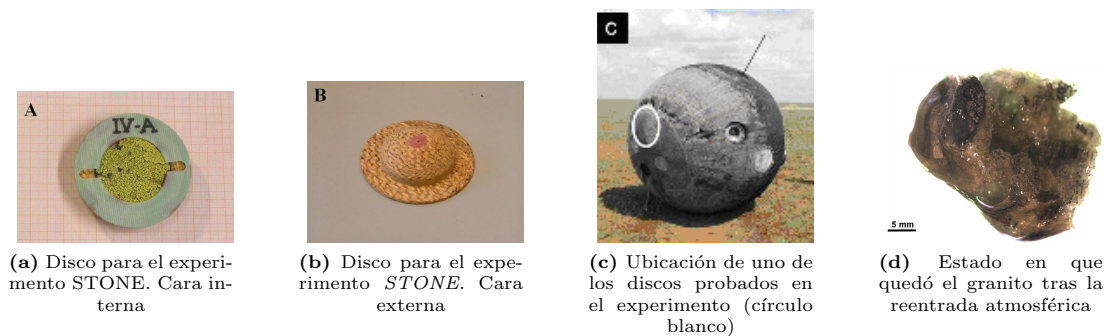


Figura 2.3: Distintos aspectos del experimento STONE

Para ello, se diseñó un disco de 2 cm de grosor total (Figs. 2.3a y 2.3b) que fue ubicado en la parte exterior del escudo térmico de la cápsula de reentrada del satélite FOTON M3 (Fig. 2.3c). Estos discos contenían una muestra de 4 mm de grosor y 45 mm de diámetro del líquen epilítico *R. geographicum* orientado hacia el interior del satélite, ubicado sobre la roca granítica en la que se desarrolla. Por debajo del mismo existía un espacio de separación, y por último en la zona más exterior se encontraba una capa de *textolite* diseñada para proteger las muestras frente a la fricción y temperaturas extremas a alcanzar durante la reentrada.

El satélite entró en la atmósfera a una velocidad media de 7 km/s. Tras recuperarlo, se realizaron análisis para comprobar las características texturales, mineralógicas y geoquímicas de las rocas graníticas enviadas. Se comprobó que se habían alcanzado temperaturas lo suficientemente altas como para fundir el silicio y el basalto, convirtiendo el granito de las muestras en un material vítreo homogéneo con diversas estrías de fricción. Ninguna de las muestras líquénicas sobrevivió el proceso de reentrada, dándose como explicación que o bien los 2 cm del disco no eran suficientes como escudo térmico, o que los gases calientes emitidos durante la ablación habían penetrado en el hueco existente entre la muestra y el portamuestras conduciendo a un calentamiento local intenso. Este hecho se confirmó al detectarse fundición superficial de la cara no expuesta durante la reentrada [18].

#### 2.2.4. Experimento LIFE

Hasta la fecha, el experimento LIFE (**L**ichens and **F**ungi **E**xperiment) ha constituido el estudio de resistencia más largo para evaluar la plausibilidad de la hipótesis de la Litopanspermia (explicada en la introducción, apartado 1.2.1) [66]. En él, las especies de líquenes epilíticos *R. geographicum* y *X. elegans*, junto con comunidades microbianas criptoendolíticas estuvieron expuestas a las hostiles condiciones presentes en LEO gracias la plataforma de exposición EXPOSE-E (Fig. 2.4c) de la ESA, en la parte externa del laboratorio Columbus (Fig. 2.4d) de la Estación Espacial Internacional (ISS) durante un período de un año y medio aproximadamente.

La plataforma EXPOSE-E (Fig. 2.4c) es, sin tener ningún parecido en cuanto a dimensiones y morfología, un dispositivo de exposición similar a BIOPAN. Se trata de una plataforma diseñada

para permitir la exposición de muestras biológicas y/o de materiales a las condiciones del espacio con fines científicos. Formaba parte de un conglomerado mayor: la “Instalación Europea de Exposición Tecnológica” (European Technology Exposure Facility, EuTEF) que se fijó en el exterior del laboratorio Columbus. En EXPOSE-E existían distintas posibilidades para alojar muestras biológicas y de materiales mientras se efectuaba una monitorización continua de la temperatura, radiación y presión en LEO. Gracias a la existencia de diversos mecanismos tales como obturadores, persianas, filtros, ventanas, sellos, válvulas y conectores era posible crear ambientes controlados dentro de las celdas persianas, dándole a la plataforma una versatilidad muy alta, con capacidad de control sobre determinados parámetros como la atmósfera y/o la temperatura.

El experimento LIFE fue lanzado a la ISS el 7 de Febrero de 2008 como parte de la misión STS-122 (Fig. 2.4a) a bordo del transbordador Atlantis. Dos semanas más tarde, durante un paseo espacial los astronautas fijaron en el exterior del laboratorio Columbus todo el conjunto integrado en EuTEF (nueve experimentos). Tras comprobar que todo funcionaba correctamente, se activaron de forma remota las “ventanas” y válvulas para exponer las muestras a los parámetros presentes en LEO: vacío espacial de  $10^{-7}$  a  $10^{-4}$  Pa, radiación cósmica y galáctica ( $\leq 190$  mGy), fluctuaciones de temperatura ( $-21,5$  a  $+59,6$  °C) y el espectro solar completo de radiación electromagnética ( $\lambda > 110$ nm) con intensidades que oscilaban entre un  $9,19 \times 10^5$  Jm $^{-2}$  (bajo filtros de MgF $_2$  que sólo permitían la transmisión del 0,1 % de la radiación electromagnética espacial) y  $6,34 \times 10^8$  Jm $^{-2}$  (muestras cubiertas con filtros que permitían pasar el 100 % de radiación UV).

El experimento fue expuesto a estas condiciones de forma ininterrumpida durante 565 días (más de 18 meses). Una vez transcurrido ese tiempo, las ventanas y válvulas fueron cerradas y selladas, y el experimento LIFE volvió a la Tierra el 12 de Septiembre de 2009 durante la misión STS-128. En las instalaciones del DLR de Colonia se abrieron los contenedores (Fig. 2.4b) en atmósfera inerte de Nitrógeno y las muestras correspondientes a cada coinvestigador fueron seleccionadas y enviadas para la realización de los análisis post-exposición oportunos.

Para evaluar el estado fisiológico de las muestras líquénicas tras la exposición a las condiciones previamente indicadas, se determinó la actividad del PSII de los fotobiontes de *R. geographicum* y *X. elegans*. Ésta última especie también fue sometida a ensayos de tinción vital con el kit “FUN 1 LIVE/DEAD”, analizados mediante CLSM para determinar la integridad de las membranas. El rendimiento fotosintético se vió reducido hasta un 0,5 % y un 45 % respectivamente [66]. Por contra, en las muestras protegidas de la insolación extraterrestre pero expuestas al resto de parámetros, el líquen *X. elegans* destacó con una actividad del PSII del 99 % mientras que las de *R. geographicum* seguían estando afectadas con una actividad de su PSII próxima al 2.5 %. En línea con el resultado anterior, la tinción vital de las células fúngicas del micobionte de *X. elegans* mostró resultados positivos de vitalidad.

Aunque el período de un año y medio analizado no es comparable con los lapsos de miles o millones de años que se consideran necesarios para el transporte interplanetario según la hipótesis de la Litopanspermia, este experimento supone el primer estudio del efecto de las condiciones espaciales a largo plazo y con condiciones reales sobre organismos con interés en astrobiología. En este caso se demostró una resistencia superior de *X. elegans* frente a *R. geographicum*. Todos los organismos incluidos en el experimento LIFE eran poiquilohídricos, lo que fue propuesto como causa principal de la resistencia detectada.

### 2.2.5. Experimento BIOMEX

El experimento BIOMEX ha sido recientemente diseñado y tiene como objetivo fundamental el analizar la estabilidad, degradación y supervivencia de las biomoléculas (pigmentos, metabolitos secundarios) y organismos (archaea, bacterias férricas, cianobacterias, algas, hongos, **líquenes** y briófitos) expuestos a condiciones espaciales reales y simuladas de Marte, en contacto con distintos minerales. De esta forma será posible, además de determinar los efectos del ambiente espacial y marciano sobre las muestras; la definición de biomarcadores. Esto dará pie a la creación de una base de datos de los mismos relevante para futuras misiones de búsqueda de vida en el entorno extraterrestre. Por último será posible analizar la plausibilidad de la hipótesis de la Litopanspermia con nuevos organismos durante un período similar al empleado en el experimento LIFE [21].

En Julio de 2014 está programado el lanzamiento de este experimento que implicará una nueva exposición espacial de líquenes. Entre otros organismos, se incluirán las especies de líquenes extre-

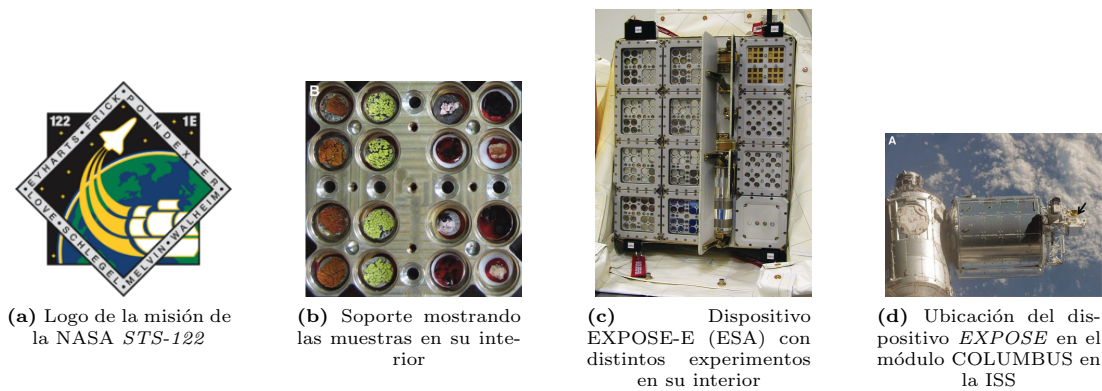


Figura 2.4: Distintos aspectos del experimento LIFE

motolerantes *C. gyrosa* y *B. frigida*. El experimento será integrado en el dispositivo EXPOSE-R2 del complejo *Zvezda* e instalado en la parte rusa de la ISS durante un período de 18 meses. La mitad de las muestras serán expuestas a condiciones de Marte (atmósfera, presión, radiación UV y temperatura) mientras están en contacto con regolitos que simulen el sustrato marciano, y la otra mitad a condiciones LEO y en contacto con un análogo lunar y con su sustrato terrestre original [21].

### 2.3. Experimentos de impacto a hipervelocidad y de simulación planetaria

Como ya se ha explicado, la investigación en astrobiología tiene entre sus objetivos el estudio de la posible existencia de vida (presente o pasada) en otras zonas del Universo distintas de la Tierra. Una de las múltiples aproximaciones teóricas a este objetivo consiste en estudiar la viabilidad de organismos terrestres tras enfrentarse a las condiciones ambientales presentes en otros planetas o a fenómenos de transferencia de vida entre planetas, tal y como postula la hipótesis de la Litopanspermia.

En ese sentido, los experimentos de impacto a hipervelocidad y de simulación planetaria suponen la alternativa viable desde el punto de vista técnico y económico a la experimentación *in situ* en otros planetas o de fenómenos que por su magnitud o naturaleza han de ser reproducidos a escala de laboratorio para poder ser estudiados. El concepto básico es simular las características previamente conocidas del ambiente o fenómeno que nos interesa estudiar y analizar con distintas pruebas sus efectos sobre la muestra de estudio (ser vivo, material, dispositivo etc). Suponen una herramienta tremendamente útil a la hora de diseñar experimentos espaciales, permitiendo obtener resultados preliminares y optimizar costes.

Parte de la investigación sobre la posibilidad de supervivencia de seres vivos en un planeta fuera de la Tierra dentro de la hipótesis de la Litopanspermia se centra en el estudio de la viabilidad de la primera fase de la misma, ésto es, la eyección por impacto de organismos vivos desde el planeta inicial. En esa línea Stöffler et al. [89] y Horneck et al. [48] realizaron una batería de experimentos de recuperación tras impactos producidos en un rango de presiones observado en meteoritos marcianos (5 - 50 Gpa) para evaluar la recuperación tras impactos a hipervelocidad en organismos extremófilos (y/o sus estructuras reproductoras) tales como la bacteria *Bacillus subtilis*, la cianobacteria *Chroococidiopsis* y el líquen *Xanthoria elegans*. Los resultados confirmaron eyecciones de impacto viables en planetas similares a Marte, y abren la posibilidad de una hipotética “resiembr” de la Tierra primigenia tras impactos asteroidales cataclísmicos.

Por otro lado, para evaluar la influencia de los ambientes planetarios sobre muestras biológicas se han desarrollado dispositivos conocidos como “cámaras de simulación”, que reproducen los parámetros ambientales de distintos cuerpos planetarios [52] y [59]. A día de hoy existen numerosas cámaras de estas características repartidas por instituciones científicas de todo el mundo.

TIPO DE SIMULACIÓN	LIQUEN	DISPOSITIVO SIMULACIÓN	DURACIÓN	PARÁMETROS SIMULACIÓN	ENSAYOS DE VIABILIDAD	REFERENCIA
Impactos a hipervelocidad	<i>X. elegans</i>	EMI Friburgo (experimento to "Shock recovery")	< 1 min	5, 10, 15, 20, 30, 41.5 y 50 GPa	tinción vital (Fuml, Sytox Green)	Stöffler et al. 2007 [89]; Horneck et al. 2008 [48]
Marciana	<i>X. elegans</i>	"Humidity lab", DLR Berlin	22 d (1), 1 d (2-4)	(1) atmósfera marciana (95 % CO <sub>2</sub> , 6 mbar, 100 % HR, -55/+20 °C) (2) atmósfera marciana (95 % CO <sub>2</sub> , 6 mbar, 100 % HR, +15 °C), (3) atmósfera marciana (95 % CO <sub>2</sub> , 6 mbar, 100 % HR, ±5 °C), (4) atmósfera terrestre (100 % HR, +15 °C)	actividad PSII, tinción vital (Fuml)	de Vera et al. 2007 [25]; de Vera et al. 2010a [23]
Marciana	<i>P. chlorophanum</i>	cámara simulación marciana, DLR Berlin	35 d	radiación marciana (200-2500 nm, 2,7 x 10 <sup>2</sup> -6.3 x 10 <sup>3</sup> kJ/m <sup>2</sup> ), atmósfera marciana (95 % CO <sub>2</sub> , 6 mbar, 0-80 % HR, -49/+25 °C)	actividad PSII	de Vera et al. 2012 [20]
Marciana	<i>C. gyrosa</i>	PASC CAB, INTA-CSIC Madrid	120 h	(1) radiación UV marciana (200-400 nm, 30 mW/cm <sup>2</sup> ) a -93 °C, (2) atmósfera marciana (95 % CO <sub>2</sub> , 7 mbar, 0,6 % H <sub>2</sub> O) y radiación UV marciana (200-400 nm, 30 mW/cm <sup>2</sup> ) a -93 °C, (3) radiación UV marciana (200-400 nm, 30 mW/cm <sup>2</sup> ) y vacío (10 <sup>-6</sup> bar) a -93 °C	actividad PSII, intercambio gaseoso	Sánchez et al. 2012 [74]

**Tabla 2.3:** Experimentos de simulación marciana y de impactos a hipervelocidad realizados con líquenes hasta la fecha

Traducido y modificado de Meeßen, J.; Sánchez, F. J.; Brandt, A.; Balzer, E.-M.; de la Torre, R.; Sancho, L. G<sup>a</sup>; de Vera, J.-P.; Ott, S. (2013). **Extremotolerance and resistance towards space conditions in lichens: Comparative studies on five species used in astrobiological research I. Morphological and anatomical characteristics.** [62]

Actualmente uno de los planetas estudiados con más interés por parte de la comunidad científica interesada en espacio y en astrobiología es Marte. El interés en este planeta está basado en varios motivos:

1. A pesar de que en la actualidad no existe constancia de que exista vida, sí se debate la posibilidad de que existiese en el pasado, cuando las condiciones eran tales que permitían la existencia de agua líquida en la superficie [50].
2. Su proximidad relativa a nuestro planeta, ha favorecido que desde los años 60 se venga recopilando información a través del envío de misiones a su órbita o superficie por parte de las principales agencias espaciales del mundo. Gracias a las sondas *Viking*, desde los años 70 contamos con una gran cantidad de información sobre los parámetros ambientales presentes en la superficie de Marte. Las condiciones prevalentes pueden resumirse en altas dosis de radiación en el espectro ultravioleta (200-400 nm), baja temperatura media ( $-63, 15^{\circ}\text{C}$ ) con ciclos entre  $-123^{\circ}\text{C}$  y  $7^{\circ}\text{C}$ , y una presión atmosférica media de 7 mbar con las siguientes concentraciones parciales de gases: 95 %  $\text{CO}_2$ , 2,7 %  $\text{N}_2$ , 1,6 % Ar y 0,6 % de  $\text{H}_2\text{O}$  [59].
3. Existe un gran interés desde el campo de la “protección planetaria” sobre el efecto de los parámetros marcianos sobre microorganismos extremófilos, para evaluar y, en su caso mitigar, el riesgo de una posible contaminación llevada desde la Tierra durante las próximas misiones a Marte que pudiera interferir en el futuro con los experimentos de búsqueda de vida en ese planeta [84].

Desde una perspectiva eminentemente astrobiológica, los experimentos de simulación marciana han evolucionado mucho en su diseño desde el año 1965, en que tuvo lugar el primer experimento con microorganismos bajo estas condiciones [95]. El conocimiento sobre las condiciones presentes en el planeta, las cámaras y las propias técnicas se han ido perfeccionando mucho [52], desde simples recipientes anaerobios hasta las actuales cámaras de simulación que pueden imitar casi por completo las condiciones del planeta rojo. Gracias al elevado número de cámaras existentes, su versatilidad y fácil manejo, en la actualidad existen numerosos estudios ([6], [31], [87], [42], [29], [90], [64], [65] y [5]) de este tipo.

El objetivo de estos estudios fue investigar la capacidad de supervivencia y, en su caso, el grado de adaptación de distintos organismos extremófilos y extremotolerantes a las condiciones ambientales de la superficie del planeta Marte. Concretamente, en estos ensayos se puede analizar la influencia de:

- Parámetros aislados de la superficie de Marte: temperatura, radiación, baja presión, atmósfera...
- Combinación de varios parámetros ambientales presentes de la superficie marciana.
- Combinación de la totalidad de condiciones termofísicas presentes en de la superficie de Marte.

Los resultados positivos obtenidos en los experimentos LICHENS I y II, LITHOPANSPERMIA y LIFE en cuanto a supervivencia a condiciones espaciales hizo que las expectativas de la investigación astrobiológica con estos organismos aumentara mucho. Ésto unido al hecho de que actualmente las cámaras de simulación planetaria son herramientas fiables para simular los parámetros ambientales presentes en otros planetas, supuso la motivación fundamental para que los investigadores realizasen un ensayo de simulación de impacto a hipervelocidad y los experimentos de simulación marciana con líquenes hasta la fecha. Los detalles de estos experimentos están recogidos en la tabla 2.3 y sus objetivos se resumen a continuación:

- Un único intento para evaluar la plausibilidad de la fase I de la hipótesis de la Litopanspermia [48] (eyección desde el planeta de origen por un impacto) con el líquen *X. elegans*
- Distintas simulaciones para analizar la influencia de las condiciones ambientales presentes en la superficie de Marte sobre la vitalidad de distintas especies de líquenes. En esta línea y de forma complementaria a los experimentos de vuelo en órbita baja terrestre, hasta la

fecha se han realizado dos estudios investigando el impacto de la combinación de parámetros ambientales presentes en la superficie de Marte sobre líquenes extremófilos mediante cámaras de simulación [23], [74].

Los análisis realizados tras estos tests de simulación han revelado en todos los casos que la vitalidad analizada fue similar a la medida previamente a la simulación, mostrando las especies de líquenes estudiadas una alta resistencia a las distintas combinaciones de condiciones simuladas.

## 2.4. Mecanismos de resistencia propuestos

En cuanto a los mecanismos de resistencia implicados en el alto grado de supervivencia de los líquenes en el espacio y en los ambientes simulados de otros planetas, se han propuesto numerosas hipótesis aunque todavía no se ha llegado a establecer de forma clara qué propiedad o propiedades son las responsables de tan altos niveles de resistencia. Las hipótesis propuestas hasta la fecha son:

1. **Poiquilohidria:** Propiedad fisiológica de los líquenes por la cual no pueden regular su contenido interno en agua, dependiendo estrictamente de las condiciones de humedad ambientales. Al encontrarse en condiciones adversas, los líquenes pueden llegar a perder hasta un 97 % de su contenido en agua, entrando en un estado metabólicamente inactivo de latencia reversible, caracterizado por ser extremadamente resistente [54].
2. **Córtex superior:** Conglomerado de hifas agrupadas de forma muy compacta de tal manera que suponen una barrera física para evitar la penetración de la radiación UV en el interior del talo [37].
3. **Metabolitos secundarios:** Se trata de sustancias sintetizadas por el organismo que no tienen un papel fisiológico principal y que por lo tanto no son imprescindibles para la supervivencia del mismo. Entre estos compuestos se encuentran sustancias pigmentadas que actúan de filtro frente a la radiación UV, protegiendo al talo de este agente deletéreo. Por ejemplo la parietina, los carotenoides o el ácido úsnico [93].
4. **Matriz gelatinosa:** Formada por la unión de los dos simbiontes y que podría proteger del mismo modo que las matrices de los biofilms [60].
5. **Capacidad tamponadora de radicales de oxígeno:** Propiedad de algunos líquenes para mitigar los efectos deletéreos de los radicales libres de oxígeno producidos en tejidos y células como efecto de la radiación UV [55].



## Capítulo 3

# Objetivos a corto, medio y largo plazo identificados a partir de los antecedentes consultados

Los puntos que los expertos en la materia creen que deben ser considerados como prioritarios en la investigación futura en este campo, son entre otros, los siguientes:

- Estudiar el período durante el cual estos organismos mantienen su viabilidad en el ambiente interplanetario (realización de estudios a largo plazo) [77].
- Desarrollo de métodos para la mejora del estudio de la vitalidad de estos especímenes. Incorporación de técnicas de biología molecular que complementen a los actuales sistemas de medida de fotosíntesis, intercambio de gases y ultraestructura [78].
- Analizar la resistencia de las especies estudiadas frente a los ambientes simulados de otros sistemas planetarios [16].
- Profundizar en la investigación de la respuesta de comunidades biológicas colonizadoras de rocas frente a condiciones espaciales, para aumentar el conocimiento y evaluar las posibilidades de la hipótesis de la Litopanspermia [17].
- Establecer bio- y geomarcadores a través del estudio de los espectros Raman de líquenes antes y después de estar sometidos a las condiciones simuladas de Marte. De esta manera será posible tener un conocimiento detallado sobre las estrategias de adaptación de estos organismos al ambiente marciano para los experimentos de búsqueda de actividad biológica presente o pasada en la superficie de ese planeta [53].
- Estudiar el grado de autonomía de los sistemas simbioses en cuanto a la posibilidad de supervivencia en un ambiente con bajas concentraciones de oxígeno mediante el reciclaje continuo a través del bionte heterotrófico del  $O_2$  producido durante la fotosíntesis [78].
- Analizar la influencia de análogos del regolito marciano sobre la viabilidad de organismos resistentes bajo las condiciones ambientales de Marte, en especial la radiación UV [72].
- Estudiar la viabilidad de las distintas fases de la hipótesis de la Litopanspermia. Posibilidad de la entrada de propágulos líquénicos en otros planetas como polvo espacial (sin procesos de fricción durante la reentrada) [78].
- Desarrollar nuevos diseños experimentales para maximizar la utilización de líquenes desde una perspectiva astrobiológica [78].



**Parte III**

**Investigación realizada**



# Capítulo 4

## Hipótesis y objetivos

### 4.1. Hipótesis de trabajo

En el caso de la investigación astrobiológica con organismos extremófilos en general y con líquenes en particular, la hipótesis general que proponía la resistencia de estos organismos a cortos períodos bajo condiciones LEO (teniendo en cuenta su adaptación a los ambientes extremos en los que naturalmente se desarrollan), fue debidamente validada tras los experimentos descritos en el capítulo 2. Como ya se ha explicado, la demostración experimental de esta hipótesis abrió una prometedora nueva línea de investigación en astrobiología.

Como continuación de esa nueva línea de estudio, los trabajos de investigación que componen la presente tesis doctoral fueron propuestos con el objetivo de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de resistencia y tolerancia de las especies de líquenes extremotolerantes de la península Ibérica *Circinaria gyrosa* y *Rhizocarpon geographicum* a condiciones extremas concretas en relación con el ambiente espacial y marciano.

Para ello, las hipótesis propuestas fueron:

#### 4.1.1. Hipótesis inicial publicación I

Resistencia del líquen *C. gyrosa* a condiciones ambientales de Marte. Esta predicción estuvo basada en los buenos resultados obtenidos tras el experimento LITHOPANSPERMIA.

- Unidad de observación: Talos intactos de *C. gyrosa*.
- Variables: 1) Atmósfera (7 mbar CO<sub>2</sub>) y temperatura (-93 °C) marcianas, 2) Atmósfera (7 mbar CO<sub>2</sub>), temperatura (-93 °C) y radiación UV ( $\lambda = 200-400$  nm , pico en 254 nm) marcianas y 3) Vacío espacial (10<sup>-6</sup> mbar), temperatura (-93 °C) y radiación UV ( $\lambda = 200-400$  nm , pico en 254 nm) marcianas.
- Métodos de verificación: actividad PSII, análisis de intercambio gaseoso.

#### 4.1.2. Hipótesis inicial publicación II

El estado de hidratación de los talos (secos-latentes o húmedos-fisiológicamente activos) y la presencia de estructuras protectoras (córtex/pigmentos fotoprotectores) influye en la resistencia/tolerancia de los líquenes *R. geographicum* y *C. gyrosa* a la radiación UV-C.

- Unidad de observación: Talos con o sin córtex en el caso de *R. geographicum* o con o sin pigmentos para *C. gyrosa*. En todos los casos fueron expuestos secos y húmedos.
- Variables: 23 dosis de radiación UV-C desde 2,5 x 10<sup>6</sup> J/m<sup>2</sup> hasta 7,2 x 10<sup>7</sup> J/m<sup>2</sup> ( $\lambda = 200-280$  nm, pico en 254 nm).
- Métodos de verificación: actividad PSII y producción de pigmentos.

### 4.1.3. Hipótesis inicial publicación III

El experimento LIFE (explicado en el artículo de **Onofri et al. 2012** y descrito en detalle en el apartado 2.2.4) estaba totalmente en línea con los experimentos espaciales previos desarrollados bajo condiciones LEO y tenía como hipótesis de partida la resistencia a condiciones espaciales demostrada en los experimentos LICHENS II y LITHOPANSPERMIA.

- En este caso, la variable de estudio más importante fue el tiempo de exposición, teniendo como meta el comprobar los niveles de tolerancia a una exposición mucho más larga que en las anteriores ocasiones.

### 4.1.4. Hipótesis inicial publicación IV

En el trabajo de **Meeßen et al. 2013** se asumía como hipótesis inicial que las características morfológicas y anatómicas que dan forma a los talos liquénicos son un factor clave de adaptación a los factores medioambientales dominantes en su entorno, influyendo en procesos fisiológicos claves para su supervivencia.

- En concreto, se trató de profundizar en las propiedades extremotolerantes de los líquenes enviados al espacio hasta la fecha (*Buellia frigida*, *Circinaria gyrosa*, *Rhizocarpon geographicum*, *Xanthoria elegans* y *Pleopsidium chlorophanum*) que están determinadas por caracteres anatómicos y morfológicos.
- En lo que a la presente tesis doctoral refiere, nos centraremos en las especies *Circinaria gyrosa* y *Rhizocarpon geographicum*.

## 4.2. Objetivos

Los objetivos de la investigación realizada estuvieron en línea con las hipótesis de partida reseñadas en el apartado anterior (4.1). La elección de los objetivos fue precisa y se centró en aquello que se consideraba más interesante y plausible.

### 4.2.1. Objetivos Publicación I

- Evaluar la capacidad de supervivencia de *Circinaria gyrosa* bajo distintas combinaciones de parámetros ambientales marcianos simulados.
- Investigar los límites y limitaciones de la tolerancia y resistencia a condiciones ambientales de la superficie de Marte de esta especie de líquen extremotolerante.
- Aumentar el conocimiento que actualmente se tiene acerca del impacto fisiológico de las condiciones marcianas sobre esta especie de líquen y obtener más información sobre sus mecanismos de resistencia.
- Confirmar los resultados de supervivencia obtenidos en el experimento LITHOPANSPERMIA (apartado 2.2.2) con *C. gyrosa* tras la exposición a condiciones LEO.
- Aportar nuevos datos experimentales acerca de la plausibilidad de la última fase de la hipótesis de la Litopanspermia (ver sección 1.2.1).

### 4.2.2. Objetivos Publicación II

- Evaluar la influencia de la radiación UV-C como agente de estrés único sobre *Trebouxia* sp., fotobionte de *R. geographicum* y *C. gyrosa*, mientras que se encuentra formando parte de la simbiosis liquénica.
- Confirmar el papel del estado metabólico del talo (activo o inactivo) en relación con la capacidad para evitar daños.

- Estudiar la función protectora del córtex (*R. geographicum*) o de los pigmentos (*C. gyrosa*) frente a la radiación UV-C.
- Aumentar la comprensión del papel específico que juega la resistencia a la radiación UV en la capacidad de resistencia global de la simbiosis líquénica.
- Discutir las posibles implicaciones astrobiológicas que tengan los resultados obtenidos.

#### 4.2.3. Objetivos Publicación III

- La investigación recogida en la publicación de **Onofri et al. 2012**, tenía como objetivo fundamental el investigar el impacto sobre distintas comunidades microbianas y líquénicas (eucariotas, algo nunca hecho hasta la fecha) de una exposición a largo plazo bajo condiciones LEO a bordo de la plataforma de exposición EXPOSE-E/EuTEF en el laboratorio COLUMBUS de la ISS. El objetivo primordial era aportar nuevos datos en el marco de la investigación sobre la plausibilidad de la hipótesis de la Litopanspermia.

#### 4.2.4. Objetivos Publicación IV

- **Meeßen et al. 2013** se marcaron como objetivo el estudiar en profundidad las características morfológicas y anatómicas de las cinco especies de líquenes utilizadas hasta la fecha en investigación astrobiológica por sus propiedades de resistencia y tolerancia a las duras condiciones de sus hábitats naturales: *Buellia frigida*, *Circinaria gyrosa*, *Rhizocarpon geographicum*, *Xanthoria elegans* y *Pleopsidium chlorophanum*.
- Más específicamente se investigó algún posible mecanismo de tolerancia a las condiciones espaciales relacionado con su morfología y anatomía.



# Capítulo 5

## Metodología

En este capítulo, y dado que en los apartados “Materiales y Métodos” de las publicaciones incluidas en la presente tesis doctoral está claramente explicada la metodología correspondiente, trataremos de dar una perspectiva general de los elementos comunes que se consideran más importantes para la investigación realizada. Éstos son las especies de líquenes extremotolerantes estudiadas, los tratamientos aplicados sobre estas especies y las técnicas analíticas empleadas para evaluar su estado fisiológico tras la aplicación de los tratamientos en cuestión.

### 5.1. Material biológico

#### 5.1.1. *Circinaria gyrosa*

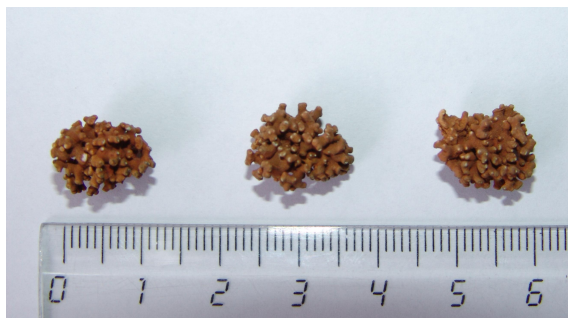
La selección de este líquen fruticuloso en las publicaciones que componen la presente tesis doctoral está relacionada con la elevada resistencia a condiciones espaciales y simuladas de Marte demostrada en los experimentos previamente detallados (secciones 2.1, 2.2 y 2.3). A su vez, esta especie fue elegida para ser incluida en el experimento espacial LITHOPANSPERMIA (apartado 2.2.2), debido a que estaba caracterizada como un buen ejemplo de adaptación morfológica a duras condiciones climáticas [76] y a que su pequeño tamaño permitía que se incluyesen, por primera vez, muestras completas en las celdas del soporte experimental [69]. Los resultados obtenidos tras el experimento LITHOPANSPERMIA sugirieron un elevado nivel de resistencia, que podía ser incluso más alto que el detectado para otras especies de líquenes extremotolerantes.

##### 5.1.1.1. Caracterización específica

La especie *C. gyrosa* está caracterizada por la morfología coraloide y esférica de sus representantes y por sus talos vagantes totalmente libres, que no están fijos al sustrato en ninguna fase de su ciclo biológico. Esta característica hace que se desplacen libremente, movidos por factores físicos como el viento, el agua de las lluvias e incluso por la acción de animales [12]. Sus talos son de color pardo claro, de consistencia compacta y pequeñas dimensiones, presentando un diámetro medio de 1,5 cm (Ver fig. 5.1). La clasificación taxonómica de esta especie ha sido objeto de revisión en los últimos años, habiendo sido renombrada recientemente desde el género *Aspicilia* e incluida en la familia *Megasporaceae* [88]. En publicaciones más antiguas es posible encontrar alusiones a éste y otros líquenes vagantes con el nombre genérico de *Sphaerothallia* [33], [12].

##### 5.1.1.2. Caracterización fisiológica, morfológica y anatómica

Fisiológicamente *C. gyrosa* ya era considerado en el pasado como un líquen adaptado a las condiciones de extrema aridez y bajas temperaturas de las zonas donde se desarrolla. En la actualidad está considerado como un organismo extremófilo, al tratarse de una especie que posee la capacidad de desarrollarse bajo condiciones físicas extremas. La elevada aridez de las zonas en que se desarrolla, está provocada tanto por la incapacidad de utilización del agua debido al estado congelado de ésta en invierno, como a la escasez de precipitaciones en verano. El hecho de que su estructura sea tan compacta tiene consecuencias en el rendimiento fotosintético del talo. La



**Figura 5.1:** Imagen de tres muestras (escala en cm)

Fuente: EP

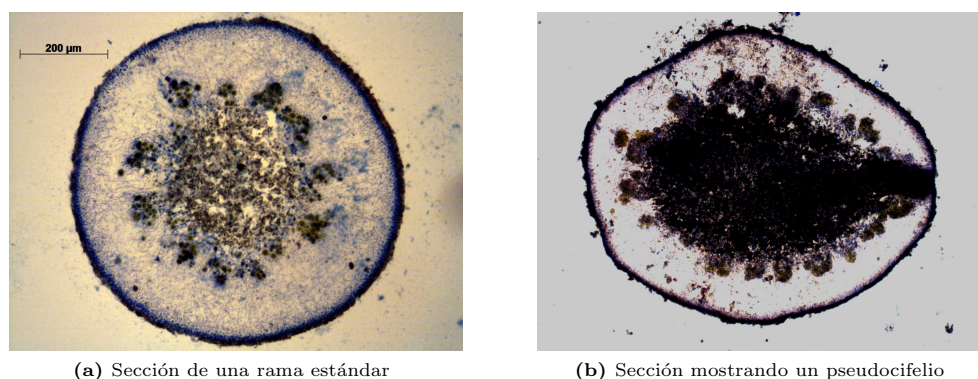
fotosíntesis neta tiene su máximo en torno al 60 % de contenido de agua [76]. La fase oscura de la respiración también está influida por el contenido en agua del talo, siendo máxima con el máximo contenido de agua y decreciendo a medida que el talo se va deshidratando. Se ha visto que estos dos hechos van unidos: el descenso de la fotosíntesis neta asociado a un mayor contenido de agua está provocado por el aumento de las tasas de respiración que tiene lugar en estas situaciones. Desde el punto de vista reproductivo, la propagación de esta especie se produce de forma asexual a partir de fragmentos talinos [33].

Desde un punto de vista morfológico, los ejemplares de *C. gyrosa* desarrollan talos coraloides (forma esférica fruticosa) con una estructura interna muy compacta resultado de la aglutinación de hifas con una gruesa pared (Ver fig. 5.2a). Esta estructura tan compacta proporciona al talo una elevada densidad en comparación con otros líquenes fruticulosos. En la parte final de las “ramas” más exteriores aparecen regiones blancas más o menos circulares, que reciben el nombre de pseudocifelios y que facilitan el intercambio gaseoso entre el interior del líquen y la atmósfera [74]. Se trata de zonas en las que no existe capa cortical y la médula se expone directamente a la atmósfera (Ver fig. 5.2b) [76]. En cuanto a su superficie de color pardo, se ha analizado en busca de metabolitos secundarios sin éxito [69].

Teniendo en cuenta su anatomía, el trabajo realizado por Meeßen et al. [62] incluido en la presente tesis, realiza un análisis comparativo de esta especie con otros líquenes extremófilos y/o extremotolerantes, confirmando los resultados obtenidos en estudios previos [76] y [56] y revelando rasgos que pueden ayudar a entender la alta resistencia de este líquen, demostrada tras los experimentos espaciales y de simulación explicados anteriormente. Existe una estratificación muy marcada de la parte externa a la interna (Ver fig. 5.2). Por debajo de una fina capa marrón de hifas muertas aparece un córtex pigmentado y paraplectenquimático formado por hifas isodiamétricas agrupadas de forma compacta. A continuación se encuentra un subcórtex muy pronunciado con un mayor nivel de compactación, en parte gracias a la presencia de una alta concentración de mucílago extracelular. Las células algales se distribuyen en núcleos globulares que se encuentran ubicados en las zonas inferiores del subcórtex, generalmente próximos a los espacios pseudocifelares llenos de aire [76]. Por último, en la parte central encontramos la médula, constituida por hifas del hongo que forman un conglomerado laxo y poco compacto con presencia de abundantes espacios aéreos, que se conectan a la atmósfera a través de los pseudocifelios. En especies del mismo género se han detectado variaciones morfológicas estrictamente relacionadas con cambios microambientales [56], tales como diversidad de sustratos, cambios en temperatura, intensidad lumínica o disponibilidad de agua.

### 5.1.1.3. Caracterización geográfica

A nivel mundial, esta especie se extiende desde las estepas y semidesiertos centroasiáticos a los norteafricanos, estando el centro de dispersión ubicado probablemente en territorio Iraní. En España, esta especie de líquenes vagantes se ha descrito en páramos y áreas pseudoesteparias de zonas más o menos continentales [33], a una altura comprendida entre los 1200 y los 1400 m [12]. Las condiciones climáticas presentes en las zonas donde se hallan los talos de esta especie se corresponden con un clima mediterráneo extremo, caracterizado por grandes contrastes de temperatura



**Figura 5.2:** Representación gráfica de dos secciones transversales de *C. gyrosa*

Fuente: EP-HHU

estacionales, con veranos extremadamente calurosos y secos, y una elevada frecuencia de heladas acompañada de una alta insolación y escasez de lluvias durante el invierno. Estas características hacen que durante los duros inviernos de estas zonas se produzca el fenómeno de la crioturbación del suelo. Éste consiste en un ciclo de congelación y descongelación diario del agua intersticial del suelo, que comienza con la congelación del agua en varios centímetros de profundidad durante la noche, aumentándose el volumen de la zona afectada al formarse los cristales de hielo, situación que se revierte durante el día al producirse la fundición del hielo debido fundamentalmente a la insolación solar, fenómeno que provoca una disminución del volumen del sustrato. Esta alteración cíclica hace que el medio sea extremadamente inhóspito, restringiendo la habitabilidad de esta zona de forma casi exclusiva a los líquenes vagantes [12]. Estas comunidades suelen encontrarse en los espacios abiertos entre la vegetación superior circundante, en la que abundan poblaciones de *Juniperus thurifera* y *Quercus* sp. fundamentalmente, necesitando cierta horizontalidad del sustrato para establecerse (Ver fig. 5.3). Desde un punto de vista geológico, la estructura del sustrato es de tipo arcilloso con composición carbonácea, siendo la caliza la roca madre característica de estas zonas [76]. En nuestro caso recogimos las muestras en la provincia de Guadalajara (España), en las parameras esteparias próximas a la localidad de Zaorejas ( $40^{\circ}45'40''$  N,  $02^{\circ}12'08''$  E), aproximadamente a 1260 m de altitud.



**Figura 5.3:** Imagen de la zona de recogida de *C. gyrosa* (Zaorejas)

Fuente: EP

### 5.1.2. *Rhizocarpon geographicum*

Al igual que en el caso anterior, la utilización de esta especie de líquen crustáceo en la presente tesis doctoral viene justificada por el hecho de que ha sido estudiada en los experimentos espaciales

LICHENS I y II, LITHOPANSPERMIA Y LIFE. En éstos ha demostrado propiedades de tolerancia muy elevadas a exposiciones cortas en LEO, que hacen necesario profundizar más en el conocimiento de sus mecanismos de resistencia.

#### 5.1.2.1. Caracterización específica

Se trata de un líquen crustáceo (crece adherido a las rocas) bipolar. Al desarrollarse forma un patrón en forma de mapa muy característico (que le otorga su nombre), con un color amarillo-lima muy intenso en su zona central y colores oscuros en su periferia que se corresponden con los esporangios productores de esporas (ver fig. 5.4). Tienen una tasa de crecimiento muy baja, típicamente de 0,2 a 0,5 mm de diámetro por año y sus talos pueden llegar a medir 20 cm o más [79]. Ha sido empleado en líquenometría para tratar de datar la duración de la exposición a las condiciones ambientales de distintas zonas.



Figura 5.4: Talo estándar del líquen epilítico *R. geographicum*

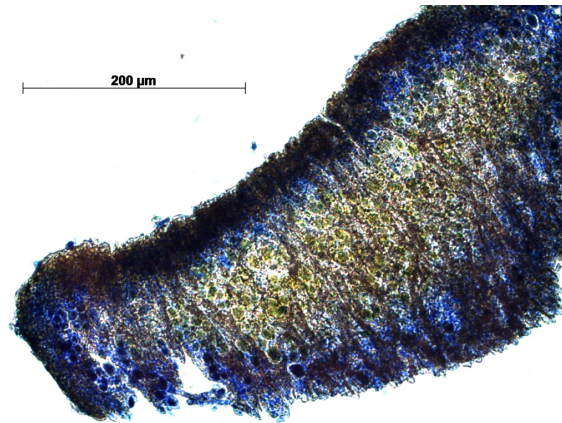
Fuente: EP

#### 5.1.2.2. Caracterización fisiológica, morfológica y anatómica

*R. geographicum* forma talos epilíticos, crustáceos con formas frecuentemente redondeadas. Presenta areolas planas o convexas que se sitúan sobre un hipotalo negro bien desarrollado, que está rodeado por un protalo marginal. Normalmente los talos próximos se fusionan formando grandes colonias. Los apotecios se forman generalmente entre las areolas y son negros y con forma de disco, con un epitecio negro de margen estrecho próximo a 1 mm. Los ascos forman 8 ascosporas de un tamaño comprendido entre 25 y 35  $\mu\text{m}$ , melanizadas y septadas. No se ha observado reproducción asexual [62]. Desde un punto de vista anatómico, los talos muestran ocasionalmente un epicórtex gelatinoso interrumpido. Más hacia el interior, presentan unas células corticales densamente dispuestas, intensamente coloreadas y con SLCs incrustados. La capa algal se localiza por debajo de la anterior, y está caracterizada por filas de células algales e hifas dispuestas entre las anteriores, estando el conjunto situado de forma perpendicular a la superficie y altamente gelatinizado. La médula está formada por hifas muy compactadas y gelatinizadas, dispuestas también de forma perpendicular a la superficie y con pocos espacios gaseosos [62].

#### 5.1.2.3. Caracterización geográfica

Este líquen vive en muchos tipos de hábitats, pero con preferencia por zonas montañosas y polares. Está ampliamente distribuido en zonas alpinas de ambos hemisferios, desarrollándose también en la zona Ártica y en la Antártida [32] Es una especie sensible a la contaminación ambiental y se ha empleado frecuentemente como bioindicador de la calidad del aire. En su hábitat natural, los talos de *R. geographicum* permanecen durante largos períodos de tiempo cubiertos por nieve. En la litología de la zona de recogida de muestras predominan granitos con fenocristos. En nuestro casos, las muestras fueron tomadas en las montañas de la Sierra de Guadarrama, próximas al puerto de Navacerrada (Madrid, 40°47'10"N, 03°59'51"W) y a unos 1400 m de altitud.



**Figura 5.5:** Sección de un fragmento de talo de *R. geographicum*  
Fuente: EP-HHU



**Figura 5.6:** Imagen de la zona de recogida de muestras de *R. geographicum* (Navacerrada)  
Fuente: EP

## 5.2. Tratamientos aplicados

Para profundizar en el estudio de los mecanismos de resistencia a condiciones espaciales de las dos especies de líquenes descritas, aplicamos una serie de parámetros ambientales marcianos y/o espaciales reales o simulados (de forma conjunta o individualizada) sobre las muestras.

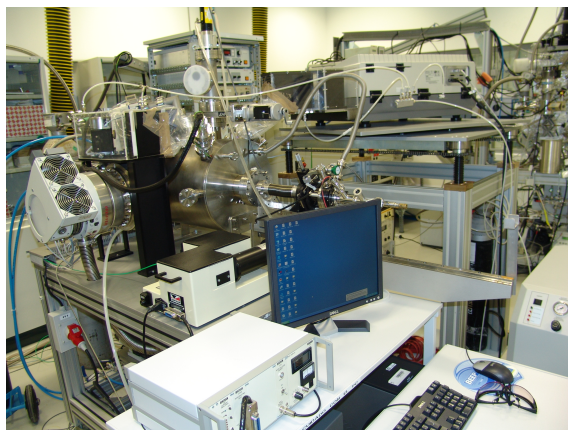
En concreto, los tratamientos aplicados sobre las muestras y sus parámetros específicos fueron:

### 5.2.1. Publicación I: Simulaciones marcianas

PASC es un versátil dispositivo de simulación controlado por ordenador que permite una regulación en detalle de mezclas de gases, presiones atmosféricas y temperaturas, lo que permite llevar a cabo simulaciones de los ambientes de múltiples cuerpos planetarios (fig. 5.7) [59]. La conexión con fuentes de luz externas permiten replicar los ambientes extraterrestres con una elevada fidelidad.

En el caso de la Publicación I, los parámetros simulados fueron:

- **Atmósfera:** La composición de gases se fijó en las proporciones: 95 % CO<sub>2</sub>, 2,7 % N<sub>2</sub>, 1,6 % Ar y 0,6 % H<sub>2</sub>O, de acuerdo con Owen (1992) [67].
- **Presión:** La presión global dentro de la cámara se fijó en 7 mbar. En un tratamiento se aplicó un vacío de 10<sup>-6</sup> mbar, el presente en LEO.
- **Temperatura:** Se estableció una temperatura de -93°C, siendo ésta la mínima temperatura esperada que se alcance en los sitios de amartizaje de los rovers enviados a Marte y es al mismo tiempo su límite para operaciones técnicas.



**Figura 5.7:** Vista general de la cámara de simulación de atmósferas y superficies planetarias (PASC)

Fuente: EP

- **Radiación UV:** La radiación utilizada fue en el rango 200 - 400 nm con un pico en 254 nm (UV-C).

Se llevaron a cabo tres combinaciones de parámetros ambientales marcianos (y de vacío espacial) simulados. Éstos se aplicaron sobre muestras de *C. gyrosa* dispuestas en dos niveles (1 y 2). Las combinaciones de parámetros reproducidos en cada una de esas simulaciones y los objetivos de cada combinación de condiciones fueron las siguientes:

- **Tratamiento 1** Atmósfera, presión y temperatura (-93°C) marcianas simuladas.  
*Objetivo:* Detectar diferencias entre el nivel I y nivel II del portamuestras no debidas a la radiación UV.
- **Tratamiento 2** Atmósfera, presión, temperatura (-93°C) y radiación UV (200-400 nm) marcianas simuladas.  
*Objetivo:* Estudiar y cuantificar el efecto de la radiación UV sobre las muestras en combinación con los demás parámetros. Analizar la posible existencia de efectos antagónicos.
- **Tratamiento 3** Vacío LEO, temperatura (-93°C) y radiación UV marciana simulada.  
*Objetivo:* Estudiar y cuantificar el efecto de la combinación de los dos parámetros espaciales más letales: la radiación UV-C y el vacío sobre *C. gyrosa*.

### 5.2.2. Publicación II: Irradiaciones UV-C bajo distintas condiciones experimentales

En la Publicación II, nos centramos en un parámetro presente en el espacio y en la superficie de Marte: la radiación UV-C. Ésta, junto con el resto del espectro UV, llega desde el sol y está prácticamente inalterada en ambos ambientes, al no haber ninguna capa que actúe como filtro, tal y como ocurre con la capa de ozono en la Tierra.

Para aplicar las distintas dosis de UV-C sobre las muestras se empleó la cámara de irradiación BS-03 (Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, Alemania; fig. 5.8). Se trata de una fuente de radiación UV controlada que permite ajustar la dosis y el espectro que queremos aplicar sobre los distintos tipos de muestras. En este caso se equipó con tubos de mercurio a baja presión que emiten radiación UV-C policromática en el rango espectral comprendido entre 200 y 280 nm, con un pico de emisión en 253,7 nm.

En este ensayo se aplicaron 23 dosis de UV-C sobre muestras de *R. geographicum* y *C. gyrosa* bajo diferentes condiciones experimentales. Estas dosis son las que se encuentran recogidas en la tabla 5.1 y se encuentran en el rango comprendido entre  $2,5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$  (10 h 44 m 46 s) y  $7,20 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$  (311 h 35 m 41 s), equivaliendo aproximadamente ésta última a la dosis UV-C teórica que se recibiría durante una exposición de 67 días en LEO.



Figura 5.8: Vista general de la cámara de irradiación.

Fuente: EP

Dosis 1 a 12	Duración	Dosis 13 a 23	Duración
$2,5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	10 h 44 m 46 s	$8,5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	36 h 17 m 55 s
$3,0 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	12 h 49 m 14 s	$9,0 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	38 h 31 m 57 s
$3,5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	15 h 10 m 30 s	$9,5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	40 h 32 m 52 s
$4,0 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	16 h 51 m 43 s	$1,00 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	42 h 46 m 13 s
$4,5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	18 h 42 m 10 s	$1,05 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	45 h 08 m 33 s
$5,0 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	20 h 45 m 28 s	$1,10 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	47 h 15 m 04 s
$5,5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	23 h 29 m 00 s	$1,15 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	47 h 57 m 55 s
$6,0 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	25 h 40 m 13 s	$1,20 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	51 h 17 m 39 s
$6,5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	27 h 12 m 27 s	$2,40 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	103 h 11 m 28 s
$7,0 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	29 h 36 m 02 s	$4,80 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	205 h 06 m 28 s
$7,5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	31 h 45 m 44 s	$7,20 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	311 h 35 m 41 s
$8,0 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	34 h 08 m 13 s		

Tabla 5.1: Dosis UV-C aplicadas y duración

Modificado de Sánchez, F.J. et al. (2013). UV-C tolerance of symbiotic *Trebouxia* sp. in the space-tested lichens species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: role of the hydration state and cortex/screening substances [75]

Las condiciones experimentales fueron cuatro, encaminadas a evaluar el papel del estado fisiológico de los talos (secos-latentes, húmedos-fisiológicamente activos) y de dos estructuras protectoras (córtex y pigmentos fotoprotectores) en la tolerancia y resistencia al espectro UV-C:

1. Muestras intactas y secas (*R. geographicum* y *C. gyrosa*)
2. Muestras intactas y húmedas (*R. geographicum* y *C. gyrosa*)
3. Muestras sin córtex y secas (*R. geographicum*) / lavadas con acetona y secas (*C. gyrosa*)
4. Muestras sin córtex y húmedas (*R. geographicum*) / lavadas con acetona y húmedas (*C. gyrosa*)

### 5.2.3. Publicación III: Experimento LIFE

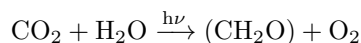
Tal y como se ha explicado previamente, en el experimento LIFE muestras de líquenes de las especies *R. geographicum* y *X. elegans* estuvieron expuestas a condiciones LEO durante un período de 1,5 años a bordo de la plataforma EXPOSE-E, integrada en la parte exterior del laboratorio Columbus de la Estación Espacial Internacional. La información detallada sobre las condiciones que experimentaron, han sido ya descritas en el apartado 2.2.4 del capítulo 2 “Estado actual de la investigación”, dentro de la revisión de conocimientos.

### 5.3. Pruebas analíticas de viabilidad

Una vez finalizado el tratamiento en cuestión, se llevaron a cabo una serie de análisis a fin de evaluar la influencia de los parámetros detallados en el apartado anterior sobre la fisiología de los organismos estudiados. La elección de los métodos analíticos se hizo teniendo en cuenta el/los parámetro/s de estrés aplicados y el/los mecanismo/s de resistencia o tolerancia propuesto/s en la bibliografía en relación con el bionte que queríamos estudiar. Tanto en los experimentos de exposición en LEO como en los ensayos de simulación, se han utilizado diversas técnicas de este tipo que son descritas en los artículos correspondientes a cada experimento ([77], [78] y [18]). Aquí nos centraremos en las técnicas utilizadas en las publicaciones I, II y III (dado que tal y como ya se ha mencionado, en la publicación IV no se aplicó ningún tratamiento de estrés).

#### 5.3.1. Análisis de rendimiento fotosintético

La fotosíntesis es el proceso vegetal por excelencia y fundamental para la vida sobre la Tierra. En esencia consiste en la liberación mediante la ayuda de la luz del oxígeno integrante de la molécula de agua y el almacenamiento del poder reductor resultante en numerosos compuestos carbonados que constituyen la materia viva [3] siguiendo la siguiente reacción global (fotosíntesis oxigénica):

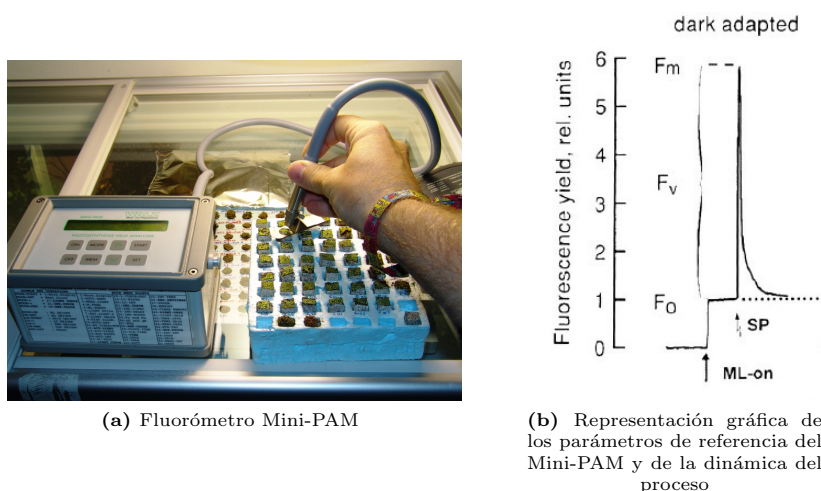


La captación y transformación de la luz tiene lugar en los cloroplastos durante la fase fotoquímica o lumínica. Para llevar a cabo este proceso existen los fotosistemas, complejos proteicos localizados en la membrana tilacoidal del cloroplasto. En los fotosistemas se encuentran los pigmentos antena (clorofila *a*, entre otros), cuya función es captar la energía contenida en la luz solar en forma de fotones. Éstos son cantidades discretas de energía que excitan a los electrones contenidos en los pigmentos fotosintéticos, elevándolos a niveles mayores de excitación y energía. Por resonancia, esa energía se va transportando hasta los centros de reacción, donde tiene lugar la excitación final de una molécula de clorofila *a* fotooxidable que se oxida perdiendo un electrón, dando comienzo a la cadena de transporte electrónico que conducirá en último término al almacenamiento de energía en forma de ATP.

Los mismos estados de excitación que intervienen en la conversión de energía fotoquímica que tiene lugar en el cloroplasto durante la fase luminosa de la fotosíntesis provocan un aumento en la emisión de fluorescencia [83]. Ésto hace que las medidas de fluorescencia de clorofilas sean un indicador adecuado del estado global del aparato fotosintético, siendo posible inferir el rendimiento del proceso. Si se realizan medidas de fluorimetría en muestras fotosintéticas bajo condiciones estándar antes de llevar a cabo ningún tipo de experimento sobre las mismas, es posible obtener un valor de referencia de su estado global. Más tarde es posible comparar las medidas estándar con nuevas medidas realizadas tras la realización del ensayo y así inferir de qué forma han influido las condiciones experimentales sobre el organismos fotosintético en cuestión.

En los estudios incluidos en la presente tesis doctoral los organismos fotosintéticos fueron algas verdes liquenzadas (fotobiontes) del género *Trebouxia* sp. que se encontraban formando parte de la simbiosis liquénica. Para el análisis de su estado se utilizó un fluorómetro Mini-PAM (Walz, Alemania) especializado en la evaluación del rendimiento cuántico efectivo de la conversión de energía fotoquímica que tiene lugar durante la fotosíntesis en el fotosistema II (Manual de instrucciones).

De forma previa a cada toma de medidas, los líquenes fueron hidratados para activar su fisiología y adaptados a oscuridad para favorecer el que todos los centros de reacción se abrieran y conseguir así valores óptimos de rendimiento fotosintético [82]. Para ello, el fluorómetro aplica pulsos de luz modulada a través de una fibra óptica desde un diodo (LED). En concreto, en primer lugar obtiene un valor de fluorescencia mínimo ( $F_o$ ) al excitar al fotobionte con un haz de luz débil (no tiene la energía suficiente para iniciar el transporte electrónico). A continuación, el fluorómetro emite un pulso de luz saturante que satura los centros de reacción suprimiendo momentáneamente el rendimiento fotosintético a la vez que induce un rendimiento fluorescente máximo ( $F_m$ ). La diferencia entre ambos valores ( $F_m - F_o$ ) supone el valor máximo de fluorescencia variable ( $F_v$ ). Con estos tres valores, es posible obtener un valor de rendimiento fotosintético que es calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:



(a) Fluorómetro Mini-PAM

(b) Representación gráfica de los parámetros de referencia del Mini-PAM y de la dinámica del proceso

**Figura 5.9:** Aspecto y funcionamiento del fluorómetro Mini-PAM

Fuente: (a) EP, (b) Adaptado de Schreiber, U. (2004) [83]

$$Yield = \frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m}$$

El parámetro  $F_v/F_m$  supone la eficiencia cuántica máxima del PSII cuando todos los centros de reacción están abiertos tras un período de adaptación a la oscuridad.

Las medidas de rendimiento se ven influidas por las distintas características de las muestras a estudiar

En la figura 5.9b podemos ver una representación gráfica de los parámetros de referencia empleados por la tecnología de modulación por amplitud de pulsos (PAM) y de la dinámica del proceso en una muestra fisiológicamente activa y adaptada a la oscuridad. Por último, hay que indicar que el valor  $F_v/F_m$  que se obtiene sobre muestras de líquenes latentes (deshidratadas) es cero. Ésto es así porque se trata de muestras fotosintéticamente inactivas y los pulsos saturantes no inducen respuesta en ausencia de un fotosistema II activo.

En el caso concreto de nuestros estudios, con el objetivo de obtener un patrón del rendimiento cuántico óptimo del PSII con el que poder realizar una comparación entre los valores registrados de forma previa y posterior a la realización del experimento además de para uniformizar al máximo el estado fisiológica de las muestras previo a cada medida, se llevaron a cabo sendos procesos de revitalización antes de registrar sus valores de actividad fotosintética, uno previo al experimento y otro posterior. Este procedimiento había sido seguido previamente en los experimentos LICHENS II [77], LITHOPANSPERMIA [18] y LIFE [66]. El proceso de revitalización consiste en mantener las muestras bajo condiciones controladas de temperatura ( $10^{\circ}\text{C}$ ), radiación fotosintéticamente activa (PAR) (utilizando un ciclo día/noche de 12 h/12 h mediante una lámpara de mercurio que emite PAR con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y humedad (rociando una vez al día las muestras con agua mineral por medio de un pulverizador hasta provocar su saturación) durante un período de tres días. Durante los procesos de revitalización pre- y post experimental se realizaron tres medidas con el fluorómetro Mini-PAM: a las 24, 48 y 72 h. Tras la última medida el proceso se detuvo. De forma previa a cada medida se realizó una humidificación seguida de una adaptación a la oscuridad durante 20 minutos para provocar la apertura máxima de los centros de reacción. Los resultados de actividad fotosintética obtenidos previamente a la realización del experimento se tomaron como valores de referencia respecto a los valores registrados sobre las mismas muestras tras la exposición a condiciones adversas, proporcionando un mecanismo para establecer de qué forma habían afectado las condiciones experimentales a la vitalidad del sistema.

### 5.3.2. Análisis de intercambio gaseoso

Los experimentos de intercambio gaseoso con líquenes permiten obtener medidas directas de respiración y fotosíntesis, pudiendo así evaluar el estado fisiológico de la simbiosis líquénica al completo. Para ello se utilizan analizadores de alta precisión de los gases relevantes en intercambio gaseoso fotosintético: CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. En este caso se empleó el modelo GFS-3000 (Walz, Alemania), que está compuesto de un sistema de flujo de aire diferencial y abierto acoplado a un detector IRGA (analizador infrarrojo de gases). Con este equipo es posible cuantificar eficazmente la concentración de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O en el interior de un pequeño compartimento (cubeta) donde se encuentra la muestra biológica de interés y en el que todos los parámetros ambientales relevantes para la fotosíntesis son controlados (temperatura, luz, flujo y velocidad de aire). El aire circula por dos canales, uno de referencia y otro que atraviesa la cubeta con la muestra. El equipo consta de cuatro sensores, dos para CO<sub>2</sub> y dos para H<sub>2</sub>O (estando ubicada una pareja de sensores para cada gas en cada uno de los dos canales). Por comparación de la concentración de ambos gases en cada canal, es posible establecer qué está ocurriendo a nivel fotosintético en el interior de la cubeta (emisión o asimilación de CO<sub>2</sub>).

Debido a las características fisiológicas de los líquenes, para la correcta interpretación de los datos de intercambio gaseoso obtenidos con estos organismos es conveniente realizar dos curvas, una de *deshidratación* y otra de *luz*, que son explicadas a continuación.

En líquenes recién hidratados, existirá al comienzo de la realización de estas medidas un predominio de respiración (aumento de la concentración de CO<sub>2</sub>) debido a la respiración llevada a cabo por el micobionte y el alga. Transcurrido un breve lapso de tiempo se alcanza el punto de compensación, en el que se produce un equilibrio a partir del cual el líquen comenzará a fijar CO<sub>2</sub>, predominando el proceso fotosintético respecto al respiratorio.

De forma preliminar a la realización de ambas curvas, los líquenes son sometidos a un proceso de revitalización similar al llevado a cabo de forma previa a las medidas de rendimiento fotosintético (ver apartado 5.3.1).

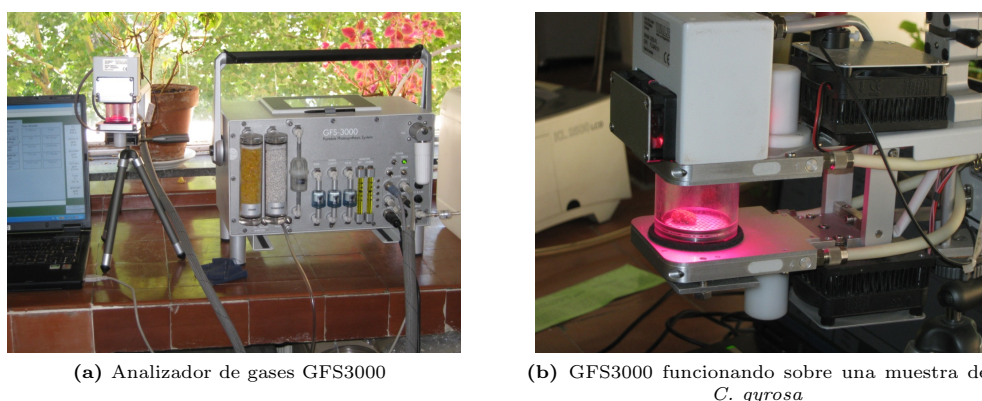
- Curva de deshidratación

Como sabemos, los líquenes son organismos poiquilohídricos (no son capaces de regular su contenido en agua, tal y como hacen las plantas vasculares). Esto hace que estén fisiológicamente adaptados para optimizar la explotación de los recursos que tienen a su alcance en el momento en que éstos están disponibles. Cuando las condiciones ambientales cambian y se produce la hidratación de los talos líquénicos, el fotobionte (alga o cianobacteria) comienza a fotosintetizar a un elevado ritmo, que mantiene mientras la hidratación continúe dentro de un umbral. A partir de ese umbral, la tasa fotosintética comienza a descender de forma progresiva hasta llegar a un punto en que el alga deja de fotosintetizar y las tasas metabólicas vuelven a aproximarse a cero. El período es tremendamente variable entre especies, influyendo entre otros factores la anatomía del talo (un líquen fruticuloso, capaz de incrementar un 80/90 % su peso fresco al hidratarse se mantiene hidratado durante mucho más tiempo que un líquen crustáceo). Por lo anterior, es necesario realizar una curva en la que se determine aproximadamente:

- Cuánto tiempo tarda el líquen en llegar al óptimo rendimiento fotosintético estando hidratado y recibiendo radiación fotosintéticamente activa.
- Cómo evoluciona la fotosíntesis neta en función de la pérdida de agua por parte del talo líquénico (dentro de la cubeta existe un flujo de aire que va deshidratando las muestras).

Mediante la realización de la curva de deshidratación es posible también inferir el momento en que la muestra deja de estar en el óptimo fotosintético al detectar el punto en que la curva comienza a desviarse de la fijación de CO<sub>2</sub> (fotosíntesis) y comienza a aproximarse a la parte de emisión de CO<sub>2</sub> (respiración). Para la realización de esta curva, las muestras se hidrataron a saturación y se introdujeron en la cubeta. Se les sometió a una radiación constante (400  $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) y se registró la concentración de CO<sub>2</sub> cada 5 minutos. Se dejaron de tomar medidas cuando, debido a la deshidratación, las muestras se alejaron del óptimo de fotosíntesis y comenzó a disminuir la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>.

- Curva de luz



**Figura 5.10:** Análisis de intercambio gaseoso

Fuente: J. Raggio (UCM)

El objetivo de esta curva será estudiar la capacidad de fijar  $\text{CO}_2$  a distintas intensidades lumínicas (aumentando progresivamente la densidad de flujo de fotones), para obtener información directa sobre la capacidad fijadora de  $\text{CO}_2$  por parte de las algas verdes del género *Trebouxia* sp., simbioses presentes en el líquen.

Para realizar esta curva, las muestras debidamente hidratadas y pesadas se introdujeron en la cubeta y se mantuvieron en oscuridad durante 20 minutos, hasta saber que se encontraban en el período de rendimiento fotosintético óptimo (inferido a partir de la curva de deshidratación). Una vez en el óptimo, se irradiaron durante 5 minutos con las siguientes intensidades de radiación: 0, 50, 100, 200, 400, 800, 1200 and 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD. La respuesta esperada en talos en buen estado fisiológico es que a mayor intensidad de radiación, aumente la tasa de fotosíntesis neta (con posibilidad de que se produzca fotoinhibición en los niveles de radiación más altos).

Se hacen tres medidas a 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad de luz (intensidad no saturante): la primera medida, para asegurarnos que el talo una vez comience el primer nivel de irradiación lumínica ya haya entrado en período de rendimiento óptimo fotosintético, la segunda en el momento en que le corresponda en la serie de intensidades a emplear y una tercera vez como última intensidad lumínica para comparar con las medidas anteriores y evaluar en qué estado han llegado las muestras al final de la curva (medida de control para evitar el fiarnos de resultados que no se ajusten a la realidad y se deban a que el líquen se haya alejado del óptimo fotosintético).

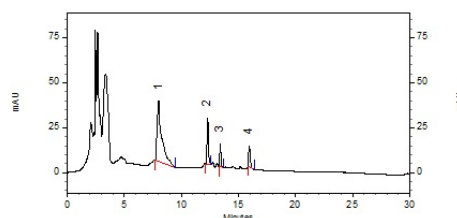
### 5.3.3. Análisis de pigmentos por HPLC

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) es una técnica cromatográfica cuya finalidad es separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla en base a diferentes tipos de interacciones químicas o físicas. Para ello, se hace que la mezcla de moléculas que se desea separar (muestra) interaccione con el medio o matriz de soporte (fase estacionaria) incluido en la columna cromatográfica mientras que un segundo medio (la fase móvil) que es inmisible con la fase estacionaria se hace fluir a través de ésta para “lavar” (eluir) las moléculas presentes en la muestra. La separación cromatográfica por HPLC es el resultado de las interacciones específicas de las moléculas de la muestra con ambas fases, móvil y estacionaria. Durante la elución, los componentes de la muestra se retrasan diferencialmente dependiendo de sus propiedades físico-químicas y las interacciones que tengan lugar con la fase estacionaria a medida que avanzan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto y de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto con respecto a una fase estacionaria y móvil determinadas. El resultado es una técnica ampliamente utilizada por su elevada sensibilidad, selectividad, reproducibilidad y rapidez, permitiendo determinaciones cuantitativas exactas.

En nuestro caso, se buscó medir la concentración de algunas clorofilas y carotenoides (pigmentos fotosintéticos producidos por el fotobionte todos ellos) presentes en muestras de *R. geographicum*



(a) Equipo de HPLC

(b) Patrón de picos obtenidos en el análisis por HPLC de los pigmentos de *Trebouxia* sp. en *R. geographicum***Figura 5.11:** Identificación y cuantificación de pigmentos por HPLCFuente: (a) CIECEM (UHU), (b) M<sup>a</sup>Carmen Ruiz (UHU)

y *C. gyrosa*, a fin de evaluar la influencia de la radiación UV-C en su contenido. En concreto se cuantificaron los pigmentos antena chl *a* y chl *b* y los dos pigmentos accesorios  $\beta$ -caroteno y luteína. Para ello se llevó a cabo una HPLC **en gradiente** (la composición de la fase móvil va cambiando durante el proceso) y **de fase reversa** (al contrario de lo habitual, la fase estacionaria es apolar y como fase móvil se emplean solventes polares) mediante un sistema *Thermoquest IBM 360PL* con un degasificador SCM1000, una bomba cuaternaria P4000, un automuestreador AS 3000 y un detector UV6000 PDA. La identificación y cuantificación de estos pigmentos se llevó a cabo por comparación con patrones estándar.

De entre las dosis de radiación UV-C aplicadas sobre muestras de *R. geographicum* y *C. gyrosa* realizadas en la Publicación II, se seleccionaron seis: la más baja de  $2,5 \times 10^6$  J/m<sup>2</sup>, una intermedia de  $7,5 \times 10^6$  J/m<sup>2</sup> y las cuatro más elevadas de  $1,2 \times 10^7$ ;  $2,4 \times 10^7$ ;  $4,8 \times 10^7$  y  $7,2 \times 10^7$  J/m<sup>2</sup>. Tras el período de revitalización post-irradiación de 72 horas y la realización de las medidas de rendimiento cuántico fotosintético, se seleccionó una muestra de cada una de las cuatro aproximaciones experimentales (muestras secas con córtex/pigmentos, húmedas con córtex/pigmentos, secas sin córtex/pigmentos y húmedas sin córtex/pigmentos) para la determinación de los pigmentos previamente mencionados.

El procedimiento de aislamiento y extracción de pigmentos de los talos líquénicos comenzó con la preparación de las muestras a analizar a temperatura ambiente (22-24°C). En primer lugar se lavaron con agua destilada para eliminar la mayor cantidad posible de impurezas. A continuación, las muestras de *R. geographicum* se sometieron a un proceso de separación o raspado de la superficie de la roca sobre la que crecen para dar una magnitud de biomasa real. Todos los talos se homogeneizaron mecánicamente con mortero. Seguidamente los talos de ambas especies se liofilizaron. Tras este proceso todas las muestras se pesaron para poder referenciar después la cantidad de pigmento aislado con su correspondiente biomasa seca. A continuación, la biomasa de cada muestra se resuspendió en 2 ml de metanol al 99,8% durante 48 h a 4°C. Tras la adición del disolvente las mezclas se homogeneizaron mecánicamente mediante la utilización de un vórtex. Tras las 48 h, el metanol se filtró y transfirió a viales para HPLC. Se utilizó una columna de tipo "Hipersil Gold" de fase reversa (Thermo Scientific, RP-18 250x4 mm) con un tamaño de poro de 5  $\mu$ m. El volumen de inyección fue de 100  $\mu$ l con dos solventes: a) acetato de etilo y b) acetonitrilo : agua 9:1 (v/v). En la fase móvil se utilizó un gradiente lineal con un gradiente de flujo de 1 ml/min durante 30 minutos, según se recoge en el protocolo de Young et al. (1997) [94]. El protocolo que se siguió fue el anteriormente mencionado con el único cambio de la utilización de metanol como disolvente para extraer los pigmentos en lugar de acetona.

Tras llevar a cabo el proceso anterior, se realizó una detección de los pigmentos extraídos mediante un detector a 450 nm. El HPLC proporciona unos picos característicos para cada tipo de pigmento que son susceptibles de ser comparados con patrones estándar. Tras la correspondiente identificación de chl *a*, chl *b*,  $\beta$ -caroteno y luteína, se realizó una cuantificación de esos pigmentos mediante un *software*. Gracias a este método fue posible comparar el contenido de pigmentos presente en muestras sometidas a distintos tipos de estrés con el de muestras control.

## Parte IV

# Copia de las publicaciones



# Publicación I

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 72:102-110

**Resumen:** La cámara de simulación “Cámara de Atmósferas y Superficies Planetarias” (PASC, Centro de Astrobiología, INTA, Madrid) puede simular la atmósfera y temperatura superficial de la mayoría de planetas del sistema solar. Está especialmente indicada para estudiar los cambios producidos por la radiación sobre muestras geológicas, químicas y biológicas bajo un amplio rango de condiciones atmosféricas y de temperatura controladas. Por lo tanto, esta cámara es un método válido para evaluar el potencial de resistencia de organismos extremófilos bajo diversas condiciones adversas y por lo tanto evaluar el potencial de habitabilidad de distintos ambientes extraterrestres. En el presente estudio se investiga la resistencia de un organismo simbiótico bajo condiciones simuladas de Marte, el líquen *Circinaria gyrosa* (un eucariota extremotolerante). Tras 120 horas de exposición a condiciones simuladas pero representativas de la atmósfera, temperatura, presión y radiación UV marcianas, un rendimiento fotosintético inalterado demostró la alta resistencia del fotobionte liquénico.





## The resistance of the lichen *Circinaria gyrosa* (nom. provis.) towards simulated Mars conditions—a model test for the survival capacity of an eukaryotic extremophile

F.J. Sánchez<sup>a,\*</sup>, E. Mateo-Martí<sup>b</sup>, J. Raggio<sup>c</sup>, J. Meeßen<sup>d</sup>, J. Martínez-Frías<sup>b</sup>, L.G.<sup>a</sup> Sancho<sup>c</sup>, S. Ott<sup>d</sup>, R. de la Torre<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial (INTA), Ctra. de Ajalvir km. 4, 28850-Torrejón de Ardoz, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Centro de Astrobiología (CAB) (INTA-CSIC), Ctra. de Ajalvir km. 4, 28850-Torrejón de Ardoz, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040-Madrid, Spain

<sup>d</sup> Institute of Botany, Heinrich-Heine University, Universitätsstr.1, 40225-Düsseldorf, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 December 2011

Received in revised form

30 July 2012

Accepted 3 August 2012

Available online 21 August 2012

#### Keywords:

Planetary Atmospheres and Surfaces Chamber (PASC)

Mars

Lichens

Symbiosis

Survival

Resistance potential

### ABSTRACT

The “Planetary Atmospheres and Surfaces Chamber” (PASC, at Centro de Astrobiología, INTA, Madrid) is able to simulate the atmosphere and surface temperature of most of the solar system planets. PASC is especially appropriate to study irradiation induced changes of geological, chemical, and biological samples under a wide range of controlled atmospheric and temperature conditions. Therefore, PASC is a valid method to test the resistance potential of extremophile organisms under diverse harsh conditions and thus assess the habitability of extraterrestrial environments. In the present study, we have investigated the resistance of a symbiotic organism under simulated Mars conditions, exemplified with the lichen *Circinaria gyrosa*—an extremophilic eukaryote. After 120 hours of exposure to simulated but representative Mars atmosphere, temperature, pressure and UV conditions; an unaltered photosynthetic performance demonstrated high resistance of the lichen photobiont.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Nowadays, the study of planetary environments has become a major scientific interest, especially with respect to the possibility of extinct or extant life (Davila et al., 2010). Planetary objects, like Mars, are priority targets for searching bio-signatures in our solar system. This is mainly due to the recently demonstrated presence of water in any of their past or present geological periods (Horneck, 2000; McKay, 1997; Mehta et al., 2011; Nelli et al., 2010). However, the effect at the planetary surfaces of environmental parameters such as radiation, gas composition, pressure, and temperature is critical either for survival of microorganisms or for the likelihood of preserving bio-signatures (Nelli et al., 2010; Patel et al., 2004).

The modest knowledge that we have about planetary environments comes mainly from space missions, which are highly consuming both, time and cost. Due to the obvious technical and economical limitations of in-situ planetary exploration, laboratory

simulations are the most feasible options to make advances, both in planetary science and astrobiological approaches. These facilities evolved rapidly and now are able to mimic the conditions found in the atmospheres and on the surfaces of planetary objects as Mars, Titan, and Europa (Galletta et al., 2006; Jensen et al., 2008; Mateo-Martí et al., 2006; Zhukova et al., 1965; Zill et al., 1979), especially by providing controlled conditions, analytical protocols, as well as sensors (Garry et al., 2006; Nicholson and Schuerger, 2005; Sears et al., 2002; Smith et al., 2009). Additionally, state-of-the-art facilities as PASC, allow to discriminate between the effects of individual physical parameters and selected combinations, and are precious for mission preparation and ground reference tests.

PASC has provided valuable scientific outcome related to astrobiology and habitability research: In previous studies, the UV-absorbing properties of Martian analog basaltic dust as a function of its mass and thickness (Muñoz-Caro et al., 2006) have been determined. Studies on the stability of saline water under present-day Mars conditions indicate that salty environments might allow water to be locally and sporadically liquid on Mars (Zorzano et al., 2009). Additionally, the survival of chemolithoautotrophic bacteria exposed to simulated Mars environmental conditions was recently demonstrated (Gómez et al., 2010). Life

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 52 01656.

E-mail address: [sanchezifj@inta.es](mailto:sanchezifj@inta.es) (F.J. Sánchez).

on Earth requires energy, some basic chemical elements and liquid water; and on Mars these basic life premises were existent in the past and could be present now. Estimations of water abundance on Mars based on geochemical and geomorphological studies concluded that during much of Martian geologic history an important amount of water has been present on the planet in different states (Baker et al., 1991; Beaty et al., 2005; Carr, 1986; Tanaka, 1986). These findings motivate the search for past or present life on this planet and are also sufficiently encouraging to stimulate the search of terrestrial organisms potentially resistant to such conditions. Mars is the most appropriate site for testing the possibility of biological evolution beyond Earth. Therefore, we have focused on the impact of simulated Mars conditions on the resistance of the lichen *Circinaria gyrosa* (Fig. 1, recently renamed from *Aspicilia fruticulosa*, see Sohrobi, 2012), a complex extremophilic organism of eukaryotic and symbiotic nature. This vagrant lichen species is widely distributed in (semi-) arid habitats and thus, it is well adapted to environmental conditions such as severe diurnal and seasonal temperature fluctuations (the maximum and minimum temperatures recorded in the historical record of the Spanish Meteorological Agency in our area of collection range from 38,0 °C to –28,2 °C respectively), drought, and high levels of solar radiation (Sancho et al., 2000).

In general, lichens are well known to colonize extreme habitats such as cold and hot deserts, alpine and polar regions (Green et al., 2011; Kappen, 1983; Pintado et al., 2004; Sancho et al., 1997). Some lichens even live inside rocks protected from harsh environmental conditions (de los Ríos et al., 2005). Their adaptation to the most extreme terrestrial habitats is the main reason to use them as targets for astrobiological experiments. This endurance is related to their poikilohydric nature, which allows them to resist harsh environmental conditions when dry (Green, 2009), activating their metabolism when wet, normally under more moderate conditions.

Previous experiments in spaceflight – Biopan-5 (Foton M2, 2005), Biopan-6 (Foton M3, 2007), and on the ISS, such as the LIFE mission on Expose-E – and also ground based experiments have shown that lichens along with bacterial colonies, meristematic black fungi and endolithic communities are able to survive and to reactivate their metabolism after space exposition (de la Torre et al., 2010; de la Torre Noetzel et al., 2007b; de Vera et al., 2010b, 2004a, 2003; Horneck et al., 1994; Olsson-Francis et al., 2009; Onofri et al., 2008; Raggio et al., 2011; Sancho et al., 2009, 2007). Post-flight analysis showed a high and fast recovery of the biological activity (chlorophyll *a* fluorescence) of *C. gyrosa* (de la Torre et al., 2010), as well as of the epilithic lichens *Rhizocarpon geographicum* and *Xanthoria elegans* (de la Torre Noetzel et al., 2007b and Sancho et al., 2007).

Given the high resistance and the great survival capacity of lichens, *C. gyrosa* was selected for further studies to test these features under simulated Mars conditions. Subsequent aims of this study were to cross-check the data obtained in the space-flight experiment and to broaden our knowledge on the physiological

impact of Martian conditions towards this lichen species. Besides the measurement of the photosynthetic activity (chlorophyll *a* fluorescence), the additional method of light dependent gas exchange measurements was applied. While chlorophyll *a* fluorescence measurements assess the maximum quantum yield of the photosystem II, the gas exchange measurements cover the whole photosynthetic process giving insight into the net photosynthesis rate and thus, the vitality of the photobiont (the algal partner of the lichen symbiosis) and also of the mycobiont, which is the major partner of the lichen symbiosis.

## 2. Material and methods.

### 2.1. Description of the simulated Mars conditions in the PASC

The “Planetary Atmospheres and Surfaces Chamber” (PASC, Fig. 2) is a versatile computer-controlled simulation device that allows in-detail regulation of gas mixtures, atmospheric pressures and sample temperatures in order to simulate conditions on various planetary objects (Mateo-Martí et al., 2006). Linkage with external light sources allows the application of different planetary radiation scenarios. The experimental parameters for the present study were defined as listed below:

**Simulated atmosphere:** The simulated Mars atmosphere was obtained by a multi-valve gas-mixing system and composed in the required proportions of 95% CO<sub>2</sub>, 2.7% N<sub>2</sub>, 1.6% Ar and 0.6% H<sub>2</sub>O (Owen, 1992). The gas composition was constantly monitored by a residual gas analyzing quadrupole mass spectrometer (RGA-MS) and controlled by acting the corresponding fluxmeter.

**Pressure:** The partial pressure of each of the gases was independently controlled (combined Pirani–Penning sensor with a range of  $1 \times 10^4$ – $5 \times 10^{-9}$  mbar) and the overall pressure was adjusted at 7 mbar. A low earth orbit (LEO) vacuum of  $10^{-6}$  mbar was performed by an ultra-high vacuum (UHV) system with the help of a turbomolecular pump incorporated in the PASC.

**Temperature:** The sample temperature was regulated by a combination of a N<sub>2</sub>-cooling cryostat and a 50 Ω electrical heating resistance which were connected to the sample holder and measured by using two silicon diodes in different parts. The temperature of the sample could be adjusted in the range from –269 °C to 52 °C. Measured by the two Viking landers, Martian temperatures at 1.5 m above the surface ranged from –17 °C to –107 °C, with occasional peaks ranking from 27 °C to –143 °C at the warmest soils or at the winter polar caps, respectively (Hess



Fig. 1. Various thalli of the vagrant lichen *Circinaria gyrosa* collected from Zaorejas (Guadalajara, Central Spain).

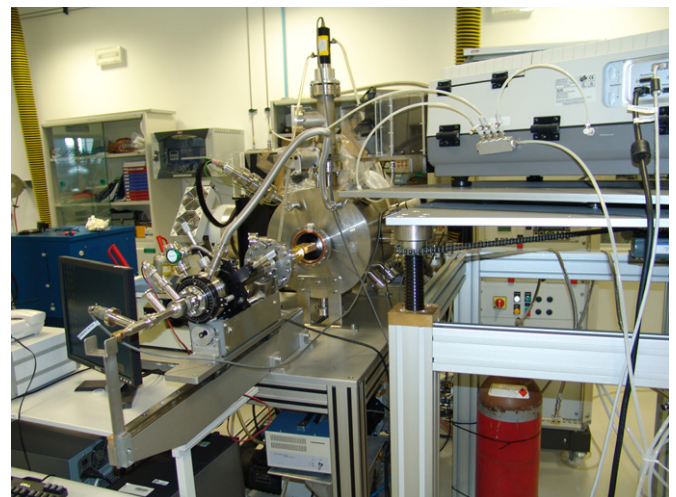


Fig. 2. General view of the Planetary Atmospheres and Surfaces Chamber (PASC).

et al., 1977; Murphy et al., 1990; Tillman, 1988.). In our studies a restrictive temperature of  $-93^{\circ}\text{C}$  was selected, which was the minimum expected value to be reached in the landing sites of the Mars Exploration Rovers and at the same time their limit for technical operations (Martin et al., 2003).

**UV-radiation:** Simulated Mars UV radiation was emitted by a polychromatic 150 W water-cooled deuterium UV lamp (L1835-L2D2, Hamamatsu). The spectrum ranges constantly from 200–400 nm with a peak at 254 nm and a sample irradiation dose of  $30\text{ mW cm}^{-2}$ .

**Sample holder specifications:** Samples were mounted horizontally on a specific sample holder and fixed in a removable sample-container. The aluminum–silica sample holder consists of a top level (level-1) and a bottom level (level-2) of  $146 \times 129 \times 23\text{ mm}$  each, with 12 sample-slots of 10 mm in diameter and 6 mm in height (Fig. 3). The sample-slots at level-2 were connected to the surrounding atmosphere by venting holes (tubular connections) between the single cells. So, while all samples were exposed to the same atmospheric and temperature parameters, the samples located in the upper level-1 were additionally irradiated with simulated UV-Mars radiation (when applied; see also Fig. 4a), the samples in the lower level-2 always served as dark controls.

**Experimental processing and duration of the exposure:** According to the standard experimental protocol (Mateo-Martí et al., 2006), an evacuation of PASC was performed previously. Afterwards, the partial pressure of each gas was fixed and adjusted to a total of 7 mbar. Once the pressure was stabilized, the samples were cooled down to  $-93^{\circ}\text{C}$ , followed by the activation of the UV source. The duration of each exposure experiment at simulated conditions was adjusted to 120 h. At all, three different experimental treatments were performed with 16 samples of *C. gyrosa* thalli each: 8 samples were located in the top level (level-1) and 8 samples were located in the bottom (level-2).

- **Treatment 1:** simulated Mars atmosphere environment,  $-93^{\circ}\text{C}$ , and no simulated Mars UV radiation. (to exclude inherent differences between level-1 and level-2 of the sample holder).
- **Treatment 2:** simulated Mars atmosphere environment,  $-93^{\circ}\text{C}$ , and simulated Mars UV radiation.

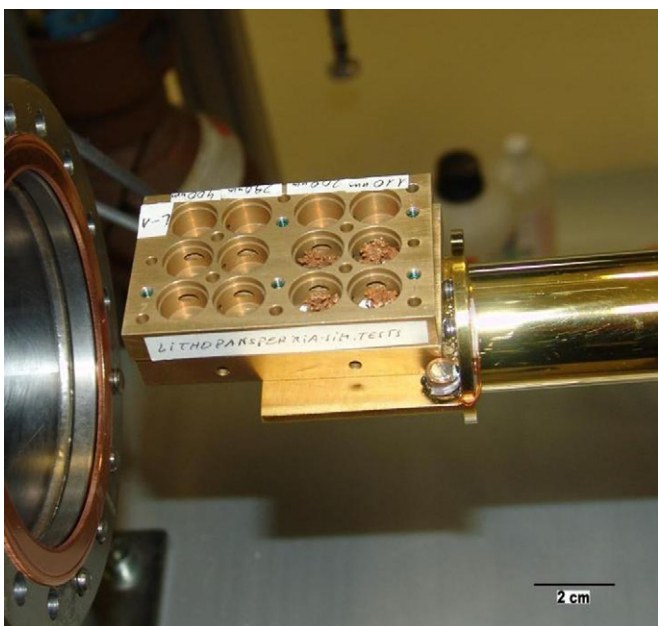


Fig. 3. Hardware for simulation experiments with accommodated *Circinaria gyrosa* samples before introduction into the PASC simulation chamber.

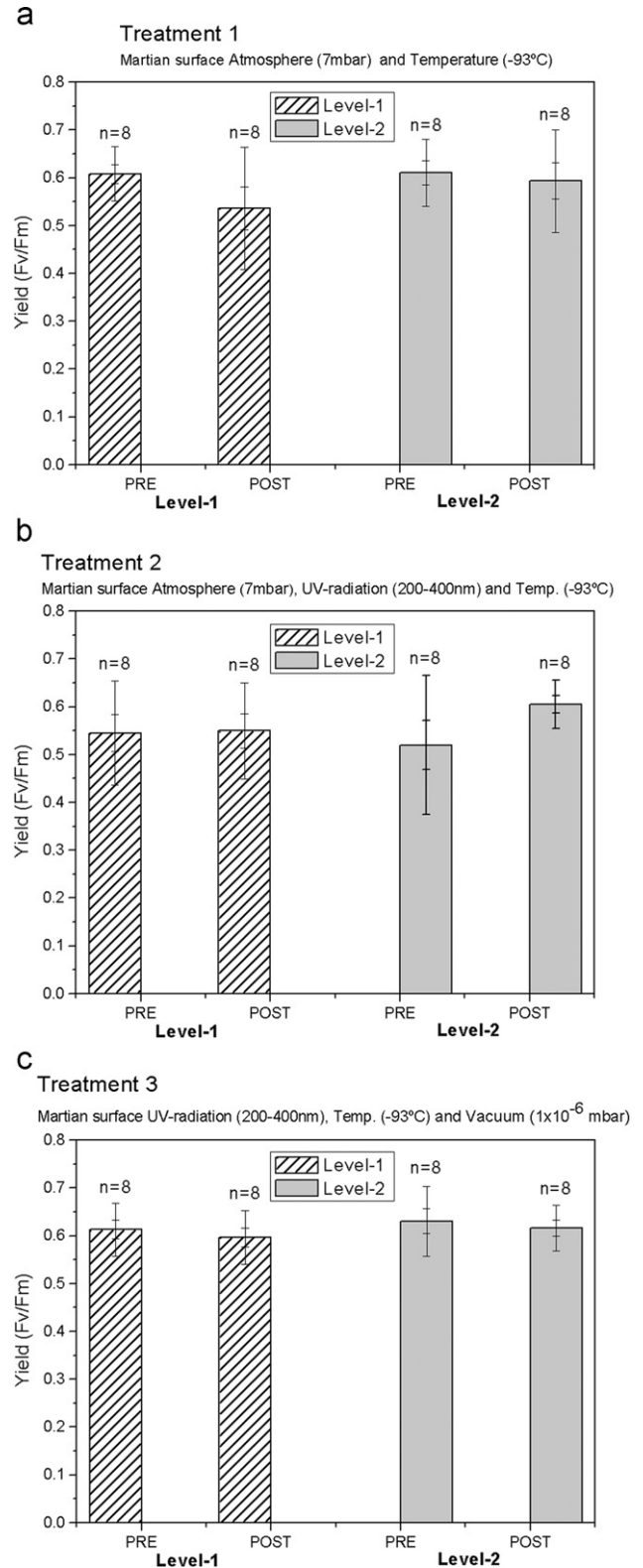


Fig. 4. Photosystem II (PSII) activity of *Circinaria gyrosa*'s photobiont measured on samples located both in level-1 (exposed to UV radiation during simulations) and level-2 (protected from UV radiation during simulations). Columns in stripes represent the mean of the maximum quantum yield (MQY) (Fv/Fm) before and after the test of the eight level-1 samples, columns in grey color, the values before and after the test of the eight level-2 samples. This MQY of photosystem II was taken as an indication of the activity of the photobiont after the exposure to the experimental parameters: Fv=variable fluorescence yield, Fm=maximal fluorescence yield. (Photosynthetic activity of exposed UV radiation and dark control samples of *Circinaria gyrosa*).

(to study and quantify the effect of UV radiation on the *C. gyrosa* samples).

- **Treatment 3:** simulated LEO vacuum,  $-93^{\circ}\text{C}$ , and simulated Mars UV radiation.

(to study and quantify the effect of space-like vacuum on the *C. gyrosa* samples).

## 2.2. Biological samples: the lichen *Circinaria gyrosa*

The vagrant lichen samples have been collected on clayey soils in continental high basins of Central Spain (Guadalajara, Zaorejas, 1260 m a.s.l.). Characteristic for *C. gyrosa* is the globular fruticose and compact thallus with maximum 2.5 cm of diameter, formed by sympodial branching (Fig. 1). The top branches show more or less circular pseudocyphellae that appear as white regions with the absence of a cortical layer where the medulla is exposed to the atmosphere (Sancho et al., 2000). This lichen is original from continental deserts and arid areas of Middle Asia, Eurasia, North America and Northern Africa and thus, it is well adapted to harsh environmental conditions, including heat, drought, and high levels of solar UV radiation (Sancho et al., 2000). The samples were collected in June and were kept dry and protected from light under dark conditions for several months before the tests. Samples with an approximate diameter of 1 cm were employed in the simulations test, in order to have the most homogeneous replicates for analysis.

## 2.3. Determination of the activity of the photosystem II

Before and after the simulations, the photosynthetic performance of *C. gyrosa* thalli was analyzed by means of the maximum quantum yield of the photosystem II (PSII). Previously, the samples were reactivated in a climatic chamber (facility at Complutense University Madrid, Spain) under constant parameters: a temperature of  $10^{\circ}\text{C}$ , 12 h light and dark cycles for 72 h, and irradiation with photosynthetically active light (PAL) by use of a mercury lamp with a photosynthetic photon flux density (PPFD) of  $100\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ . For re-hydration, the samples were sprayed once a day with mineral water. Then the activity of PSII of the photobiont was measured using a Mini-PAM fluorometer (Heinz Walz GmbH), as described in the references (de la Torre Noetzel et al., 2007b; Sancho et al., 2007). The Mini-PAM fluorometer applies strong light pulses to induce fluorescence. A photo-detector determines the photochemical quantum yield by the fluorescence parameters depicted above. Fluorescence changes induced by saturation pulses can be reliably interpreted in terms of photosynthetic activity.

Optimum quantum yield values were measured after 20 min of dark adaptation according to Schreiber et al. (1994) from the equation:  $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$  with  $F_v$  = variable fluorescence yield,  $F_m$  = maximal fluorescence yield and  $F_o$  = minimal fluorescence yield. The values obtained before the simulation were taken as reference values and were compared with the measurements carried out after the exposure to the Martian simulations. The differences between pre- and post-simulation maximum quantum yield of the photosystem II were taken as an indicator of the influence of the exposure conditions on the photobiont's photosynthetic machinery and performance.

## 2.4. Light dependent gas exchange analysis

The  $\text{CO}_2$  exchange was measured after 72 h reactivation (Raggio et al., 2011), at  $15^{\circ}\text{C}$  and at 0, 50, 100, 200, 400, 800, 1200 and  $1500\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  PPFD using an open flow differential IRGA system (GFS-3000, Walz Company, Germany). The IRGA

is a 4-channel  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$  absolute non-dispersive infrared analyzer type (NDIR). The cuvette of the gas exchange system is small, allowing rapid and accurate measurements ( $\pm 0.1\%$ ) on samples of low biomass. Temperature and relative humidity inside the cuvette were controlled and the air flow was regulated at 520 ml/min. Measurements at  $0\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  PPFD allowed to measure dark respiration of the samples, an indicator of the metabolic state of the fungus. The response to different PPFD levels could evaluate the physiological performance of the algal photosynthesis. Measurements were performed after three days of a reactivation cycle as explained in the determination of activity of PSII by chlorophyll *a* fluorescence. Four replicates of two samples were used for each different treatment. All measurements were performed after a rehydration period, submerging them for 20 min in mineral water to assure sufficient water content.

## 2.5. Morphological and anatomical studies

Thin layer sections of  $15\ \mu\text{m}$  were obtained from the distal branching of a representative specimen by using a freezing microtome (Slee MTC (FRG)  $-20^{\circ}\text{C}$ ) and subsequent staining with lactophenol cotton blue (Merck 13471). A light microscope (Leitz DMRB, FRG) was employed for the analysis and recording of the images.

## 3. Results and discussion of the survival of *C. gyrosa* under simulated Mars conditions.

The interest in the study of lichens performance under simulated Mars conditions is a relevant issue in order to deepen our understanding of their survival capacities and their resistance potential under extreme environmental conditions. Testing organisms under simulated extreme and extraterrestrial conditions – as those present on the surface of Mars – will allow to define the limits and limitations of survival and resistance. The experiments presented here involved the exposure of *C. gyrosa* to simulated Martian conditions.

The influence of experimental parameters, such as pressure, gas composition and UV radiation on the lichen's biological activity was tested by two different experimental approaches, as described in Section 2.1. After the simulation and the subsequent re-activation (Section 2.3), measurements of the maximum quantum yield of the photosystem II (MQY, see Section 2.3) and of the light dependent gas exchange (see Section 2.4) were performed.

The MQY revealed no significant differences in any of the applied experimental treatments compared to the control samples (MQY mean value =  $0.56 \pm 0.03$  with  $n=29$  AOI).

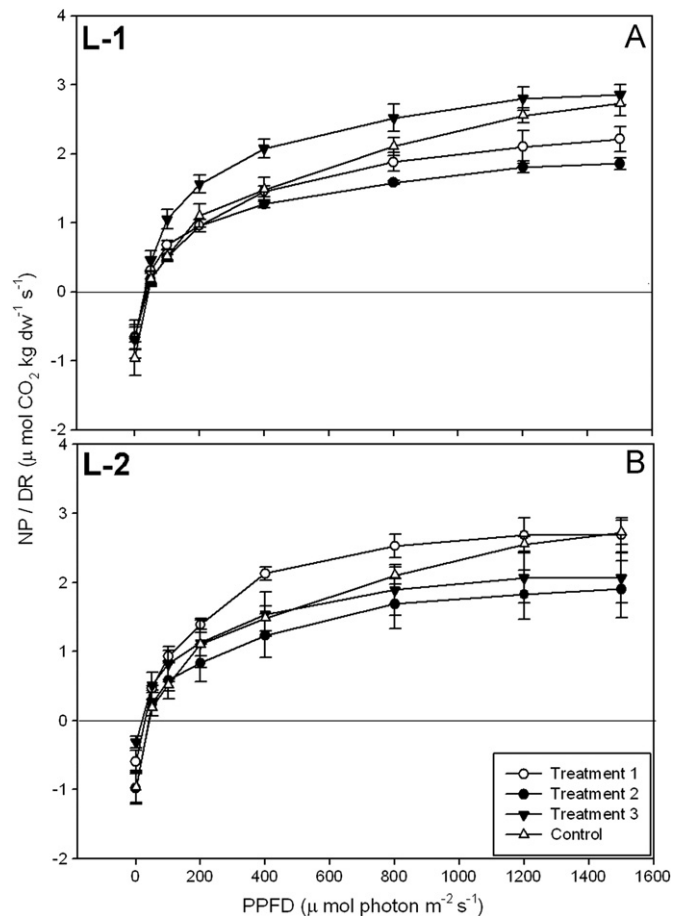
In Treatment 1 (Fig. 4a), the samples in the lower level-2 showed an insignificant decrease in MQY of  $0.61 \pm 0.07$ – $0.59 \pm 0.10$  in the pre- and post-exposure measurements, respectively. Also the samples in the upper level-1 showed an insignificant decrease ( $0.60 \pm 0.05$  to  $0.53 \pm 0.12$  in the pre- and post-exposure measurements). In Treatment 2 (Fig. 4b), level-2 samples (dark control) revealed an insignificant increase of MQY ( $0.51 \pm 0.14$  to  $0.60 \pm 0.05$ ), while the irradiated samples in level-1 exhibited no changes ( $0.54 \pm 0.10$  to  $0.54 \pm 0.10$ ). Treatment 3 tested the combined effect of simulated Mars UV-radiation, low temperature, and LEO vacuum ( $1 \times 10^{-6}$  mbar) on the MQY of *C. gyrosa* samples. Measurements before- and after exposure at level-2 and level-1 showed minor and insignificant decreases in MQY (from  $0.63 \pm 0.07$  to  $0.61 \pm 0.04$  and from  $0.61 \pm 0.05$  to  $0.59 \pm 0.05$ ). Comparison of these data with the non treated control samples (see above) and with the samples of the different tests showed no significant differences, in the pre- as well as in the post-exposure MQY.

These results lead to several conclusions: The comparability between samples in the upper and the lower level is demonstrated. The three different combinations of simulated Mars parameters have no significant effect on the MQY of *C. gyrosa*. By comparing the results obtained at Treatment 1 with Treatment 2 and of Treatment 2 with Treatment 3 it could be concluded that UV-radiation and LEO vacuum in isolated form have no effect on the lichen's MQY.

Afterwards the thalli were adjusted to sufficient water content and submitted to the light dependent gas exchange analysis. All samples revealed a comparable pattern of asymptotically rising net photosynthesis rates with rising light intensities and showed a trend of saturation at the highest light levels. Additionally, all samples measured on both levels showed similar light compensation points (minimum light to achieve positive net photosynthesis) between 50 and 100  $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , without signs of photoinhibition up to 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , the maximum PPFD applied. A Two-Way ANOVA analysis ( $P > 0.05$ ) was performed for maximal net photosynthetic and respiration rates of both levels (level-1 and level-2), and of the control samples. This statistical analysis demonstrated that the effect of the treatments was significant, independently of the location at the different levels or independently of the interaction between treatment and level. Complementarily to the Two-Way ANOVA analysis and in order to elucidate which treatments were the most influencing ones on the lichens physiological performance, two sets of T-student tests were carried out. On one hand all samples (level-1 and level-2) from each treatment were compared as a whole with the controls and on the other hand only level-1 samples were compared with the controls. No statistical differences were found except in the case of the comparison of Treatment 2 (UV radiation, Mars atmosphere and temperature) with the controls. The two sets of T-student tests for Treatment 2 revealed a significant difference after the comparison of the controls with samples from level-1 and level-2 simultaneously ( $P=0.09$ ) and with samples from level-1 exclusively ( $P=0.08$ ).

The following paragraph describes the results obtained with samples from level-1 (Fig. 5A): At the highest light intensity (PPFD of 1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) the samples of Treatment 2 showed the lowest value of  $1.85 \pm 0.16 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{s}^{-1}$ , which is significantly lower than the control ( $2.72 \pm 0.35 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{s}^{-1}$ ). Samples of Treatment 1 showed  $2.21 \pm 0.36 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{s}^{-1}$  as measure of net photosynthesis, which is insignificantly lower than the control. The photosynthetically most active group of samples at the highest PPFD was those of Treatment 3. At maximum PPFD a mean value of  $2.85 \pm 0.29 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{s}^{-1}$  was detected, which was slightly higher than the control mean value. Compared to the control, the  $\text{CO}_2$  uptake rates with the three treatments raised steeper at lower light intensities and narrowed earlier to their respective level of saturation. In case of the light dependent gas exchange curve of the control, the rising is a more constant process. By this effect, the net photosynthesis rate of Treatment 3 samples was higher than that of the control between light intensities of 100–1500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and the effect was more pronounced at lower light intensities. Beneath UV-radiation, the Treatment 3 samples were additionally subdued to extremely low pressure; a combination of both parameters and low temperature did not decrease the post-exposure net photosynthesis rate.

The results of the non-irradiated lower level-2 were as follows (Fig. 5B): The highest photosynthetic rate of Treatment 2 samples was obtained with 1500 PPFD with  $1.90 \pm 0.83 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{s}^{-1}$ , and thus was very close to the results of the corresponding level-1 measurements (see above). At Treatment 1 an average of  $2.68 \pm 0.49 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{s}^{-1}$  was reached, which is insignificantly higher to the value measured in the same treatment during the analysis of level-1 ( $2.21 \pm 0.36 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), according



**Fig. 5.** Gas exchange with standard error ( $n=4$ ) of Treatment 1 (Mars atmosphere and temperature), Treatment 2 (Mars atmosphere, temperature, and UV radiation) and Treatment 3 (vacuum atmosphere, temperature, and UV radiation) for both levels, level-1 (L-1, exposed to UV radiation during simulations) and level-2 (L-2, protected from UV radiation during simulations) at different photosynthetic photon flux densities (PPFD). Measurements were performed at 15 °C and optimum water contents.

to the fact that in Treatment 1 both layers remained non-irradiated. The photosynthetic rate of level-2 samples exposed to Treatment 3 was  $2.06 \pm 0.72 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{s}^{-1}$ , which is insignificantly lower than the corresponding results in the analysis of level-1 ( $2.85 \pm 0.29 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{s}^{-1}$ ).

If we compare the results obtained with the samples from level-2 and level-1, the analyses of Treatment 1 showed very similar values at the maximum PPFD of the control ( $2.68 \pm 0.49$  and  $2.72 \pm 0.35 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{s}^{-1}$ ), but a higher rate compared to the corresponding measurements in level-1 ( $2.68 \pm 0.49$  and  $2.21 \pm 0.36 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{s}^{-1}$ ). Treatment 2 analyses revealed an insignificant difference towards the control ( $1.90 \pm 0.83$  and  $2.72 \pm 0.35 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{s}^{-1}$ , as mentioned above), and a slight difference compared to the corresponding level-1 analysis ( $1.90 \pm 0.83$  and  $1.85 \pm 0.16 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{s}^{-1}$ ). The analyses of Treatment 3 results also revealed an insignificant difference between both levels, as has been explained above.

The comparison of all data exemplifies that only the UV-irradiated samples revealed a significant difference compared to the control, while the rest of tested parameters had no negative effect on the net photosynthetic rate.

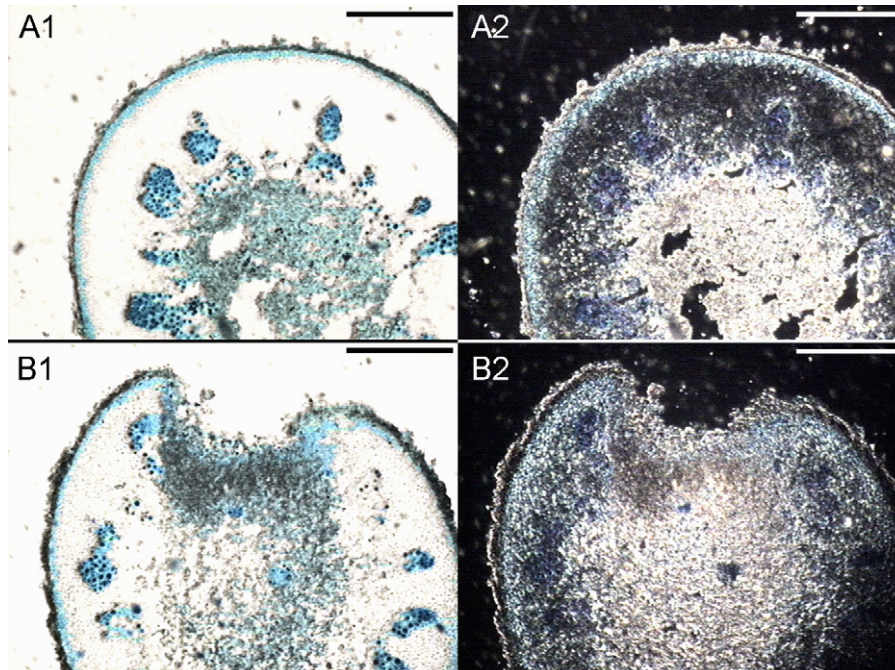
Dark respiration rates of all treatments on level-1 were very similar ( $0.67 \pm 0.32$ ,  $0.65 \pm 0.35$  and  $0.69 \pm 0.55 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{s}^{-1}$  for Treatments 1, 2 and 3 respectively), but lower than the control with  $0.97 \pm 0.49 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{s}^{-1}$ .

The samples of level-2 showed a higher variability in the respiration rates with  $0.31 \pm 0.17 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for Treatment 3 and  $0.98 \pm 0.41$ , as well as  $0.59 \pm 0.31 \mu\text{mol CO}_2 \text{ kg dw}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for Treatments 1 and 2, respectively. Despite the variability between the different respiration rates measured, no significant differences were detected after performing a Two-Way ANOVA analysis ( $P > 0.05$ ), neither in the effect of each treatment separately nor when analyzing the interaction between treatment and level.

While the analysis of MQY did not reveal any significant differences, the analysis of the net photosynthetic rate showed a significant effect when the samples were subdued to a combination of simulated Mars UV radiation, temperature, pressure and gas composition. Independently of the particular standard deviation of the different treatments, all samples showed healthy physiological conditions after the three simulations. This could be rather related to a high natural variability on gas exchange more than being an effect of the treatment itself, mainly knowing that the more aggressive treatment with absolute vacuum, UV radiation and temperature did not affect the metabolic performance significantly. Although we have found significant differences in net photosynthesis between the controls and the samples of Treatment 2 (simulated Mars atmosphere, pressure, UV radiation, and temperature), which did not occur in Treatment 1 and with the respective dark control, we did not find differences between level-1 and level-2 for Treatment 2. With these results the effect of added UV radiation in the simulation experiment cannot be considered severely harmful for *C. gyrosa*. Studies performed in the context of the LITHOPANSPERMIA-project (de la Torre et al., 2010) with *C. gyrosa* concerning the gas exchange rate of space exposed thalli revealed normal values of respiration and photosynthesis (Raggio et al., 2011).

The in-detail study of the morphological and anatomical characteristics of *C. gyrosa* revealed interesting insights that might help to explain the high resistance potential of the photobiont's

photosynthetic activity towards the harsh conditions of simulated Mars environment and provided evidence that confirms previous anatomical and morphological studies carried out by Sancho et al., 2000. The spherical fruticose thallus was made of dichotomous or sympodial branching which radially emerged from a central core. Thin sections of the lichen branches ( $15 \mu\text{m}$ ) (see Section 2.5) revealed interesting anatomical structures and internal stratification (Figs. 6A1 and 6A2). The whitish porous structures formed at the tips, the pseudocypheellae, play a major role in the gas exchange process (Figs. 6B1 and 6B2). The surface of the lichen was formed by a brownish pigmented, epinecral layer of  $24.3 \pm 9.5 \mu\text{m}$  in distal and  $20.8 \pm 0.9 \mu\text{m}$  in proximal branch sections, followed by a vital paraplectenchymatous layer of roughly isodiametric cells with  $21.4 \pm 2.4 \mu\text{m}$  in distal and  $18.3 \pm 1.3 \mu\text{m}$  in proximal branch sections. Below this layer, the lichen formed the unusual, compact, and very extended structure of an scleroplectenchymatous subcortex. This pronounced subcortex structure consisted of tightly packed fungal hyphae that were agglutinated by high amounts of extracellular gelatinous substances. The dimensions of the subcortex were  $147.1 \pm 29.0 \mu\text{m}$  in distal and  $125.7 \pm 13.0 \mu\text{m}$  in proximal branch sections, and thus can contribute to high mechanical stability, as well as acting as a diffusion barrier for gas exchange. It has been recently discussed that gelatinous substances may have UV-screening properties (de Vera et al., 2010b, 2003; Lütz et al., 1997 and Ortega-Retuerta et al., 2009) and accordingly could act as a radiation-protective layer. Directly below this, single and evenly distributed clusters of photobiont cells were located. The clusters were more frequently located in the upper parts of the branching next to the pseudocypheellae, generally revealed low abundance of algal cells, and do not form a continuous algal layer as it is found in other lichen species (e. g. *Xanthoria*- and *Peltigera*-species). The central tube of each branching, as well as the parts between the algal clusters were filled with a medulla-like fungal tissue that is rich in inner aerial spaces and connected to surrounding air by the pseudocypheellae. To prevent complete soaking with water under



**Fig. 6.** Thin layer sections of *Circinaria gyrosa*. These  $15 \mu\text{m}$  thick sections were obtained from representative specimen by using a freezing microtome (Slee MTC (FRG)  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) and subsequent staining with lactophenol cotton blue (Merck 13471). A light microscope (Leitz DMRB, FRG) was employed for the analysis and recording of the images. A1., A2. Light microscope photograph of the apical part of a branch showing the different parts: cortex, subcortex, algal clusters and inner medulla (bars= $200 \mu\text{m}$ ) A2. In polarized light, showing the refringent crystals. B1., B2. Light microscope photograph of a pseudocypheellae (bars= $200 \mu\text{m}$ ) B2. In polarized light, showing again the refringent crystals.

wet environmental conditions and thus facilitate efficient gas exchange also when wet, the loosely connected medullary hyphae were covered with extracellularly deposited crystals of yet unknown composition. The layer in which the algal clusters were embedded usually measured  $78.3 \pm 39.7 \mu\text{m}$  in distal and  $69.2 \pm 12.0 \mu\text{m}$  in proximal branch sections, while the inner medullary tube shows an average diameter of  $346.3 \pm 111.0 \mu\text{m}$  in distal and  $385.9 \pm 12.2 \mu\text{m}$  in proximal branch sections.

In the previous LITHOPANSPERMIA experiment *C. gyrosa* was exposed for 10 day on board of BIOPAN 6 (Foton M3 mission, 2007) to LEO vacuum ( $10^{-6}$  mbar), extraterrestrial radiation, and Mars UV radiation (200–400 nm). The lichen revealed no significant reduction of PSII activity, irrespective of the wavelength range applied, and demonstrated a high resistance towards real space-flight conditions (de la Torre et al., 2010 and Raggio et al., 2011). Regarding our study, the minor effect of simulated Mars conditions – but also of space conditions – on MQY and net photosynthetic rates can be partially interpreted as a result of the peculiar morphological–anatomical features of this lichen species. All the more, because it is discussed that species of the genus *Aspicilia* (Megasporaceae) (*Aspicilia* is the genus to which *C. gyrosa* belonged until a recent modification in taxonomic circumscription; see Sohrabi, 2012) do rarely form lichen substances, which are known for their UV-radiation screening properties. Some authors report that *A. candida*, *A. contorta* and *A. hispida* (Brodo et al., 2001) and *A. caesiocinerea* (Hale and Cole, 1988) show negative results on all tested lichen substances (changes in taxonomic circumscription of the cited species may soon apply according to the new taxonomic distribution proposed for the Megasporaceae family (Sohrabi, 2012)). Preliminary results on our own recent investigations towards the characterization of lichenic compounds in *C. gyrosa* seem to confirm the relative lack of lichen substances in this species (in prep.). Thus, the high resistance towards UV-radiation could be rather seen as a result of morphological–anatomical adaptations, for example the extended cortical layers, the UV-protective effect of subcortical gelatinous substances and the location of the few and clustered photobionts deeply below the epicortex.

Our results demonstrate that net photosynthetic rates in *C. gyrosa* are low. This confirms earlier research on its photosynthetic rate under varying water contents. Previous investigations also demonstrated that the low photosynthetic rate is determined rather by its relation to dry weight than by its relation to chlorophyll content (Sancho et al., 2000). However, it could be concluded that the low net photosynthetic rates are due to the low frequency of photobiont cells in the thallus, compared to other lichen species (Valladares et al., 1996).

#### 4. Conclusions

The simulation experiments presented here illustrate the first step to analyze the survival capacity of the eukaryotic symbiotic organism *C. gyrosa* under the influence of a combination of selected Martian environmental parameters, and at the same time, a further approach in the study of the high survival capacity of this extremophile organism towards the spatial environment already detected in the LITHOPANSPERMIA experiment (de la Torre et al., 2010, Raggio et al., 2011).

We report the high resistance and survival capacity of an eukaryotic symbiotic organism under simulated Mars and space conditions. Our results show that neither any of the Martian atmosphere and surface UV climate combinations nor LEO vacuum conditions induce a significant decrease in lichen's activity after an exposure of 120 h. It is important to highlight that the thalli present in level-1 were exposed without any protection to simulated Mars

and space conditions, especially unfiltered solar UV radiation, the most deleterious factor of space, which is directly absorbed by the DNA (Horneck, 1995, 1993).

The effect of the different combinations of simulated Martian parameters on PSII activity was insignificantly small, with a low influence on the net photosynthetic rate. The obtained data clearly show that in such complex studies, analysis of PSII activity might be complemented by additional methodological techniques, such as net photosynthetic rate measurements to assess the overall photosynthetic performance. From these results it can be concluded that the combination of the tested parameters did not impair severe damage on the overall photosynthetic system of the photobiont of *C. gyrosa*. Taking into account that the photobiont is considered to be the most sensitive symbiotic partner towards extreme environmental conditions, the results imply the capacity of *C. gyrosa* to survive conditions that are far more extreme than those experienced in its specific habitats on Earth, in respect to gas composition, pressure and UV-dose.

The results of previous studies with other extremophile lichen species under Mars-like conditions (atmosphere, temperature and humidity) for a period of 22 day revealed no significant decrease in the vitality of the tested organism (de Vera et al., 2010a).

This new data together with precedent results that showed extraordinary levels of resistance towards space- and simulated planetary environments (de la Torre et al., 2010; de Vera et al., 2010a, 2004a, 2003; de Vera and Ott, 2010; Onofri et al., 2012; Raggio et al., 2011; Sancho et al., 2009, 2007) lead to think that the ability of lichens – as poikilohydrous organisms – to survive unsuitable environmental conditions could be due to a more general adaptation of lichens. This is the ability to pass into an ametabolic state which is referred to as anabiosis, cryptobiosis, or more specifically, anhydrobiosis. As unfavorable environmental conditions (high insolation levels, high and very low temperatures) are often correlated to drought, anhydrobiosis might be interpreted as a stress-avoiding dessication strategy. A combination of both, anhydrobiosis and morphological–anatomical adaptations might explain why *C. gyrosa* resists the applied simulated Mars and space conditions.

The experimental evidence obtained with *C. gyrosa* under extraterrestrial environments suggests that this species is a good model system for further studies on resistance, survival and related astrobiological topics, especially if focussing on eukaryotic and/or symbiotic questions.

The results of the present study under simulated LEO vacuum in combination with the high survival rates towards real LEO conditions detected after the LITHOPANSPERMIA space experiment (de la Torre et al., 2010) reinforce the interest in the plausible hypothesis of Lithopanspermia (transfer of organisms by means of meteorites). Nonetheless, recent and previous results are not sufficient to make any general assumption on the likelihood of Lithopanspermia's hypothesis due to the fact that the timescale used in the experiments is not at all comparable with the interplanetary or interstellar passage (Horneck, 1998). Long-term studies allowing the extrapolation to interplanetary or interstellar time-spans are required.

Complementarily, the relevance of simulation chamber facilities as an essential instrumentation to emulate planetary conditions and therefore to test the habitability of biological organisms under the influence of the Martian environment, as well as to accomplish with other interdisciplinary astrobiological topics has been demonstrated.

#### Acknowledgments

The authors would like to express their sincere gratitude to Mercedes Vivas for her help during the statistical analysis, to Manuel

Reina Aranda for his technical support in the design and manufacture of the simulation hardware, to Dr. D. Hochberg for a careful reading of the manuscript, to J.A. Martín-Gago for his support in the design and setup of PASC, to J.M. Sobrado for technical maintain of PASC and to Dr. Gerda Horneck for her continuous support, scientific assessment and encouraging discussions. Martian environmental simulations were carried out at Centro de Astrobiología (CAB) and were supported by the European Union, the Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial-INTA and the Ministerio de Ciencia e Innovación (AYA2010-11422-E (Subprograma ESP), CGL2006-12179-C02-01 and CTM2009-12838-C04-01). The morphological-anatomical studies included in this article were funded by the German Aerospace Center (DLR) in the frame of the ESA-space experiment BIOMEX (ILSRA ESA-ILSRA 2009-0834, P-I Dr. Jean P. de Vera). The main author was recipient of a Ph.D. scholarship during the development of this article given by the Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial-INTA.

## References

- Baker, V.R., Strom, R.G., Gulick, V.C., Kargel, J.S., Komatsu, G., Kale, V.S., 1991. Ancient oceans, ice sheets and the hydrological cycle on Mars. *Nature* 352, 589–594.
- Beatty, D.W., Clifford, S.M., Borg, L.E., Catling, D.C., Craddock, R.A., Des Marais, D.J., Farmer, J.D., Frey, H.V., Haberle, R.M., McKay, C.P., Newsom, H.E., Parker, T.J., Segura, T., Tanaka, K.L., 2005. Key science questions from the second conference on early Mars: geologic, hydrologic, and climatic evolution and the implications for life. *Astrobiology* 5(6), 663–689.
- Brodo, I.M., Sharnoff, S.D., Sharnoff, S., 2001. *Lichens of North America*. Yale University Press, New Haven and London.
- Carr, M.H., 1986. Mars: a water-rich planet? *Icarus* 56, 187–216.
- Davila, A.F., Skidmore, M., Fairén, A.G., Cockell, C., Schulze-Makuch, D., 2010. New priorities in the robotic exploration of Mars: the case for in situ search for extant life. *Astrobiology* 10 (7), 705–710.
- de la Torre Noetzel, R., Sancho, L.G., Pintado, A., Rettberg, P., Rabbow, E., Panitz, C., Deutschmann, U., Reina, M., Horneck, G., 2007b. BIOPAN experiment LICHENS on the Foton M2 mission: Pre-flight verification tests of the Rhizocarpon geographicum-granite ecosystem. *Advances in Space Research* 40, 1665–1671.
- 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., Luca, 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, 735–748.
- 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, 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. *Advances in Space Research* 33, 1236–1243.
- de Vera, J.-P., Möhlmann, D., Butina, F., Lorek, A., Wernecke, R., Ott, S., 2010a. 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., 2010b. 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, vol. 17, pp. 595–611.
- Galletta, G., Ferri, F., Fanti, G., D'Alessandro, M., Bertoloni, G., Pavarin, D., Bettanini, C., Cozza, P., Pretto, P., Bianchini, G., Debei, S., 2006. S.A.M., the Italian Martian Simulation Chamber. *Origins of Life and Evolution of Biosphere* 36(5–6), 625–627.
- Garry, J.R.C., Ten Kate, I.L., Martins, Z., Nornberg, P., Ehrenfreund, P., 2006. Analysis and survival of amino acids in Martian regolith analogs. *Meteoritics and Planetary Science* 41 (3), 391–405.
- Gómez, F., Mateo-Martí, E., Prieto-Ballesteros, O., Martín-Gago, J.A., Amils, R., 2010. Protection of chemolithoautotrophic bacteria exposed to simulated mars environmental conditions. *Icarus* 209, 482–487.
- Green, T.G.A., 2009. Lichens in Arctic, Antarctic and Alpine ecosystems. In: *Ökologische Rolle der Flechten. Rundgespräche der Kommission für Ökologie* 36. Bayerische Akademie der Wissenschaften (Herausgeber), Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, pp. 45–65.
- Green, T.G.A., Brabyn, L., Beard, C., Sancho, L.G., 2011. High diversity of lichens at 84°S, Queen Maud Mountains, suggest preglacial survival of species in the Ross Sea region, Antarctica. *Polar Biology* 34 (8), 1211–1220.
- Hale, M.E., Cole, M., 1988. *Lichens of California*. California Natural History Guides: 54. University of California Press, Berkeley, Los Angeles.
- Hess, S.L., Henry, R.M., Leovy, C.B., Ryan, J.A., Tillman, J.E., 1977. Meteorological results from the surface of Mars: Viking 1 and 2. *Journal of Geophysical Research* 82, 4559–4574.
- Horneck, G., 1993. Responses of *Bacillus subtilis* spores to space environment: results from experiments in space. *Origins of Life* 23, 37–52.
- 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., 1995. Exobiology, the study of the origin, evolution and distribution of life within the context of cosmic evolution: a review. *Planetary and Space Science* 43, 189–217.
- Horneck, G., 1998. Exobiological experiments in Earth orbit. *Advances in Space Research* 22 (3), 317–326.
- Horneck, G., 2000. The microbial world and the case for Mars. *Planetary and Space Science* 48 (11), 1053–1063.
- Jensen, L.L., Merrison, J., Hansen, A.A., Mikkelsen, K.A., Kristoffersen, T., Nørnberg, P., Lomstein, B.A., Finster, K., 2008. A facility for long-term mars simulation experiments: the mars environmental simulation chamber (MESCH). *Astrobiology* 8(3), 537–548.
- Kappen, L., 1983. Ecology and Physiology of the Antarctic Fruticose Lichen *Usnea sulphurea* (Koenig) Th. Fries. *Polar Biology* 1, 249–255.
- 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.
- Martin, T.Z., Bridges, N.T., Murphy, J.R., 2003. Near-surface temperatures at proposed Mars exploration Rover landing sites. *Journal of Geophysical Research* 108 (8089), 7.
- Mateo-Martí, E., Prieto-Ballesteros, O., Sobrado, J.M., Gómez-Elvira, J., Martín-Gago, J.A., 2006. A chamber for studying planetary environments and its applications to astrobiology. *Measurement Science and Technology* 17, 2274–2280.
- McKay, C.P., 1997. The search for life on Mars. *Origin of Life and Evolution of Biosphere* 27, 263–289.
- Mehta, M., Renno, N.O., Marshall, J., Grover, M.R., Sengupta, A., Rusche, N.A., Kok, J.F., Arvidson, R.E., Markiewicz, W.J., Lemmon, M., Smith, P.H., 2011. Explosive erosion exposes the subsurface ice on Mars. *Icarus* 211, 172–194.
- Muñoz-Caro, G.M., Mateo-Martí, E., Martínez-Frías, J., 2006. Near-UV transmittance of basalt dust as an analog of the Martian regolith: implications for sensor calibration and astrobiology. *Sensors* 6, 688–696.
- Murphy, J.R., Leovy, C.B., Tillman, J.E., 1990. Observations of Martian surface winds at the Viking Lander 1 site. *Journal of Geophysical Research* 95, 14,555–14,576.
- Nelli, S.M., Renno, N.O., Murphy, J.R., Feldman, W.C., 2010. Simulations of atmospheric phenomena at the phoenix landing site with the Ames GCM. *Journal of Geophysical Research* 115, E00E21, Special Issue on Phoenix.
- Nicholson, W.L., Schuerger, A.C., 2005. *Bacillus subtilis* spore survival and expression of germination-induced bioluminescence after prolonged incubation under simulated mars atmospheric pressure and composition: implications for planetary protection and lithopanspermia. *Astrobiology* 5(4), 536–544.
- Olsson-Francis, K., de la Torre, R., Towner, M., Cockell, C.S., 2009. Survival of akinetes (resting-state cells of Cyanobacteria) in low earth orbit and simulated extraterrestrial conditions. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 39, 565–579.
- Onofri, S., Barreca, D., Selbmann, L., Isola, D., Rabbow, E., Horneck, G., de Vera, J.P.P., Hattton, J., Zucconi, L., 2008. Resistance of Antarctic black fungi and cryptolith communities to simulated space and Martian conditions. *Studies in Mycology* 61, 99–109.
- Onofri, S., de la Torre, R., de Vera, J.P., Ott, S., Zucconi, L., Selbmann, L., Scalzi, G., Venkateswaran, K.J., Rabbow, E., Sánchez, F.J., Horneck, G., 2012. Survival of rock-colonizing organisms after 1.5 year 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. *Biogeosciences Discussions* 6, 7599–7625.
- Owen, T.C., 1992. *The Composition and Early History of the Atmosphere of Mars*. Mars. University of Arizona Press, Tucson.
- Patel, M.R., Bérces, A., Kerékgyárt, T., Rontó, Gy., Lammer, H., Zarnecki, J.C., 2004. Annual solar UV exposure and biological effective dose rates on the Martian surface. *Advances in Space Research* 33 (8), 1247–1252.
- Pintado, A., Sancho, L.G., Green, T.G.A., Blanquer, J.M., Lázaro, R., 2004. Functional ecology of the biological soil crust in semiarid SE Spain: sun and shade populations of *Diploschistes diacapsis* (Ach.) Lumbsch. *Lichenologist* 37 (5), 425–432.
- de los Ríos, A., Wierzchos, J., Sancho, L.G., Green, T.G.A., Ascaso, C., 2005. Ecology of endolithic lichens colonizing granite in continental Antarctica. *Lichenologist* 37 (5), 383–395.
- 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.
- Sancho, L.G., Schroeter, B., Valladares, F., 1997. Photosynthetic performance of two closely related Umbilicaria species in Central Spain: temperature as a key factor. *Lichenologist* 29 (1), 67–82.
- Sancho, L.G., Schroeter, B., Del-Prado, R., 2000. Ecophysiology and morphology of the globular erratic lichen *Aspicilia fruticulosa* (Evers.) Flag. from Central Spain. *Bibliotheca Lichenologica* 75, 137–147.
- Sancho, L.G., 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, L.G., de la Torre, R., Pintado, A., 2009. Lichens, new and promising material from experiments in astrobiology. *Fungal Biology Reviews* 22, 103–109.

- Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C., 1994. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E.D., Cadwell, M.M. (Eds.), *Ecophysiology of Photosynthesis*, vol. 1. Springer, Berlin, Heidelberg, NY, pp. 49–70.
- Sears, D.W.G., Benoit, P.H., McKeever, S.W.S., Banerjee, D., Kral, T., Suites, W., Roe, L., Jansma, P., Mattioli, G., 2002. Investigation of biological, chemical and physical processes on and in planetary surfaces by laboratory simulation. *Planetary and Space Science* 50-9, 821–828.
- Smith, D.J., Schuerger, A.C., Davidson, M.M., Pacala, S.W., Bakermans, C., Onstott, T.C., 2009. Survivability of psychrobacter cryohalolentis K5 under simulated Martian surface conditions. *Astrobiology* 9 (2), 221–228.
- Sohrabi, M., 2012. Taxonomy and Phylogeny of the Manna Lichens and Allied Species (Megasperaceae). Ph.D. Thesis. Publications in Botany from the University of Helsinki. <<http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-10-7400-4>>.
- Tanaka, K.L., 1986. The stratigraphy of Mars. *Journal of Geophysical Research* 91, E139–E158.
- Tillman, J.E., 1988. Mars global atmospheric oscillations: annually synchronized, transient normal-mode oscillations and the triggering of global dust storms. *Journal of Geophysical Research* 93 (D8), 9433–9451.
- Valladares, F., Sancho, L.G., Ascaso, C., 1996. Functional analysis of the intrathalline and intracellular chlorophyll concentrations in the lichen family Umbilicariaceae. *Annals of Botany* 78, 471–476.
- Zhukova, A.I., Kondratyev, I., Ondratyev, I.I., 1965. On artificial Martian conditions reproduced for microbiological research. *Life Sciences and Space Research* 3, 120–126.
- Zill, L.P., Mack, R., Devincenzi, D.L., 1979. Mars ultraviolet simulation facility. *Journal of Molecular Evolution* 14 (1–3), 79–89.
- Zorzano, M.P., Mateo-Martí, E., Prieto-Ballesteros, O., Osuna, S., Renno, N., 2009. The stability of liquid saline water on present day Mars. *Geophysical Research Letters* 36, L20201.



# Publicación II

Sánchez, F.J.; Meeßen, J.; Ruiz, M.C.; Sancho, L.G<sup>a</sup>; Ott, S.; Vílchez, C.; Horneck, G.; de la Torre, Rosa. 2014. **UV-C tolerance of symbiotic *Trebouxia* sp. in the space-tested lichens species *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: role of the hydration state and cortex/screening substances.** International Journal of Astrobiology, 13 (1): 1-18

**Resumen:** Algunos experimentos han sido llevados a cabo para evaluar la capacidad de supervivencia de especies de líquenes extremotolerantes al enfrentarse a condiciones adversas, incluidas las del espacio exterior o simulaciones del ambiente marciano. Para permitir un avance en esa investigación, es necesario un estudio en profundidad de los mecanismos fisiológicos que confieren los inesperados niveles de resistencia detectados en estos organismos simbióticos. En este trabajo se estudia la respuesta del alga verde liquenizada *Trebouxia* sp. (un fotobionte liquénico predominante) a dosis crecientes de radiación UV-C. La radiación de esta longitud de onda (uno de los factores ambientales más letales del espacio junto con el vacío y la radiación cósmica ionizante con partículas HZE) ha sido aplicada en los presentes experimentos hasta una dosis máxima análoga a 67 días en LEO. En este experimento se emplearon dos especies de líquenes extremotolerantes ya evaluadas en el espacio, para las cuales *Trebouxia* sp. es el simbiote fotosintético: el líquen crustáceo *Rhizocarpon geographicum* y el líquen fruticuloso *Circinaria gyrosa*. Con el fin de evaluar el efecto del estado fisiológico del talo liquénico (activo mientras está húmedo, latente mientras está seco) y de las estructuras protectoras (córtez, pigmentos fotoprotectores) en la resistencia del fotobionte a la radiación UV-C, se evaluaron cuatro condiciones experimentales diferentes: 1) muestras secas e intactas, 2) muestras húmedas e intactas, 3) muestras secas sin córtex/lavadas con acetona y 4) muestras húmedas sin córtex/lavadas con acetona. Tras la irradiación y un período de recuperación de 72 horas, la influencia de la radiación UV-C sobre el fotobionte liquénico bajo cada aproximación experimental se evaluó por medio de dos métodos complementarios: 1) Determinando la actividad del PSII (fluorómetro Mini-PAM) cada 24h en tres intervalos sucesivos, para investigar el estado general del proceso fotosintético y la capacidad de recuperación de *Trebouxia* sp. 2) Realizando una cuantificación por HPLC de cuatro pigmentos fotosintéticos esenciales (clorofila *a*, clorofila *b*,  $\beta$ -caroteno y luteína) en una muestra de cada una de las dos especies por dosis aplicada. Los resultados indican que el estado fisiológico del talo es el factor más importante que influye en la tolerancia de *Trebouxia* sp. a la radiación UV-C para ambas especies de líquenes. Los talos secos demostraron una mayor resistencia al UV-C. No se detectó una influencia clara de la radiación UV-C respecto al contenido de carotenoides. Comparando las dosis aplicadas, los individuos de *Rhizocarpon geographicum* son más sensibles que los de *Circinaria gyrosa*.



# 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

Francisco Javier Sánchez<sup>1</sup>, Joachim Meeßen<sup>2</sup>, M.<sup>a</sup> del Carmen Ruiz<sup>3</sup>, Leopoldo G.<sup>a</sup> Sancho<sup>4</sup>, Sieglinde Ott<sup>2</sup>, Carlos Vílchez<sup>3</sup>, Gerda Horneck<sup>5</sup>, Andres Sadowsky<sup>2</sup> and Rosa de la Torre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Observación de la Tierra, INTA – Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial, Ctra. Ajalvir km. 4, Torrejón de Ardoz, 28850 Madrid, Spain  
e-mail: sanchezfj@gmail.com

<sup>2</sup>Institute of Botany, Heinrich-Heine University, Universitätsstr.1, 40225 Düsseldorf, Germany

<sup>3</sup>International Centre for Environmental Research (CIECEM), Universidad de Huelva (UHU), Parque Dunar, Almonte, 21760 Huelva, Spain

<sup>4</sup>Departamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (UCM), 28040 Madrid, Spain

<sup>5</sup>German Aerospace Center (DLR), Institute of Aerospace Medicine, Radiation Biology Division, 51170 Cologne, Germany

**Abstract:** Many experiments were carried out in order to evaluate the survival capacity of extremotolerant lichens when facing harsh conditions, including those of outer space or of simulated Martian environment. For further progress, a deeper study on the physiological mechanisms is needed that confer the unexpected levels of resistance detected on these symbiotic organisms. In this work, the response of the lichenized green algae *Trebouxia* sp. (a predominant lichen photobiont) to increasing doses of UV-C radiation is studied. UV-C (one of the most lethal factors to be found in space together with vacuum and cosmic-ionizing radiation with high atomic number and energy (HZE) particles) has been applied in the present experiments up to a maximum dose analogue to 67 days in Low Earth Orbit (LEO). For that purpose we selected two extremotolerant and space-tested lichen species in which *Trebouxia* sp. is the photosynthetic partner: the crustose lichen *Rhizocarpon geographicum* and the fruticose lichen *Circinaria gyrosa*. In order to evaluate the effect of the physiological state of the lichen thallus (active when wet and dormant when dry) and of protective structures (cortex and photoprotective pigments) on the resistance of the photobiont to UV-C, four different experimental conditions were tested: (1) dry intact samples, (2) wet intact samples, (3) dry samples without cortex/acetone-rinsed and (4) wet samples without cortex/acetone-rinsed. After irradiation and a 72 hours period of recovery, the influence of UV-C on the two lichen's photobiont under each experimental approach was assessed by two complimentary methods: (1) By determining the photosystem II (PSII) activity in three successive 24 hours intervals (Mini-PAM fluorometer) to investigate the overall state of the photosynthetic process and the resilience of *Trebouxia* sp. (2) By performing high performance liquid chromatography (HPLC)-quantification of four essential photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, chlorophyll *b*,  $\beta$ -carotene and lutein) of one sample of each species and dose. Results indicate that the physiological state of the thallus is the most important factor impairing the tolerance of *Trebouxia* sp. to UV-C radiation in both lichen species. Desiccated thalli were demonstrated to be more resistant to UV-C. No clear influence of UV-C radiation on the carotenoid content was detected. Comparing the respective doses applied, the individuals of *R. geographicum* are more sensitive than *C. gyrosa*.

Received 16 June 2013, accepted 20 July 2013, first published online 6 September 2013

**Key words:** *Trebouxia* sp., *Rhizocarpon geographicum*, *Circinaria gyrosa*, extremophile, UV-C radiation, Astrobiology.

## Introduction

The term lichen refers to mutualistic symbiotic organisms composed of a fungus which is intimately associated with a photosynthetic partner (algae or cyanobacteria or sometimes both) and resulting in an autotrophic form of life that uses the

carbohydrates produced by the photosynthetic partner to live (Gargaud *et al.* 2011). This successful symbiosis comprises of about 17 500 species and dominates about 8% of the Earth's terrestrial surface (Brodo *et al.* 2001) although lichen diversity might be much higher (Lumbsch *et al.* 2011). Lichen symbioses involve more than 14 000 fungi (~ 19% of all known fungal

species, Kirk *et al.* 2001) and about 100 species of green algae and cyanobacteria (Nash 2008). Cyanobacteria are the oldest oxygenic organisms, having evolved 3500 to 2800 million years (Ma) ago (Olson 2006) while algae are supposed to have appeared between 1000 and 1500 Ma ago (Hedges *et al.* 2004; Yoon *et al.* 2004). Both events occurred long before the evolution of land plants (425–490 Ma, Sanderson 2003) or lichen-forming fungi (about 500 Ma ago, Floudas *et al.* 2012). During the period in which cyanobacteria evolved (3500 to 2800 Ma ago), the terrestrial atmospheric structure was remarkably different from the current one with little or no free oxygen and accordingly no ozone layer to block shortwave UV radiation (UV-C and UV-B). Thus, unfiltered solar UV radiation (UVR) at much higher doses than at present reached the Earth's surface, including harmful UV-C (Kasting 1993; Castenholz & Garcia-Pichel 2002, 2012). Accordingly, cyanobacteria and other early organisms are supposed to have developed mechanisms towards UVR tolerance during that time. Regarding UV-A and UV-B effects on modern organisms, resistance capacities against radiation are more developed in organisms living in exposed habitats compared with those living in more protected environments (van de Poll *et al.* 2002).

UVR has been a driving force for the evolution of life on Earth, acting both as a mutagen and as a selective agent (Rothschild & Cockell 1999; Rettberg & Rothschild 2002). The most lethal factor of the space environment, targeting DNA molecules and consequently having a deleterious effect on cells, is the full spectrum of solar UVR (Horneck 1999; Nicholson *et al.* 2005). Owing to the UV-shielding effect provided by the stratospheric ozone layer and other atmospheric components, the UV irradiance decreases from about  $140 \text{ W m}^{-2}$  above the atmosphere to about  $32 \text{ W m}^{-2}$  on the Earth's surface. The UVR reaching the Earth's surface is composed of UV-A (315–400 nm,  $63 \text{ W m}^{-2}$ , 92.3% of total UVR), a small fraction of UV-B (280–320 nm,  $5 \text{ W m}^{-2}$ , 7.4%) and a negligible percentage of UV-C (200–280 nm,  $<0.1 \text{ W m}^{-2}$ ,  $<0.1\%$ , according to Tevini & Häder 1985). Photosynthetic organisms use the light energy of the solar radiation to convert carbon dioxide and water into the sugars that will be used by the organism to fuel its biological functions. These organisms have not only evolved towards a maximal efficiency in the Sun's energy catchment in the 'photosynthetically active' range (PAR, 400–700 nm) where the solar energy output is maximum ( $\sim 43\%$ , Nicholson *et al.* 2005) but also have developed different mechanisms to tolerate, counteract or avoid the UVR (essentially UV-A and a minor percentage of UV-B) that inevitably reaches their reaction centres (Larkum and Wood 1993). As many lichens dominate in areas with intense solar irradiation (Solhaug *et al.* 2003) and endure harmful levels of this stressing factor (Sonesson *et al.* 1995; Sass & Vass 1998), lichens have been intensively studied on their resistance to UVR. Several aspects were of special interest: the influence of UVR on lichen physiology in terms of secondary compounds synthesis induction (Solhaug & Gauslaa 1996, 2004; Buffoni Hall 2002; Solhaug *et al.* 2003), biomass growth (Larsson *et al.* 2009), adaptations for increased survivability (Nybakken *et al.*

2004) as well as effects upon the photosynthesizing symbiont (Wynn-Williams *et al.* 2000).

UVR (especially shortwave) imposes a dramatical threat on organisms (Horneck 1999; Nicholson *et al.* 2005) and causes indirect or direct damage on proteins, RNA and – most important – DNA. Indirect damage on DNA means that UVR induces the formation of reactive oxygen species (ROS), which react with DNA and impose oxidative stress (Horneck *et al.* 2006). Direct damage is caused by UVR-absorption of DNA itself (mostly around the absorption peak of DNA at 260 nm) and subsequent formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and 6,4 photoproducts (6,4-PPs). Such dimers alter DNA structure, hinder replication and are mutagenic (Britt 1999). Some investigations have been done to assess how DNA is influenced by UVR in some lichen species (Buffoni Hall 2002; Rozema *et al.* 2002; Ünal & Uyanıkgil 2011), but still little is known about how lichens repair UVR-induced damages. De Vera (2005) demonstrated after 5, 10 and  $20 \text{ kJ m}^{-2}$  of UV-C<sub>254nm</sub> irradiation a dose-correlated formation of photoproducts in *Xanthoria elegans*. They were detected in the isolated photobiont (up to 90 photoproducts per  $10^4$  bp) and in intact thalli (up to 9 photoproducts per  $10^4$  bp) which are comprised of photobiont cells to  $\sim 10\%$  thallus dry weight (TDW). In contrast, the isolated mycobiont and mycobiont-formed tissues as apothecia did not form photoproducts under the respective UV-C doses. However, UVR is discussed to harm the photosynthetic apparatus by producing ROS that degrade the D1/D2 complex which is a central element of the photosystem II (PSII) (Jansen *et al.* 1999).

Long before space exposure experiments with lichens, many lichen species were found to be extraordinarily resistant to temperature fluctuations and to desiccation stress (Lange 1953) and their physiological adaptations to harsh environments were studied thoroughly; from the coldest polar areas to the deserts with the highest temperatures. In Antarctic lichens, gas exchange was measured down to about  $-20^\circ\text{C}$  and positive net photosynthesis take place even at  $-17^\circ\text{C}$  (Kappen *et al.* 1996), while extended desert areas are covered by lichen vegetation in regions where the average annual precipitation is lower than 13 mm (Lange *et al.* 2007). Owing to their extremotolerant character, they were considered as suitable candidates for astrobiological exposure experiments in Low Earth Orbit (LEO, unshielded solar UVR (UV $>170$  nm), cosmic radiation, temperature fluctuations from  $-23^\circ\text{C}$  to  $+60^\circ\text{C}$  and vacuum of  $\sim 10^{-6}$  Pa), which cause extreme desiccation, thermal stress as well as molecular and cellular damages by cosmic and solar radiation. The main aim of such experiments was to assess the survival capacity of lichens towards these conditions (Sancho *et al.* 2007, 2008).

The first astrobiology experiments that involved the exposure of lichens to space were carried out in three consecutive space missions: *Lichens* on the satellite FOTON M-2 in 2005 (Sancho *et al.* 2007), *Lithopanspermia* on FOTON M-3 in 2007 (de la Torre *et al.* 2010; Sánchez *et al.* 2010; Raggio *et al.* 2011) and *LIFE* on EXPOSE-E/EuTEF at the International Space Station (ISS) in 2008 (Onofri *et al.* 2012;

Scalzi *et al.* 2012). The first two experiments (that lasted approximately 15 and 10 days, respectively) demonstrated the high resistance and survival capacity of the species included, showing minimal changes in the vitality and a stable ultrastructure of the samples (Sancho *et al.* 2007; de la Torre *et al.* 2010). The third experiment with a duration of 1.5 years revealed lower rates of survivability (Onofri *et al.* 2012). After the positive results of post-flight viability obtained in the previously described experiments, lichens were considered among the most resistant terrestrial organisms (Sancho *et al.* 2008; de los Ríos *et al.* 2010) and proposed to be ideal candidates for astrobiological research, focusing on their potential for intense studies about life's limits and to test the Lithopanspermia hypothesis on its plausibility (Sancho *et al.* 2008; de la Torre *et al.* 2010). Once the extremotolerant character of lichens was demonstrated, a systematical approach to explain the specific mechanisms of lichen resistance is required. One approach is to separately assess the influence of each space parameter on the physiology of both lichen symbionts. The high rates of survival rates after space exposure aroused interest in the unexpectedly high resistance of lichens towards UV-C (a stressor not existing on Earth) aroused the interest of the scientific community. It is now in focus of recent research to understand how these organisms are influenced by UV-C. The work done by de Vera & Ott (2010b) was the first to individually analyse the single effect of artificial UV-C doses (from  $2.1 \text{ J m}^{-2}$  to  $201.6 \text{ J m}^{-2}$ ) on the resistance and viability of different lichen species from different habitats, detecting differences in the degree of viability that depend on the environmental conditions of the respective habitat. Organisms from areas with intense sun exposure and thus high UVR insolation have shown a greater resistance towards the space environment (de Vera and Ott 2010b). This first attempt to assess the effect of UV-C on lichens confirmed previous results: the bionts from the more naturally exposed to UVR lichen species *Buellia frigida* and *X. elegans* revealed a minor decrease in viability after the different UV-C exposures, neither while desiccated nor while wet. On the contrary, the lichen *Peltigera aphthosa* – more adapted to shady conditions – was severely affected by UV-C even at the lowest doses.

Desiccation tolerance mechanisms of *Trebouxia* sp. has been intensely studied (Gasulla 2009), while just a little is known about their UVR tolerance mechanisms. In the present study we focus on the effects of UV-C radiation upon *Trebouxia* sp. (phylum Chlorophyta, class Trebouxiophyceae), which is the photobiont of two previously space-tested lichen species: *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*. *R. geographicum* was tested in the space exposure experiments *Lichens*, *Lithopanspermia* and *LIFE* as well as *C. gyrosa* in *Lithopanspermia* (references above). Owing to its remarkable ability in resisting space conditions, *C. gyrosa* was also used in a series of Mars simulation experiments that revealed a high survivability to short periods (Sánchez *et al.* 2012). Based on such extremotolerance, *C. gyrosa* will be exposed to LEO parameters and simulated Mars conditions for a period of 15–18 months during the BIOMEX experiment (ESA call ILSRA-AO 2009) to be launched in April 2014

and exposed to the EXPOSE-R2 facility on board the ISS (de Vera *et al.* 2012).

The *Trebouxia*-photobiont was investigated when integrated in both lichen thalli and the astrobiological implications of the present results are discussed. We paid deeper attention to the damage on the PSII (Teramura & Sullivan 1994), the associated decrease on its photosynthetic efficiency and performance (Bornman 1989; Strid *et al.* 1990) as well as to the UV-C induced accumulation and/or degradation of the photosynthetic pigments chlorophyll *a* (chl *a*) and *b* (chl *b*) and two major accessory pigments with UVR screening properties:  $\beta$ -carotene and lutein. Chl *a* and chl *b* are crucial in photosynthesis and may indicate the state of the photosynthetic process in UV-C exposed *Trebouxia* sp. photobionts.

In lichens, UVR resistance is conferred by screening compounds that are a heterogeneous group of secondary lichen compounds (SLCs) with varying biosynthetic pathways (Huneck & Yoshimura 1996) and whose synthesis is induced by UVR (Buffoni Hall 2002; Solhaug *et al.* 2003). In lichens with a green algae as photobiont, polyphenolic compounds such as usnic acid and parietin are the most frequent UVR-screening compounds. Scytonemin is the most abundant in cyanobacteria-containing lichens (Cockell & Knowland 1999). UVR-screening compounds represent a ubiquitous and effective method to reduce irradiation damage (Cockell & Knowland 1999) that has been also proposed as a possible survival strategy in extraterrestrial habitats exposed to UV-C (Wynn-Williams *et al.* 2002a).

The lichen thalli were subjected to increasing doses of UV-C in a range from  $2.5 \times 10^6$  to  $7.2 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$  under four different experimental conditions. The main objectives of this study were (1) to assess the influence of UV-C radiation as a single stressor upon *Trebouxia* sp., (2) to confirm the role of the metabolic state (active or inactive) of the thalli in terms of damage avoidance capability, (3) to study the protective role of pigments/cortex against UV-C radiation and (4) to deepen the understanding of the specific role of UVR resistance in the overall resistance capacity of the lichen symbiosis.

## Materials and methods

### Biological samples

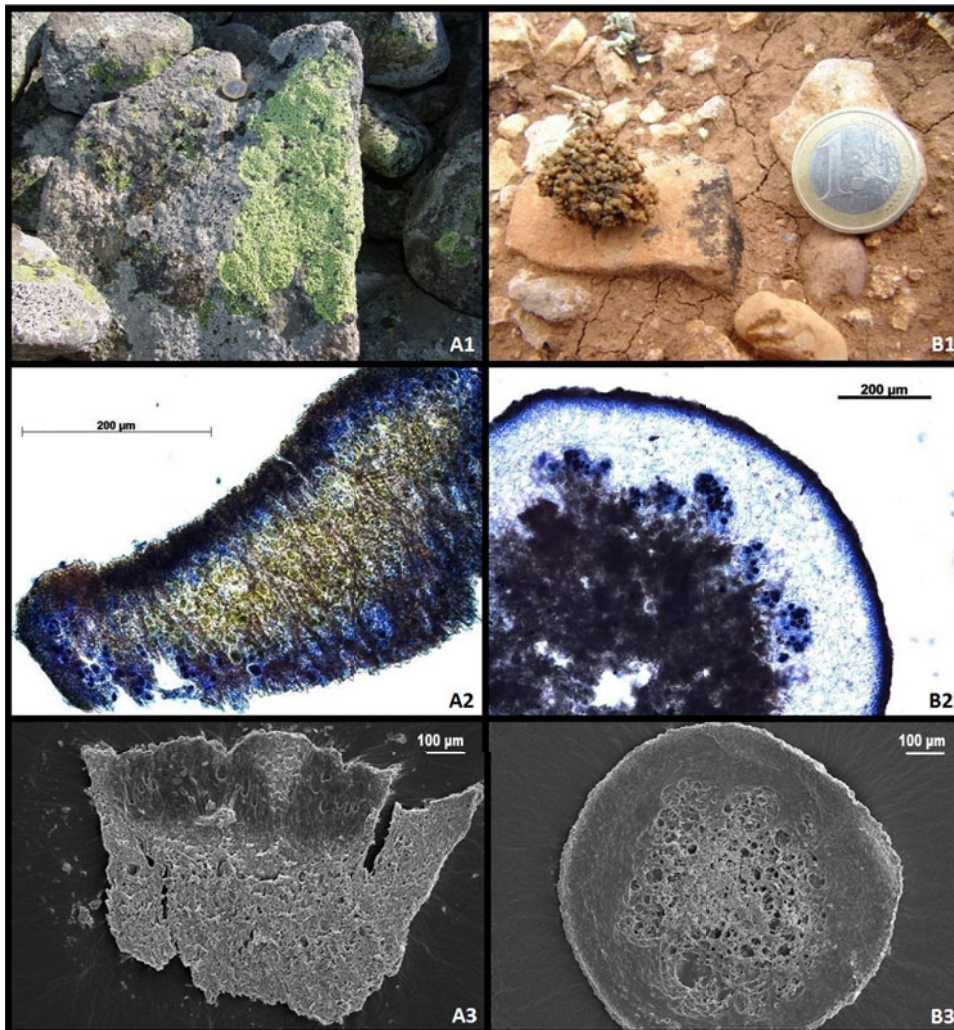
#### Epilithic lichen species – *R. geographicum*

This crustose epilithic lichen (Fig. 1, A1–A3) is a cosmopolitan colonizer of alpine and polar regions (Feurerer, 1991) that colonizes rocks. Our sampling site was the Navacerrada mountain pass,  $40^{\circ}46.9'N$ ,  $3^{\circ}59.9'W$ , 1938 m a.s.l. (Madrid, Spain). This area is covered by snow during long periods of winter but receives high levels of insolation and temperature during the summer season. The data recorded between 1946 and 2013 at the Navacerrada weather station show severe seasonal changes of temperature and precipitations (Table 1). Lichen-colonized rocks were collected considering three exclusive premises: homogeneous distribution of lichen on the granite rock surface, high level of colonization and flat surface of the rock.

Table 1. Some extreme meteorological parameters recorded between 1946 and 2013 in the Navacerrada weather station and between 1949 and 2013 in the Molina de Aragón weather station (adapted from Spanish Meteorological Agency – AEMET, <http://www.aemet.es>)

Meteorological data of the lichen sampling sites

Location	Maximum recorded temperature (°C)	Minimum recorded temperature (°C)	Highest monthly rainfall (litres m <sup>-2</sup> )	Lowest monthly rainfall (litres m <sup>-2</sup> )
Navacerrada Weather Station	31.8 (August 1987)	-20.3 (December 1962)	559.0 (January 1996)	0.0 (November 1948)
Molina de Aragón Weather Station	38.0 (August 1987)	-28.2 (January 1952)	176.8 (May 1971)	0.0 (July 1962)

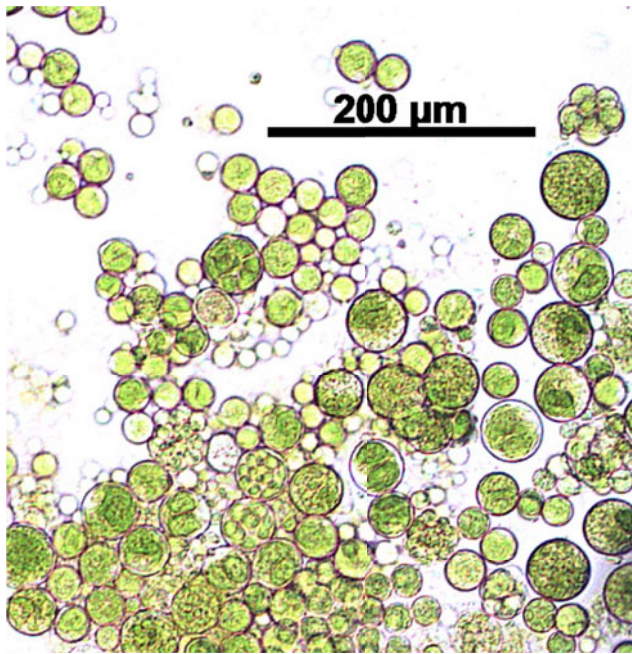


**Fig. 1.** Different aspects of *Rhizocarpon geographicum* and *Circinaria gyrosa*: Two representative thalli of *R. geographicum* in the mountains of Navacerrada (Madrid, Spain) (A1) and of *C. gyrosa* in the steppic highlands of Zaorejas (Guadalajara, Spain) (B1); two light microscope pictures of *R. geographicum* and *C. gyrosa* (A2 and B2 respectively) displaying the internal stratification and distribution of both symbionts and two Scanning Electron Microscope (SEM) pictures showing the ultrastructural features of the internal organization of *R. geographicum* and *C. gyrosa* (A3 and B3 respectively).

Vagrant lichen species – *C. gyrosa* (*nom. provis*)

*C. gyrosa* (Fig. 1, B1–B3) has been recently renamed from *Aspicilia fruticulosa* (Sohrabi 2012) and is characterized by a dichotomous branched, coralloid thallus and a compact

internal structure (Sancho *et al.* 2000). Owing to its vagrant character, it grows detached from the substrate, having the possibility to be displaced freely by environmental factors. This type of living form is found in continental arid areas of Middle Asia, Eurasia, North America and Northern



**Fig. 2.** *Trebouxia* sp., the photobiont of the lichen species *R. geographicum* and *C. gyrosa*. Exemplified by photobiont cells isolated from *C. gyrosa*.

Africa (de la Torre *et al.* 2010). The samples used in the present study were collected on clayey soil of the steppic highlands of Guadalajara (Central Spain high basins, Zaorejas, 40°44.691'N, 02°11.109'W, 1293 m a.s.l.). In this extreme environment, drastic diurnal and seasonal variations in terms of temperature, solar insolation and water availability occur. Some meteorological data (Table 1) registered between 1949 and 2011 at the Molina de Aragón weather station (40°50'40" N, 01°53'7"W, 1056 m a.s.l.) show maximum seasonal differences of more than 60 °C and a monthly rainfall range from 180 to 0 litres m<sup>-2</sup> between the dry and the wet season.

Photobiont of both lichens – *Trebouxia* sp.

*Trebouxia* is a genus of green algae (phylum Chlorophyta). Its relative abundance as photosynthetic partner is estimated to range from 20% (Rambold & Triebel 1992) to 50% (Gärtner 1992) in all lichen species and up to 80% in the group of the green algae bearing lichens (Henssen & Jahns 1974). The specimens of this genus live more or less exclusively lichenized and were rarely reported to be found free-living (Tschermak-Woess 1978, 1989; Bubrick *et al.* 1984; Ahmadjian 1992). In the thallus, they are restricted to the photosynthetically active algal layer, while the fungus contributes to about 90% of the lichen biomass. *Trebouxia* sp. is a coccoid green algae with a spherical to elliptic shape and thin walls (Fig. 2). No sexual reproduction has been observed in the symbiotic state (Friedl 1995) although genetic recombination was proposed (Kroken & Taylor 2000). During the study described here, these algae were part of the lichen symbiosis and not isolated, as our main interest was to study the different response of the photobiont in its symbiotic state.

### Sample preparation

#### Collection and processing of lichen samples

**Collection and rock edition:** *R. geographicum* colonized rocks were collected as a whole, while *C. gyrosa* samples were picked up individually from the substrate. Both were collected at their previously described sampling sites in a date close to the summer solstice (when the solar irradiation is maximum) to avoid seasonal vitality variations and the samples were frozen at –20 °C until further use. Owing to the epilithic and crustose character of *R. geographicum*, the lichen-bearing rocks were cut into cubes of 12 mm on side and 30 mm of height with a water-cooled diamond disc cutter, dried afterwards and kept at room temperature under dark conditions. The thalli of *C. gyrosa* were considered as single test samples and not processed.

**Cortex removal of *R. geographicum*:** Its high resistance towards UVR is supposed to be mainly provided by the cortex, while its removal leads to a short-term decrease of photosynthetic activity that is recuperated within a few days (de la Torre Noetzel 2002; de la Torre *et al.* 2007a, b). To investigate the protective role of the cortex against UV-C, the effect of its removal was assessed in half of the *R. geographicum* samples, taking it away carefully with a scalpel and leaving the algal layer directly exposed to UV-C.

**Acetone treatment of *C. gyrosa*:** To test the potential protective role of the sun-screening pigments on the photobiont, half of the total number of *C. gyrosa* samples were subdued to secondary lichen product extraction by four subsequent rinsings (5 minutes each) in 100% acetone (as described in Solhaug & Gauslaa 1996).

#### Revitalization

Before and after the irradiation experiment, all samples were subdued to a revitalization procedure similar to that performed in the previous space experiments *Lichens* (Sancho *et al.* 2008), *Lithopanspermia* (de la Torre *et al.* 2010) and *LIFE* (Onofri *et al.* 2012). The samples were kept in a climatic chamber for 72 hours under controlled conditions of temperature (10 °C), PAR (day/night cycle of 12 hours/12 hours using a PAL mercury lamp with 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> photosynthetic photon flux density (PPFD) and hydration (by spraying the samples till complete soaking once a day with mineral water). During revitalization, three measurements of the quantum yield (QY) efficiency of the PSII were performed on all samples (see subsection 'Pre- and post-irradiation photosynthetic performance of the PSII'). After the last measurement, the revitalization process was stopped and the samples were air-dried at room temperature for 72 hours.

#### UV-C irradiation tests

To perform the irradiation tests with rising doses of UV-C, we used the BS-03 irradiation chamber (Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, Germany) equipped with ten TUV 15W G15 T8 (Philips) low-pressure mercury tubes that emit short-wave polychromatic UV-C radiation in the spectral range comprised between 200 and 280 nm with a peak at 253.7 nm.

Table 2. Doses of UV-C radiation employed in the irradiation tests

## UV-C irradiation tests performed and duration

Doses 1 to 12	Time	Doses 13 to 23	Time
$2.5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	10 hours 44'46"	$8.5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	36 hours 17'55"
$3.0 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	12 hours 49'14"	$9.0 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	38 hours 31'57"
$3.5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	15 hours 10'30"	$9.5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	40 hours 32'52"
$4.0 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	16 hours 51'43"	$1.00 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	42 hours 46'13"
$4.5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	18 hours 42'10"	$1.05 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	45 hours 08'33"
$5.0 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	20 hours 45'28"	$1.10 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	47 hours 15'04"
$5.5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	23 hours 29'00"	$1.15 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	47 hours 57'55"
$6.0 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	25 hours 40'13"	$1.20 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	51 hours 17'39"
$6.5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	27 hours 12'27"	$2.40 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	103 hours 11'28"
$7.0 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	29 hours 36'02"	$4.80 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	205 hours 06'28"
$7.5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	31 hours 45'44"	$7.20 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$	311 hours 35'41"
$8.0 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$	34 hours 08'13"		

The irradiation chamber was coupled with an external dose controller in the respective spectral range. The irradiation tests comprised the application of 23 doses of UV-C ranging from  $2.5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$  to a maximal dose of  $7.2 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$  (refer to Table 2). The maximum dose is equivalent to an exposure of approximately 67 days ( $66.6 \pm 10.5$  days) in LEO, as calculated by integration of environmental UV > 170 nm data registered during BIOPAN I, II and III space flights (Horneck et al. 2001). Four groups of three replicates were subjected to each irradiation dose:

- (1) intact samples, dry (*R. geographicum* & *C. gyrosa*);
- (2) intact samples, wet (*R. geographicum* & *C. gyrosa*);
- (3) samples without cortex, dry (*R. geographicum*)/acetone rinsed, dry (*C. gyrosa*); and
- (4) samples without cortex, wet (*R. geographicum*)/acetone rinsed, wet (*C. gyrosa*).

After revitalization, the dry samples were directly placed in the irradiation chamber. However, the wet (and consequently metabolically active) samples were previously subjected to a maximum-hydration procedure spraying them with mineral water repeatedly for 20 minutes. During the whole irradiation period, the samples were kept hydrated by attaching mineral water-soaked filter paper to the base and sides of *R. geographicum* and to the base of *C. gyrosa* (refer to Fig. 3). The dose controller automatically stopped UV-C irradiation as soon as the respective doses were achieved.

#### Vitality assessment

Pre- and post-irradiation photosynthetic performance of the PSII

Before and after irradiation, the activity of the PSII of each sample was analysed three times by using a Mini-PAM fluorometer (Heinz Walz GmbH) at 24, 48 and 72 hours of the pre- and post-irradiation revitalization procedure (according to Sancho et al. 2007). Optimum QY values were obtained after 20 minutes of dark adaptation from the equation:



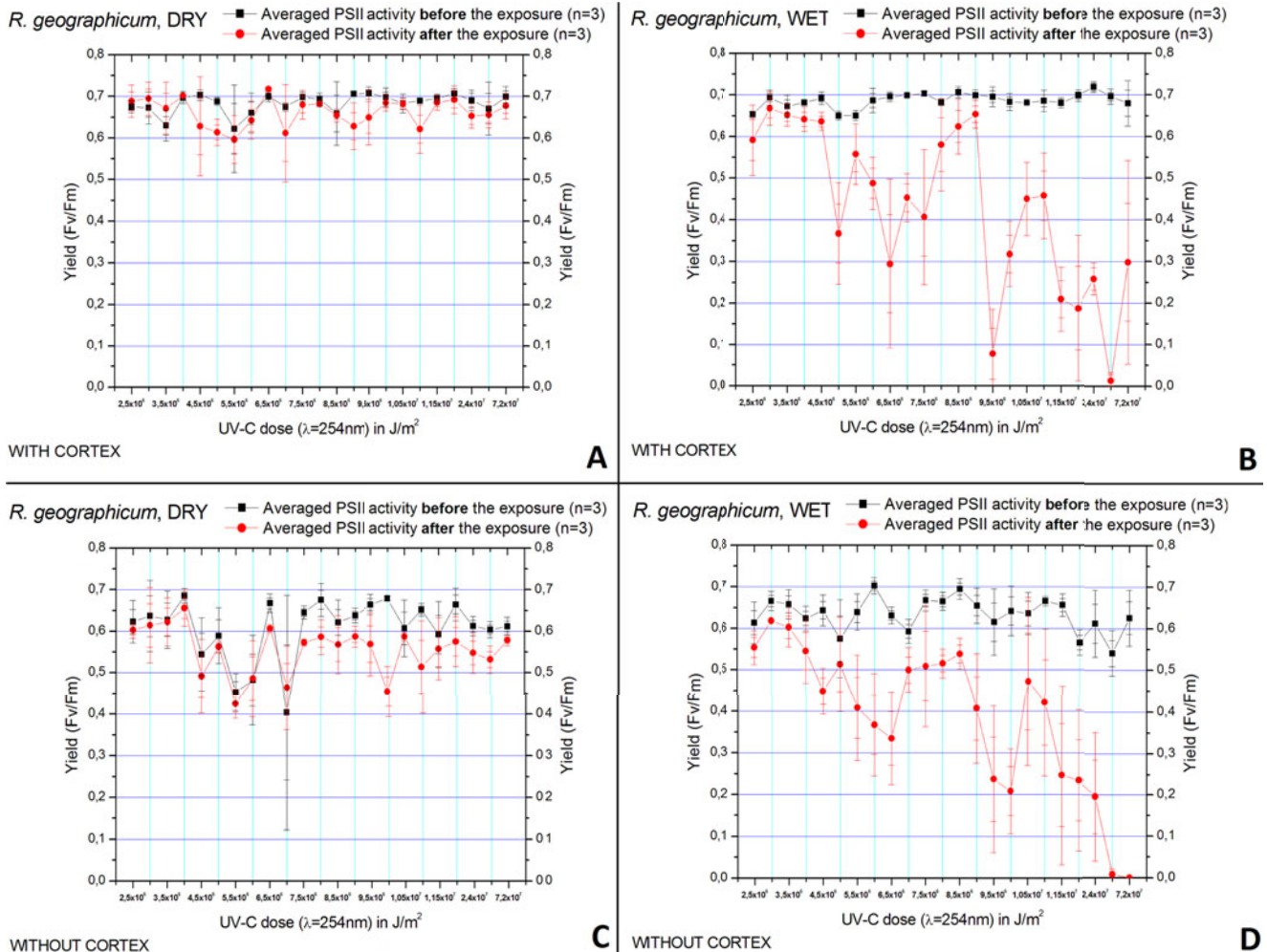
Fig. 3. Irradiation chamber with the samples in the center of the irradiation area and the sensor located close to them. In the left front thalli of *C. gyrosa* are located on water soaked paper pads, in the right front there are cutted stones with crustose thalli of *R. geographicum* wetted by adjacent paper strips. The dry samples are depicted on a plastic tray in the center with six samples each of *C. gyrosa* (center left) and *R. geographicum* (center right).

$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$  with  $F_v$  = variable fluorescence yield,  $F_m$  = maximal fluorescence yield and  $F_o$  = minimal fluorescence yield (Schreiber et al. 1994). The comparison of pre- and post-irradiation QY measurements allowed determining the impact of UV-C on the photosynthetic performance of both lichen species for all four experimental conditions.

#### Pigments extraction and quantification

Pigment analyses were performed to assess the influence of UV-C radiation on the content and degradation of photosynthetic pigments – chlorophylls and carotenoids –. The content of the main antenna pigments chl *a* and chl *b* and two major accessory pigments, lutein and  $\beta$ -carotene was quantified. For each of the four experimental approaches and after the 72 hours revitalization period and subsequent PSII assessment, one sample was selected from six representative doses (the lowest of  $2.5 \times 10^6$ ; an intermediate of  $7.5 \times 10^6$ ; and the four highest of  $1.2 \times 10^7$ ;  $2.4 \times 10^7$ ;  $4.8 \times 10^7$  and  $7.2 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$ , Table 2). A high performance liquid chromatography system (HPLC, Thermoquest IBM 360PL with SCM1000 degasser, P4000 quaternary pump, AS 3000 autosampler and a UV6000 PDA detector) was used to identify and quantify these pigments by comparison with standards.

Before pigment extraction the selected thalli were cleaned and lyophilized. All samples were weighed after the lyophilization to reference the amount of isolated pigment with its corresponding dry biomass. In the case of *R. geographicum*, the thalli were scratched from the rock to give realistic biomass weight. The samples were resuspended in 2 ml methanol for 48 hours at 4 °C and the supernatant methanol was filtered and transferred to HPLC vials. A Hipsil Gold reverse-phase column (Thermo Scientific, RP-18 250 × 4 mm) with a pore size



**Fig. 4.** Photosystem II (PSII) activity of *Rhizocarpon geographicum*'s photobiont (*Trebouxia* sp.) after each of the 23 UV-C irradiation doses and under the four different experimental conditions. Mean value  $\pm$  standard deviation given in each figure.

of 5  $\mu\text{m}$  was used. The sample injection volume was 100  $\mu\text{l}$  with two solvents: (a) ethyl acetate and (b) acetonitrile:water 9:1 (v/v). In the mobile phase a linear gradient was employed with a flow gradient of 1.00  $\text{ml min}^{-1}$  for 30 minutes, as described by Young *et al.* (1997). The pigments were detected by an UV detector at 450 nm. Afterwards the samples were identified and integrated with known standards of chl *a*, chl *b*,  $\beta$ -carotene and lutein.

#### Statistical analysis

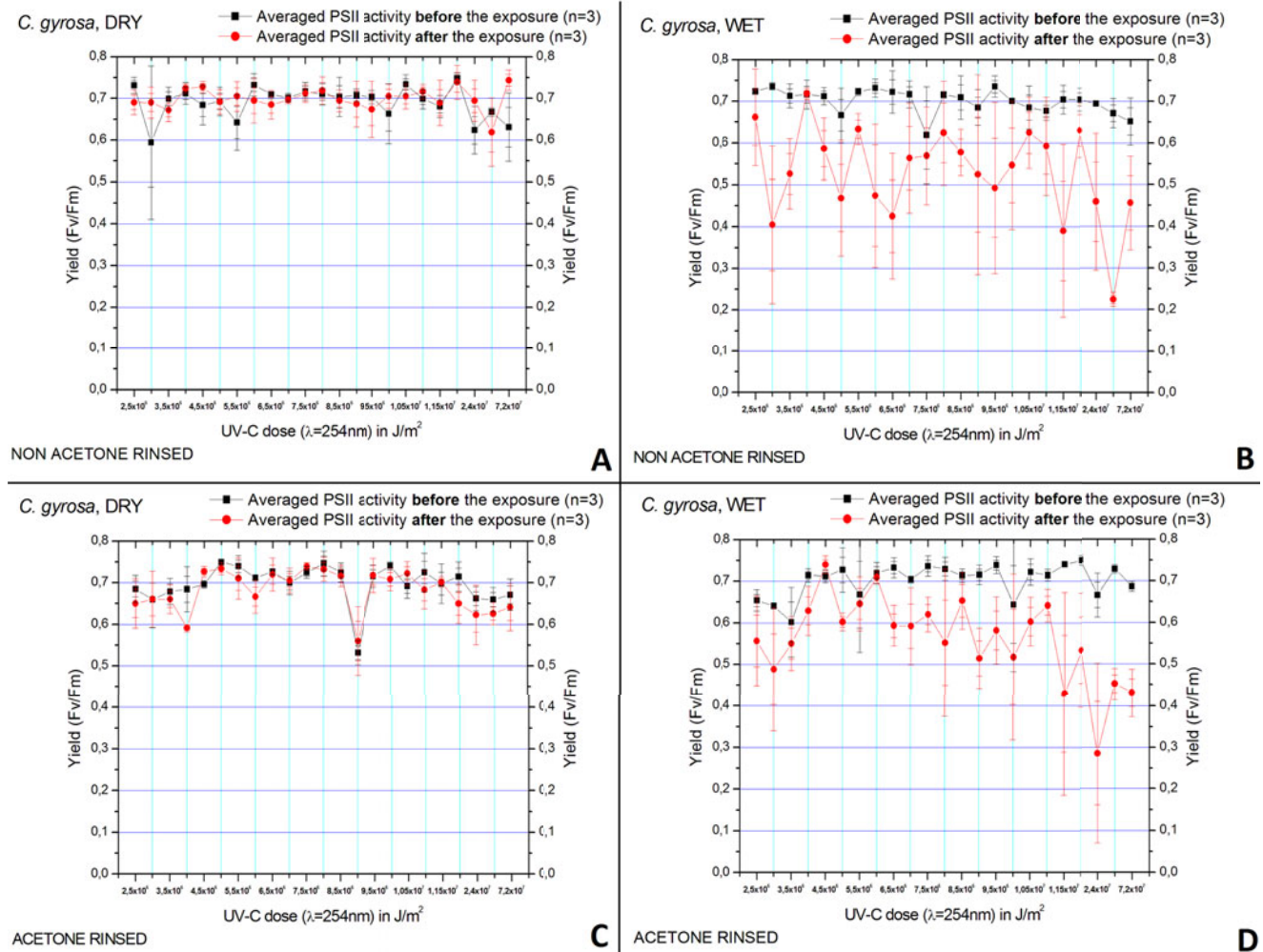
Two sets of statistical analysis were carried out with the results of PSII activity obtained from the overall experimental approaches performed (*R. geographicum* with/without cortex, dry/wet and *C. gyrosa* non-rinsed/rinsed, dry/wet) by one-way analysis of variance (ANOVA) with a significance level of  $p \leq 0.05$ . In the first one, the degree of influence of each single UV-C dose applied on the post-irradiated means in relation with the pre-exposure measurements was assessed. In the second set of ANOVA tests, the whole set of pre-exposure PSII means was compared with the set of all post-irradiation means. Results will only be described as 'significant' if the ANOVA tests gave a significant difference.

## Results

### *PSII performance before and after UV-C irradiation series*

#### '*Rhizocarpon geographicum*'

Intact samples in the dry and thus inactive metabolic state were not affected by the irradiation up to the highest applied dose of  $7.2 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$  UV-C<sub>254nm</sub>. The QY was about 0.7 before and after exposure and did not change significantly with rising doses of UV-C (Fig. 4A). In the dry state, samples are supposed to be anabiotic and therefore prepared to face harsh conditions. Intact samples that were irradiated under wet conditions and were thus metabolically active showed a significant decrease in PSII performance with increasing doses of UV-C. While pre-exposure QY was comparable to the dry state ( $\sim 0.7$ ), a continuous decrease to  $\sim 0.3$  at the highest dose was observed (Fig. 4B), indicating a harmful effect of UV-C on the activity of the PSII when the photobiont was physiologically active. The protective role of the cortex was not as important as the hydration status: if the lichen cortex is removed, dry thallus samples show an insignificant decrease of PSII activity of  $\sim 0.05$  after irradiation with higher doses of UV-C (Fig. 4C). Under wet, physiologically active exposure



**Fig. 5.** Photosystem II (PSII) activity of *Circinaria gyrosa*'s photobiont (*Trebouxia* sp.) after each of the 23 UV-C irradiation doses and under the four different experimental conditions. Mean value  $\pm$  standard deviation given in each figure.

conditions the drop of PSII activity is significant compared with the wet but intact thallus samples. At the two highest doses of  $4.8$  and  $7.2 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$  the QY dropped to zero (Fig. 4D). As these results are similar to the ones obtained with the intact thalli, it cannot be clearly concluded that the cortex prevents UV-C damage in the photosynthetic system of the lichen photobionts. The PSII activity is not or insignificantly decreased when *R. geographicum* is subjected to rising UV-C doses in its anhydrobiotic/anabiotic state. In contrast, the PSII activity strongly decreases under wet physiologically active exposure conditions demonstrating a negative correlation between UV-C dose and PSII activity.

#### '*Circinaria gyrosa*'

The samples under dry anabiotic conditions showed a constant pattern in terms of PSII activity before and after irradiation. Exposure to increasing doses of UV-C had no effect on the post-irradiation PSII performance, irrespective of whether the thalli were tested unaltered or rinsed with acetone before (compare Fig. 5A–C). All post-exposure measurements were comparable to the pre-exposure measurements that

ranged between  $0.6$  and  $0.75$  QY. This unaffectedness was surprising taking into account the high UV-C doses during exposure. Wet and physiologically active samples showed a decreasing pattern demonstrating again that the photobiont is much more vulnerable while being wet. The PSII activity decreased with increasing UV-C doses. At a maximum dose of  $7.2 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$ , a significant decrease of the PSII activity to  $0.4$ – $0.45$  QY in both intact and acetone-rinsed thallus samples was registered (Fig. 5B and D).

#### Comparison of both lichen photobionts under the different experimental conditions

In terms of PSII activity, intact and dry samples of the two lichen species showed the smallest differences in the PSII activity before and after irradiation at all applied UV-C doses (Figs. 4A and 5A). The average pre-exposure QY is  $\sim 0.7$  and did not change significantly during both irradiation series. The results obtained with the intact and wet samples (Figs. 4B and 5B) were different. With *R. geographicum*, the post-irradiation QY values remained close to the pre-irradiation ones up to a dose of  $4.5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$ , but showed a general tendency to

decrease with higher doses, reaching  $\sim 0.3$  QY at the highest UV-C dose. With *C. gyrosa*, a slight decrease in photosynthetic performance was detected even at lower doses (compare Figs. 4B and 5B). However, in *C. gyrosa* the decreasing effect on PSII activity at doses above  $9.5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$  is less pronounced compared with *R. geographicum*, resulting in a lower loss of photosynthetic performance. The dry samples of *R. geographicum* with removed cortex as well as the dry acetone-rinsed samples of *C. gyrosa* showed no significant differences, neither if they are compared with the respective intact lichen samples nor to each other. The wet samples of *R. geographicum* with removed cortex as well as the wet acetone-rinsed samples of *C. gyrosa* showed no significant differences compared with their respective intact samples (compare Fig. 4B–D and Fig. 5B–D), except the completely reduced QY of *R. geographicum* at the maximum UV-C doses of 4.8 and  $7.2 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$  (Fig. 4D, as mentioned above).

Analysing the PSII performance before and after the UV-C irradiation, several results became clear: (i) the removal of the cortex of *R. geographicum* led to a slight, but insignificant loss of PSII activity in the UV-C exposed algal layer. (ii) The acetone-rinsing of thalli of *C. gyrosa*, which was performed to extract putative screening lichen compounds, did not evoke any differences in the PSII activity compared with the non-rinsed thallus samples. (iii) In both lichen photobionts, the PSII activity of the thallus samples was significantly reduced by UV-C when wet. When metabolically active, the PSII activity is inversely proportional to the dose of applied UV-C.

#### *Recovery of the PSII performance after irradiation with selected doses of UV-C*

After UV-C exposure, all samples were revitalized for 24, 48, and 72 hours and their PSII activity was determined to assess its putative recovery. The results obtained after three representative doses (lowest:  $2.5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$ ; intermediate:  $2.4 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$ ; highest:  $7.2 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$ ) will be described below.

#### ‘*Rhizocarpon geographicum*’

After applying the lowest UV-C dose (Fig. 6A), dry samples (intact and with removed cortex) showed a slight reduction of  $\sim 0.05$  QY after 24 hours which increased back to the initial pre-exposure values within the 72 hours period. Compared with pre-exposure values, both wet intact thalli and wet cortex-removed samples also showed a slight decrease of  $\sim 0.05$  QY that did not recover within the 72 hours period. After the medium dose (Fig. 6B) the PSII activity of dry intact samples decreased from 0.7 to 0.5 and mostly recovered within 72 hours, the PSII activity of dry cortex-removed samples decreased from 0.62 to 0.4 and recovered to 0.55 within 72 hours. The wet samples were reduced from 0.7 to 0.2 (intact) and from 0.62 to 0.25 (removed cortex). Within the 72 hours revitalization period, the intact thalli samples recovered slightly to 0.25, while no recovery was observed at cortex-removed samples. The maximum UV-C dose affected the dry samples as described before, the PSII activity was reduced from 0.68 to 0.55 (intact) and from 0.6 to 0.5 (removed cortex)

and recovered within 72 hours to 0.65 and 0.58, respectively (Fig. 6C). In both wet sample sets, the PSII activity was dramatically reduced from 0.68 to 0.02 (intact) and from 0.6 to 0.08 (cortex removed). While the wet and intact samples recovered to 0.3 within 72 hours, no recovery was observed with the removed-cortex samples.

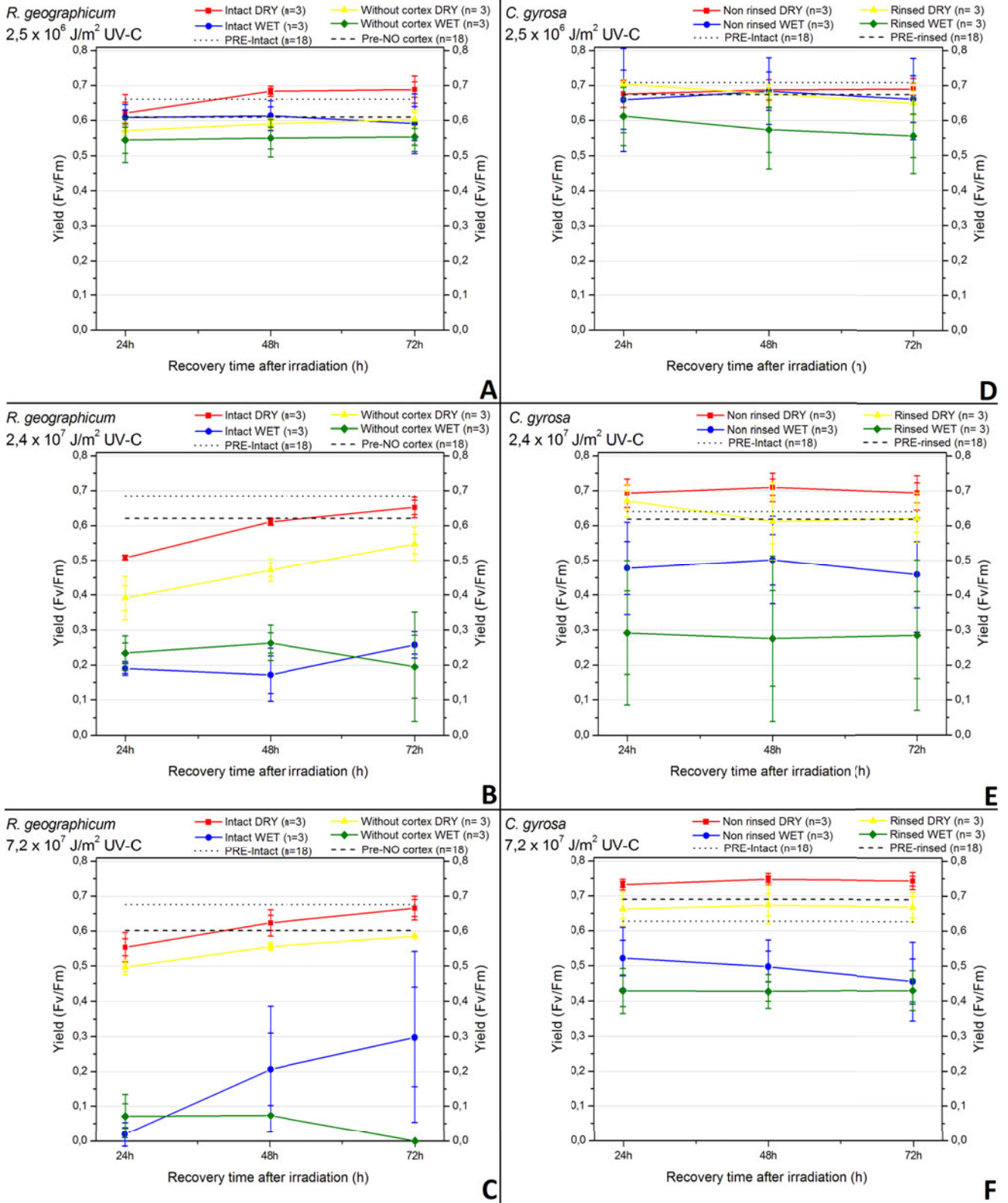
All *R. geographicum* samples seemed to remain unaffected after exposure by the lowest UV-C dose. These samples showed a steady pattern of PSII values after 24, 48 and 72 hours of revitalization, similar to pre-exposure data. After medium and highest UV-C doses, the data revealed succinct differences: intact-dry thalli displayed best photosynthetic performance and recovery. A comparable reaction was detected in dry samples with removed cortex. Wet samples displayed lower PSII values and a diminished resilience during revitalization presumably demonstrates severe damages induced by UV-C.

#### ‘*Circinaria gyrosa*’

The thallus samples of *C. gyrosa* showed a less complex pattern of PSII activity during revitalization. Dry thallus samples (intact as well as acetone-rinsed) were virtually not affected by the three UV-C doses tested. The post-exposure values did not differ significantly from the respective pre-exposure data, all ranging between  $\sim 0.6$  and  $\sim 0.7$  QY (Fig. 6D–F). In the correspondent wet samples neither significant loss of PSII activity nor recovery was observed within the 72 hours revitalization period. The PSII activity of wet intact thalli was not affected by the lowest UV-C dose, but reduced from  $\sim 0.65$  to  $\sim 0.5$  by the two following doses (Fig. 6D–F). The PSII activity of wet acetone-rinsed thalli was slightly reduced from 0.67 to 0.6 by the lowest dose, from 0.62 to 0.3 by the medium dose, and from 0.62 to 0.42 by the highest dose.

#### Comparison of both lichen photobionts

In all dry samples, the PSII activity of intact thalli was slightly higher compared with the respective processed ones. Comparing the changes of PSII activity of the two *Trebouxia* sp. photobionts, several differences should be highlighted: (1) Dry samples of *R. geographicum* showed a reduction of PSII activity after 24 hours revitalization that was recovered almost to the pre-exposure control values within 72 hours. (2) In contrast, dry samples of *C. gyrosa* were not affected by any of the three UV-C doses and thus showed no recovery. (3) Wet intact samples of *R. geographicum* showed some recovery after irradiation with 2.4 and  $7.2 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$ , while no recovery occurred in samples with removed cortex during the three-day period of revitalization. (4) In wet samples of *C. gyrosa*, there was also no observable recovery in the revitalization period but the reduction of PSII activity was more pronounced in acetone-rinsed thalli than in intact ones. (5) Despite the lack or retardation of PSII recovery in *C. gyrosa*, its average reduction of PSII activity after exposure is less pronounced at the two higher UV-C doses compared with *R. geographicum*.



**Fig. 6.** Recovery capacity of the photosystem II (PSII) of the *Trebouxia* sp. photobiont of *Rhizocarpon geographicum* (Fig. 6A–C) and *Circinariya gyrosa* (Fig. 6D–F) after three selected UV-C irradiation doses and under the four different experimental conditions. Mean value  $\pm$  standard deviation given in each figure.

*Pigments content after UV-C exposure*‘*Rhizocarpon geographicum*’

In general, chl *b* was the most abundant pigment in *R. geographicum*'s photobiont, followed by chl *a*, lutein and  $\beta$ -carotene. Compared with the controls (about 60–80  $\mu\text{g g}^{-1}$  TDW), chl *a* and chl *b* revealed no correlation of UV-C dose/experimental condition and concentration when subjected to the lower doses of  $2.5 \times 10^6$ ,  $7.5 \times 10^6$  and  $1.2 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$  (Fig. 7A–C), irrespective of the hydration state or the presence/absence of protective structures. In contrast, concentration values of  $\beta$ -carotene were more constant and comparable to the control (about 10  $\mu\text{g g}^{-1}$  TDW). Lutein maintained its concentration constant and close to 40  $\mu\text{g g}^{-1}$  TDW, while only the intact-dry sample at  $7.5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$  showed an elevated concentration of 110  $\mu\text{g g}^{-1}$  TDW (Fig. 7B). Besides, the four experimental approaches did not influence the concentration of the two carotenoids. After the higher UV-C doses of 2.4, 4.8 and  $7.2 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$  (Fig. 7D–F), a general decrease in the assessed pigments content was detected. In samples subjected to  $2.4 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$  the concentration of chl *a* was decreased in the intact-wet sample only, while the subsequent doses caused a decrease of chl *a* in all experimental approaches (Fig. 7D–F). At a dose of  $2.4 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$  the chl *b* concentration gave no clear pattern, while the higher doses elicited a decrease in the cortex-removed samples (Fig. 7E and F). The effect of the higher UV-C doses on  $\beta$ -carotene and lutein was similar, both revealing a dose-dependent decrease except in intact wet samples, which were virtually unaffected. In removed-cortex samples (dry and wet), the pigment concentrations of  $\beta$ -carotene and lutein were reduced to nearly zero and to about 10  $\mu\text{g g}^{-1}$  TDW, respectively. The ratios of chl *a*/chl *b*,  $\beta$ -carotene/chl *a*+*b* and lutein/chl *a*+*b* were calculated. Due to the high variability of chl *a* and chl *b* concentrations among all UV-C doses and experimental approaches, these ratios gave no indication of distinctive degradation processes by UV-C exposure. The  $\beta$ -carotene/chl *a*+*b* ratios were stable but always low, due to the low abundance of  $\beta$ -carotene in all samples.

‘*Circinaria gyrosa*’

In *C. gyrosa*'s photobiont, the same relative abundance as in *R. geographicum* was observed for the four quantified pigments (chl *b* > chl *a* > lutein >  $\beta$ -carotene), but with less marked differences between chl *b* and chl *a* contents and very low levels of  $\beta$ -carotene (0–10  $\mu\text{g g}^{-1}$  TDW). After exposure to the lowest UV-C dose, chl *a* as well as chl *b* concentrations revealed lower levels in dry and wet intact samples but elevated levels in dry and wet rinsed samples when compared with the control (chl *a*: 32  $\mu\text{g g}^{-1}$ , chl *b*: 42  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). After exposure to  $7.5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$  (Fig. 8B) the concentration of both chlorophylls was comparable to the control, except *a* in the intact-wet samples. With the next two UV-C doses (1.2 and  $2.4 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$ ), chl *a* and chl *b* both displayed an increase in the intact-dry samples (1.5–3-fold) and a decrease of ~50% in the rinsed-dry samples (Fig. 8C and D). In contrast, the chl *a* and chl *b* values obtained in the samples irradiated

with  $4.8 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$  were similar to the respective controls for intact samples (70  $\mu\text{g g}^{-1}$  TDW) and rinsed samples (60  $\mu\text{g g}^{-1}$  TDW, Fig. 8E). Finally, the samples submitted to  $7.2 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$  showed a different pattern depending on the experimental approaches. Compared with their control, chl *a* and chl *b* concentrations in dry intact and dry rinsed samples remained constant while they decreased in both wet samples (Fig. 8F).

The four experimental approaches, as rinsing and hydration state, had no effect on  $\beta$ -carotene and lutein. After exposure to the three lower UV-C doses, lutein and  $\beta$ -carotene concentrations were comparable to their controls (Fig. 8A–C). After being exposed to 2.4 and  $4.8 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$ , none of the pigments was virtually influenced and also the maximum UV-C dose of  $7.2 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$  displayed no appreciable influence on  $\beta$ -carotene and lutein (Fig. 8D–F).

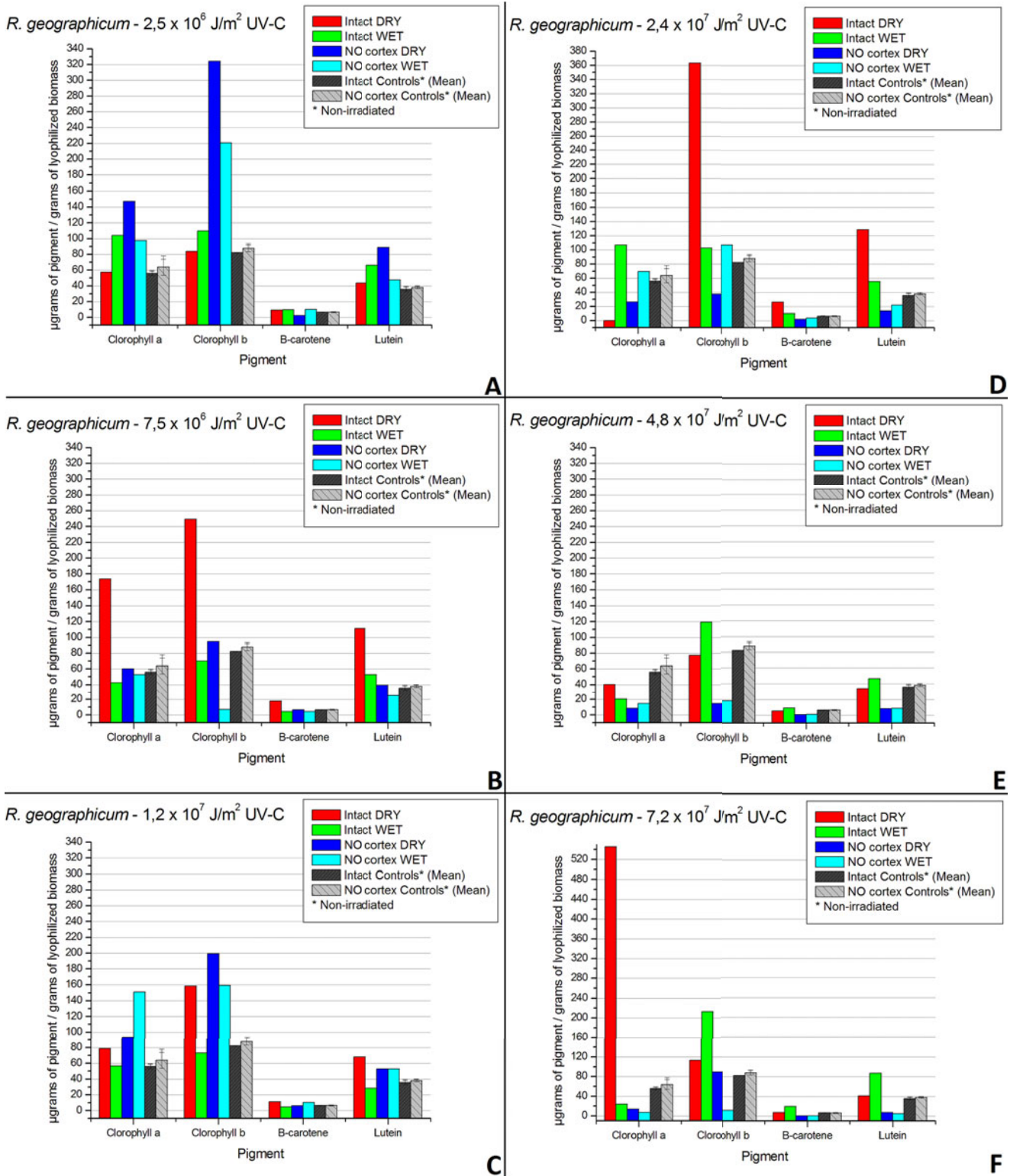
As in *R. geographicum*, the chl *a*/chl *b* ratio displayed high variability, while being more constant than in *R. geographicum*. Except one runaway value in the intact-dry sample (4.5 after  $7.2 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$ ) all chl *a*/chl *b* ratios ranged from 0.5 to 0.7. The  $\beta$ -carotene/chl *a*+*b* ratio showed again the lowest (close to 0) but most constant values among all UV-C doses and experimental approaches. The lutein/chl *a*+*b* ratio in samples exposed to  $2.5 \times 10^6$  and  $7.5 \times 10^6 \text{ J m}^{-2}$  irradiations was ~0.25 with no clear influence of the rinsing and the hydration state. At higher doses, the lutein/chl *a*+*b* ratio showed some variations without a clear trend depending on the applied dose or the experimental condition.

## Comparison of both lichen photobionts

In both *Trebouxia* sp. photobiont chl *b* was found to be the most abundant pigment, followed by chl *a*, lutein and  $\beta$ -carotene. The overall content of chlorophylls was slightly higher in *R. geographicum* compared with *C. gyrosa*. The results obtained in *C. gyrosa*'s photobiont were more constant than the ones obtained in *R. geographicum*. Concerning the calculated ratios between chl *a*/chl *b*,  $\beta$ -carotene/chl *a*+*b* and lutein/chl *a*+*b* for both species after the same UV-C irradiation doses and under equivalent experimental conditions, it was observed that the ratio differences between  $\beta$ -carotene/chl *a*+*b* and lutein/chl *a*+*b* were always similar and that chl *a*/chl *b* was the one showing highest variability.

## Discussion

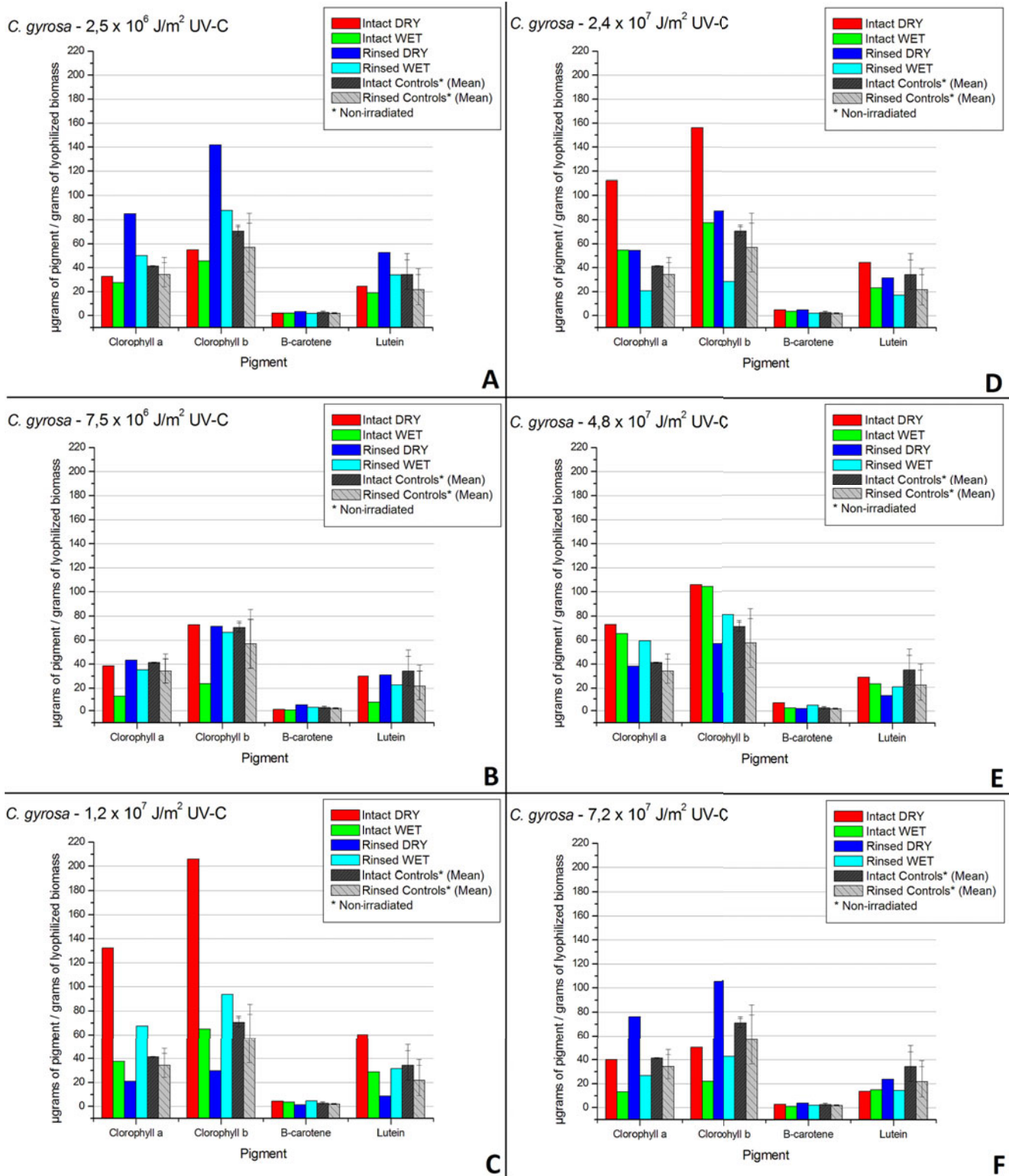
Organisms are able to use two decisive strategies to endure excessive levels of UVR and to reduce its harmful effects on metabolism: to repair UVR-induced damage (as discussed in the introduction) or to avoid that damage (Björn 2007). As the first possibility has been covered in the introduction we will discuss now the second strategy. Damage avoidance is proposed as an alternative mechanism to explain high levels of UVR resistance. According to the results of the present study, we suggest that the poikilohydric character of lichens is the major avoidance mechanism to explain the high tolerance towards UV-C in *R. geographicum* and *C. gyrosa*. Poikilohydry is the capacity to tolerate extreme desiccation



**Fig. 7.** Content of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, β-carotene and lutein per gram of lyophilized biomass in *R. geographicum* and quantified by HPLC. Pigment content quantified by HPLC, n=2 replicates in intact and rinsed control (non-irradiated) samples represented as mean value ± standard deviation.

during extended periods, recovering under more favourable conditions without physiological damage. During this ‘anabiotic’ state lichens are better disposed to resist harsh

environmental parameters such as extreme temperatures (Kranter *et al.* 2008) or high levels of PAR and UVR (Nybakken *et al.* 2004). It occurs in organisms that cannot



**Fig. 8.** Content of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, β-carotene and lutein per grams of lyophilized biomass in *C. gyrosa* and quantified by HPLC. Pigment content quantified by HPLC, n=2 replicates in intact and rinsed control (non-irradiated) samples represented as mean value ± standard deviation.

regulate their internal water content, depending exclusively on the environmental conditions (Green and Lange 1994). The current study demonstrates for both *Trebouxia* sp. photobionts that the PSII is much more sensitive towards UV-C when the

lichen thallus is wet, starting to decrease on their PSII at a dose of  $5.0 \times 10^6$  J m<sup>-2</sup>. From these results it could be concluded that the dissociation of the PSII and its light harvesting complexes (LHC) during desiccation (Lange *et al.* 1989) and

the associated photoprotection mechanisms given by thermal dissipation and/or charge separation in the reaction centres (Heber *et al.* 2011) might prevent the putative degradation of the D1/D2 complex. Such mechanism might serve as an explanation for the high UV-C resistance of the two tested photobionts when dry. UV-C damage on PSII activity occurs in wet thalli, what might be explained by the re-association of PSII and LHC and thus the degradation of the D1/D2 complex or by degradation of chlorophylls (Strid *et al.* 1994; Teramura & Sullivan 1994), both by excess shortwave light energy. The present results on PSII performance clearly demonstrates that both photobionts are more vulnerable when metabolically active. This is in line with a study on *X. elegans* and *P. aphthosa* (de Vera & Ott 2010b), where a decrease of *Trebouxia*-photobiont viability was registered after UV-C exposure. The maximum dose applied during the present study is almost 500 times higher than the highest one used in the previously referred work. Considering such high a tolerance, the UV-C resistance expectancy of *Trebouxia* sp. has been largely increased. In metabolically active samples of *R. geographicum*, the PSII tolerance limit towards UV-C was observed at a dose of  $4.8 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$  when the cortex was previously removed. We suppose that this dose is the upper limit of photosynthetic resistance of *Trebouxia* sp. to UV-C radiation. These results clearly expand the previous view that the photobiont is the more sensitive partner of the lichen symbiosis. In the ecological study performed by Sadowsky & Ott (2012), some photobiont-specific physiological adaptations were found in Antarctic lichenized *Trebouxia* sp. suggesting a genetic basis for high tolerance. In the case of *C. gyrosa*, we were not able to detect its tolerance limit.

Protective thallus structures and light-screening SLCs are generally considered as crucial adaptations towards extreme environmental parameters as UVR (Fahselt 1994; Rikkinen 1995; Huneck 1999) and also explain their high resistance demonstrated in previous astrobiological studies (Sancho *et al.* 2008; Meeßen *et al.* 2013). In some field campaigns that compared the PSII performance of samples of *R. geographicum* with and without cortex (de la Torre Noetzel 2002), it was demonstrated that the cortex has an important protective function in physiologically active thalli. Accordingly, the lichen's cortex – which gives mechanical protection as well as excess PAR and/or UVR-screening effects by the cortex-located SLC rhizocarpic acid – was proposed to be the main reason to explain the high resistance of *R. geographicum* to the full spectrum of UVR (de la Torre *et al.* 2007a, 2010). Nonetheless, during this study, the removal of the cortex of *R. geographicum* did not lead to a significant loss of PSII activity in the UV-C exposed algal layer when dry, indicating that the anhydrobiotic condition has the main protective function. The acetone-rinsing of *C. gyrosa* – to extract putative photoprotectant SLCs – did not evoke any differences in PSII activity. Concerning the revitalization measurements, dry exposed thalli as well as wet intact thalli of *R. geographicum* show some recovery of the UV-C affected PSII during the revitalization period. Wet thalli with removed cortex did not show any recovery. Concluding from these results the

protective effect of the cortex and cortex-located SLCs may be more important in periods when metabolic activity and UV-C irradiation co-occur.

Despite the higher resistance of the PSII performance of metabolically active photobionts in *C. gyrosa* (Fig. 5B), no recovery of the PSII activity occurred in the revitalization period (Fig. 6E and F). Raggio *et al.* (2011) confirmed previous results as summarized in Culbertson (1979) and after looking for SLCs by thin layer chromatography assays in samples of *C. gyrosa*, no SLC at all was found. Meeßen *et al.* (2013) suggested that the dense and highly gelatinated subcortex between the SLC-deficient cortex and the algal layer may play an important role in the high resistance of *C. gyrosa* towards UV-C and act as a secondary adaptation to block radiation and compensate the lack of SLCs. This interpretation might be fostered by the present finding that the PSII activity was not affected in acetone-rinsed thalli, where putative SLCs have been removed. As the subcortex (Fig. 1, B2) was not affected by the acetone-rinsing procedure, the protective effect of the subcortex can be assumed to be given in both experimental setups.

Comparing the results of the single factor UV-C irradiation in the present study with previous multi-factor space exposure experiments is not easy: intact and dry *R. geographicum* showed no loss of PSII activity in pre- and post-exposure measurements (Fig. 4A) after 67d space-equivalent UV-C and a slight loss in the revitalization experiment (Fig. 6C). After 1.5 years of space exposure in the *LIFE* experiment (Onofri *et al.* 2012) there was a dramatic loss of PSII activity down to 0.5% of the pre-flight value. Thus, the loss of PSII activity in *LIFE* can be rather explained by the 8-times longer exposure and accumulation of PSII damages or by the more deleterious effect of multi-factor space exposure than by mere UV-C exposure. If the cortex of *R. geographicum* is removed, the slight loss of PSII activity of about 8% after 67d space-equivalent UV-C (Fig. 4C) is comparable to the loss of PSII activity of about 4–10% after 10 days in the space experiment *Lithopanspermia* (dry thalli with removed cortex, de la Torre *et al.* 2010), indicating that a cumulative damaging effect on PSII after 10 days in LEO is roughly comparable to a single factor UV-C dose of 67 days space-equivalent. In dry samples of *C. gyrosa*, no loss of PSII activity was observed after 67 days space-equivalent UV-C doses (Figs. 5A and 6D–F). With an intermediate UV-C dose, the results are consistent with the minimal loss of PSII activity after 10 days in space (from 100% to 95–99%, de la Torre *et al.* 2010) and the loss of about 55% of PSII activity after 1.5 years in the *LIFE* experiment (Onofri *et al.* 2012), indicating again that pure UV-C is not as damaging as multi-factor space exposure.

In relation with the pigments analyses performed, it should be taken into account that while chl *a* and chl *b* are basic photosynthetic molecules that allow plants to absorb energy from light, carotenoids are a group of organic pigments present in photosynthetic organisms and involved in two main functions: accessory absorption of light energy for photosynthesis and protection of chlorophylls from damage by quenching excess light energy of non-PAR sunlight (Paerl

1984; Armstrong & Hearst 1996). A potential role of carotenoids in UV protection has been proposed, especially having in mind that  $\beta$ -carotene can absorb UV-C (Holder 1998) although further work is needed until that protective role can be confirmed (Wynn-Williams & Edwards 2002b). Concerning the post UV-C-irradiation quantification of pigments performed, we should differentiate between two different perspectives: the relative abundance of photosynthetic pigments and the effect of UV-C on them.

Normally the content of chl *a* in the chloroplast is higher compared with chl *b* (Atwell *et al.* 1999). Both chlorophylls are involved in light-harvesting but with important differences. While chl *a* is directly implicated in the energetic processing at high-light levels (higher chl *a*/chl *b* ratios), chl *b* plays a major role in the optimization of the photosynthetic process under low light conditions enhancing the efficiency of blue light absorption (Atwell *et al.* 1999; Yamazaki *et al.* 2005). Accordingly, the generally lower chl *a*/chl *b* ratios obtained during this study indicate that both *Trebouxia* sp. photobionts are adapted to low light. This conclusion contradicts the light conditions of their natural habitat, as *R. geographicum* and *C. gyrosa* are species subjected to high levels of insolation. However, we assume that both lichen species have developed efficient structures to drastically reduce the amount of light reaching the photosystems, as the combination of their usual anhydrobiotic state (to avoid physiologically stressful conditions), and effective shielding structures as cortices, subcortices and SLCs. No direct correlation between key-photosynthetic pigments chl *a* and chl *b* concentration and a higher PSII activity was detected for any lichen species.

In relation with the effect of UV-C on the assessed pigments, no clear trend in the levels of chl *a* and chl *b* or of the carotenoids  $\beta$ -carotene and lutein has been observed after the different UV-C irradiation doses and experimental conditions. Nonetheless, the appearance of non-identified peaks next to chlorophyll and carotenoids signals in the HPLC chromatograms of the samples subjected to the highest UV-C doses might point to a degradation of chlorophyll and carotenoids by the oxidative action of UV-C, as proposed by Gao *et al.* (2009). In that respect, chlorophylls and carotenoids might also be contributing to preserve the photobiont from the damaging effects of UV-C. This protective activity would be of physico-chemical nature and would consist of the energy absorption through the high electron densities located in the double bounds. Whether or not the carotenoids pigments play a special role in the UV-C tolerance detected in both *Trebouxia* sp. photobionts is unclear, but previous research on lichen photobionts reported an increase in the carotenoid content after exposure to UV-B as a protective mechanism (Buffoni Hall 2002; Gautam *et al.* 2011). Similar results were obtained with some microalgae species after exposures to UV-A (Salguero *et al.* 2005; Mogedas *et al.* 2009) and explained as an antioxidant-protective mechanism towards UV-B and UV-A. In contrast, a decrease in the content of some of the quantified pigments has been detected after the highest UV-C doses, especially in the samples of *R. geographicum* with removed cortex after doses of 4.8 and  $7.2 \times 10^7 \text{ J m}^{-2}$  (Fig. 7E

and F respectively). The general decrease in the chlorophyll,  $\beta$ -carotene and lutein content in those samples could be caused by UV-induced degradation, as explained above, fostered by the absence of the protective cortex. On the contrary, after the same irradiations upon intact samples no degradation took place but a slight increase in the wet and active exemplars was detected, reinforcing the idea of the decisive role of cortical structure and physiological state in the UV-C tolerance of *R. geographicum*. In some cases, an increase of photosynthetic pigment concentration was detected in dry (anabiotic) samples of both lichen species after different UV-C exposures. These results could be either explained by UV-C induced pigment synthesis during the 72 hour-revitalization or by high intersample variability. The lichen species *C. gyrosa* maintained a more stable pigment content after all UV-C irradiations and experimental conditions, highlighting again the protective role of the subcortex.

In summary, the tolerance expectancy of *Trebouxia* sp. within the lichen species *R. geographicum* and *C. gyrosa* towards UV-C, one of the most critical space factors, has increased considerably compared with previous results. Both photobionts have demonstrated high tolerance in terms of PSII activity, clearly influenced by the physiological state of the thallus. As previously hypothesized, photobiont PSII activity is more resistant to UV-C radiation in the anabiotic state, showing decreasing levels of activity when wet and physiologically active. Besides the key anhydrobiosis-mediated resistance that underlies the UV-C tolerance detected for both studied species, the presence of passive protective structures is proposed here as a complementary mechanism to explain the high UV-C tolerance detected. In *R. geographicum* that protective structure is the thick epicortex with densely arranged cortical cells that are intensely coloured and incrustated with SLCs (Fig. 1, A2 and A3) and in *C. gyrosa* it is the dense and highly gelatinated subcortex (Fig. 1, B2 and B3 refer to Meeßen *et al.* 2013). These structures have an important role in blocking excess radiation and act as a primary protective adaptation in highly insolated habitats. The poikilohydric character of lichens and the presence of protective structures are the main reasons to explain their tolerance in relation with light stress that have led them to tolerate even highly energetic wavelengths that do not reach the Earth's surface. As UV-C does not occur under terrestrial conditions, resistance towards UV-C should be considered as a secondary effect.

Further research should be done with isolated photobionts in order to evaluate their tolerance capabilities, and we hypothesize that they will result in lower rates of tolerance and survivability after the exposure to similar conditions. In conclusion, we support the idea proposed by Sancho *et al.* (2008) that among extremotolerant organisms, lichens possess a diverse set of qualities that make them excellent objects for astrobiological research.

### Acknowledgements

The first author would like to express his sincere gratefulness to Mr Gilberto Herrero (Geology Faculty, Stratigraphy

Department, Universidad Complutense de Madrid – UCM) for his generous technical support during the *Rhizocarpon geographicum* samples edition and to Mrs Eva-Maria Balzer (Institute of Botany, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf) for the realization of ultra-thin sections for the light and SEM microscopes with her excellent skills. S. Ott and J. Meeßen express their gratitude to the German Federal Ministry of Economics and Technology (BMWi) and the German Aerospace Center (DLR) for funding (50BW1153). We also thank the anonymous reviewers for their valuable comments and suggestions for improvement. The first author was recipient of a PhD scholarship during the development of this article given by the Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial – INTA and this research work will be included in his PhD thesis.

## References

- Ahmadjian, V. (1992). Basic mechanisms of signal exchange, and regulation in lichens. In *Algae and Symbiosis*, ed. Reisser, W., pp. 675–697. Biopress Limited, Bristol.
- Armstrong, G.A. & Hearst, J.E. (1996). Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* **10**, 228–237.
- Atwell, B.J., Kriedemann, P.E. & Turnbull, C.G.N. (eds) (1999). *Plants in Action: Adaptation in Nature, Performance in Cultivation*. Macmillan Education, Australia.
- Björn, L.O. (2007). Stratospheric ozone, ultraviolet radiation and cryptogams. *Biological Conservation* **135**(3), 326–333.
- Bornman, J.F. (1989). Target sites of UV-B radiation in photosynthesis of higher plants. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **4**, 145–158.
- Britt, A.B. (1999). Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends Plant Sci.* **4**(1), 20–25.
- Brodo, I.M., Sharnoff, S.D. & Sharnoff, S. (2001). *Lichens of North America*. Yale University Press, New Haven, CT.
- Bubrick, P., Galun, M. & Frensdorff, A. (1984). Observations on free-living *Trebouxia* de Puymaly and *Pseudotreboouxia* Archibald, and evidence that both symbionts from *Xanthoria-Parietina* (L.) Th. Fr. can be found free-living in nature. *New Phytol.* **97**, 455–462.
- Buffoni Hall, R. (2002). Effects of increased UV-B radiation on the lichen *Cladonia arbuscula* spp. *mitis*: UV-absorbing pigments and DNA damage. *PhD Dissertation*, Department of Cell and Organism Biology, Lund University, Sweden. <http://tinyurl.com/d49kkbq>
- Castenholz, R.W. & Garcia-Pichel, F. (2002). Cyanobacterial responses to UV-radiation. In *The Ecology of Cyanobacteria*, ed. Whitton, B.A. & Potts, M., pp. 591–611. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Castenholz, R.W. & Garcia-Pichel, F. (2012). Cyanobacterial responses to UV radiation. In *Ecology of Cyanobacteria II*, ed. Whitton, E. & Brian, A., pp. 481–499. Springer, The Netherlands.
- Cockell, C.S. & Knowland, J. (1999). Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **74**(3), 311–345.
- Culbertson, C.F. (1979). *Chemical and Botanical Guide to Lichen Products*. Otto Koeltz Science Publishers, Koenigstein, pp. 41, 161.
- de la Torre Noetzel, R. (2002). Estudio de los efectos de la radiación UV sobre ecosistemas epilíticos. *Tesis Doctoral*, Universidad Complutense de Madrid.
- de la Torre Noetzel, R., Sancho, L.G., Pintado, A., Rettberg, P., Rabbow, E., Panitz, C., Deutschmann, U., Reina, M. & Horneck, G. (2007a). BIOPAN experiment LICHENS on the Foton M2 mission Pre-flight verification tests of the *Rhizocarpon geographicum*-granite ecosystem. *Adv. Space Res.* **40**, 1665–1671.
- de la Torre, R., Garcia-Sancho, L. & Horneck, G. (2007b). Adaptation of the lichen *Rhizocarpon geographicum* to harsh high altitude conditions: relevance to a habitable Mars. In *Responses of Organisms to Simulated Mars Environment (ROME)*, ed. Cockell, C.S. & Horneck, G., pp. 145–150. ESA-SP 1299, ESA Publications Division, ESTEC, Noordwijk, The Netherlands.
- de la Torre, R., et al. (2010). Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions – Results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus* **208** (2), 735–748.
- de los Ríos, A., Ascaso, C., Wierzechos, J., Sancho, L.G. & Green, T.G.A. (2010). Space flight effects on lichen ultrastructure and physiology. In ‘*Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology*’ Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology, ed. Seckbach, J. & Grube, M., Vol. 17, pp. 577–593. Springer, Netherland.
- de Vera, J.P. (2005). Grenzen des Überlebens: Flechten als Modellsystem für das Potential von Adaptationsmechanismen eines Symbioseorganismus unter Extrembedingungen. *PhD Thesis*, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf.
- de Vera, J.-P. & Ott, S. (2010b). 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, ed. Seckbach, J. & Grube, M., vol. 17, pp. 595–611. Springer, Netherland.
- de Vera, J.P., Boettger, U., de la Torre, R., Sánchez, F.J., Grunow, D., Schmitz, N., Lange, C., Hübers, H.-W., Jaumann, R., Spohn, T. & Co-I team of BIOMEX (2012). Supporting Mars exploration: BIOMEX in Low Earth Orbit and further astrobiological studies on the Moon using Raman and PanCam technology. *Planet. Space Sci.* **74**, 103–110.
- Fahselt, D. (1994). Secondary biochemistry of lichens. *Symbiosis* **16**, 117–165.
- Feuerer, T. (1991). Revision der europäischen Arten der Flechtengattung *Rhizocarpon* mit nichtgelben Lager und vielzelligen Sporen. *Bibl. Lichenol.* **39**, 1–218.
- Floudas, D. et al. (2012). The Palaeozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* **336** (6089), 1715–1719.
- Friedl, (1995). Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of d18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochooropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae cl. nov). *J. Phycol.* **31**, 632–639.
- Gao, Y., Cui, Y., Xiong, W., Li, X. & Wu, Q. (2009). Effect of UV-C on algal evolution and differences in growth rate, pigmentation and photosynthesis between prokaryotic and eukaryotic algae. *Photochem. Photobiol.* **85**, 774–782.
- Gargaud, M. (editor-in-chief), Amils, R., Cernicharo Quintanilla, J., Cleaves, H.J., Irvine, W.M., Pinti, D., Viso, M., (eds) (2011). *Encyclopedia of Astrobiology*. ISBN 978-3-642-11279-9. [http://www.springerreference.com/docs/navigation.do?m=Encyclopedia+of+Astrobiology+\(Physics+and+Astronomy\)-book204](http://www.springerreference.com/docs/navigation.do?m=Encyclopedia+of+Astrobiology+(Physics+and+Astronomy)-book204)
- Gärtner, G. (1992). Taxonomy of symbiotic eukaryotic algae. In *Algae and Symbioses: Plants, Animals, Fungi, Viruses. Interactions Explored*, ed. Reisser, W., pp. 325–338. Biopress Ltd, Bristol.
- Gasulla, F. (2009). Insights on desiccation tolerance of the lichen photobiont *Trebouxia* sp. pl. in both thalline and isolated ones. *PhD Thesis*, Universitat de València Servei de Publicacions 2010. <http://hdl.handle.net/10803/39081>
- Gautam, S., Singh, J. & Pant, A.B. (2011). Effect of UV-B radiations on the pigments of two Antarctic lichens of Schirmacher Oasis, East Antarctica. *Pol. Polar Res.* **32**(3), 279–287.
- Green, T.G.A. & Lange, O.L. (1994). Photosynthesis in Poikilohydric Plants: A Comparison of Lichens and Bryophytes. In *Ecophysiology of Photosynthesis* (Springer Study Edition), Vol. 100, pp. 319–341. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Heber, U., Soni, V. & Strasser, R.J. (2011). Photoprotection of reaction centers: thermal dissipation of absorbed light energy vs charge separation in lichens. *Physiol. Plantarum* **142**(1), 65–78.
- Hedges, S.B., Blair, J.E., Venturi, M.L. & Shoe, J.L. (2004). A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life. *BMC Evol. Biol.* **4**, 2.
- Henssen, A. & Jahns, H.M. (1974). *Lichenes*. – Georg Thieme. Verlag, Stuttgart.

- Holder, J.M. (1998). FT-Raman Spectroscopy of Antarctic Epilithic Lichens. *PhD Thesis*, University of Bradford, Bradford.
- Horneck, G. (1999). European activities in exobiology in earth orbit: results and perspectives. *Adv. Space Res.* **23**(2), 381–386.
- 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. *Orig. Life Evol. Biosph.* **31**, 527–547.
- Horneck, G., Baumstark-Khan, C. & Facius, R. (2006). Radiation biology. In *Fundamentals of Space Biology*. Space Technology Library, vol. 18, pp. 291–336. Springer, New York.
- Huneck, S. (1999). The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* **86**, 559–570.
- Huneck, S. & Yoshimura, I. (1996). *Identification of Lichen Substances*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 1–9.
- Jansen, M.A.K., Mattoo, A.K. & Edelman, M. (1999). D1-D2 protein degradation in the chloroplast. Complex light saturation kinetics. *Eur. J. Biochem.* **260**, 527–532.
- Kappen, L., Schroeter, B., Scheidegger, C., Sommerkorn, M. & Hestmark, G. (1996). Cold resistance and metabolic activity of lichens below 0°C. Proceedings of the F3.1, F3.4, F2.4 and F3.8 Symposia of COSPAR Scientific Commission. *Adv. Space Res.* **18**(12), 119–128.
- Kasting, J.F. (1993). Earth's early atmosphere. *Science* **259**(5097), 920–926.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. & Stalpers, J.A. (2001). *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 9th edn. CAB International, Wallingford.
- Kranner, I., Beckett, R., Hochman, A. & Nash, T.H. (2008). Desiccation-tolerance in Lichens: a review. *Bryologist*, **111**(4), 576–593.
- Kroken, S. & Taylor, J.W. (2000). Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *Bryologist* **103**(4), 645–660.
- Lange, O.L. (1953). Hitze und Trockenresistenz der Flechten in Beziehung zu ihrer Verbreitung. *Flora* **140**, 39–97.
- Lange, O.L., Bilger, W., Rinke, S. & Schreiber, U. (1989). Chlorophyll fluorescence of lichens containing green and blue-green algae during hydration by water vapor and by addition of liquid water. *Bot. Acta* **102**, 306–313.
- Lange, O.L., Green, T.G.A., Meyer, A. & Zellner, H. (2007). Water relations and carbon dioxide exchange of epiphytic lichens in the Namib fog desert. *Flora* **202**, 479–487.
- Larkum, A.W.D. & Wood, W.F. (1993). The effect of UV-B radiation on photosynthesis and respiration of phytoplankton, benthic macroalgae and seagrasses. *Photosynth. Res.* **36**, 17–23.
- Larsson, P., Vecerová, K., Cempírková, H., Solhaug, K.A. & Gauslaa, Y. (2009). Does UV-B influence biomass growth in lichens deficient in sun-screening pigments? *Environ. Exp. Bot.* **67**, 215–221.
- Lumbsch, H.T. et al. (2011). One hundred new species of lichenized fungi: a signature of undiscovered global diversity. *Phytotaxa* **18**, 1–127.
- Meeßen, J., Sánchez, F.J., Brandt, A., Balzer, E.-M., de la Torre, R., Sancho, L.G.<sup>a</sup>, de Vera, J.-P. & Ott, S. (2013). Extremotolerance and resistance towards space conditions in lichens: Comparative studies on five species used in astrobiological research I. Morphological and anatomical characteristics. *Orig. Life Evol. Biosph.* **43**(3), 283–303.
- Mogedas, B., Casal, C., Forján, E. & Vilchez, C. (2009). Beta-carotene production enhancement by UV-A radiation in *Dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors. *J. Biosci. Bioeng.* **108**(1), 47–51.
- Nash, T.H. (ed.) (2008). *Lichen Biology*, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Nicholson, W.L., Schuergler, A.C. & Setlow, P. (2005). The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for Earth-to-Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutat. Res.* **571**, 249–264.
- Nybakken, L., Solhaug, K.A., Bilger, W. & Gauslaa, Y. (2004). The lichen *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats. *Oecologia* **140**, 211–216.
- Olson, J.M. (2006). Photosynthesis in the Archean Era. *Photosynth. Res.* **88**(2), 109–117.
- Onofri, S., de la Torre, R., de Vera, J.-P., Ott, S., Zucconi, L., Selbmann, L., Scalzi, G., Venkateswaran, 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.
- Paelrl, H. (1984). Cyanobacterial carotenoids: their roles in maintaining optimal photosynthetic production among aquatic bloom forming genera. *Oecologia* **61**(2), 143–149.
- 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.
- Rambold, G. & Triebel, D. (1992). The inter-lecanoralean associations. *Bibl. Lichen* **48**, 1–201.
- Rettberg, P. & Rothschild, L.J. (2002). Ultraviolet radiation in planetary atmospheres and biological implications. In *Astrobiology, The Quest for the Conditions of Life*, ed. Horneck, G. & Baumstark-Khan, C., pp. 233–243. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Rikkinen, J. (1995). What's behind the pretty colours? A study on the photobiology of lichens. *Bryobrothera* **4**, 1–239.
- Rothschild, L.J. & Cockell, C.S. (1999). Radiation: microbial evolution, ecology, and relevance to Mars missions. *Mutat. Res.* **430**(2), 281–291.
- Rozema, J. et al. (2002). The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems—an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **66**, 2–12.
- Sadowsky, A. & Ott, S. (2012). Photosynthetic symbionts in Antarctic terrestrial ecosystems: the physiological response of lichen photobionts to drought and cold. *Symbiosis* **58**, 81–90.
- Salguero, A., León, R., Mariotti, A., de la Morena, B., Vega, J.M. & Vilchez, C. (2005). UV-A mediated induction of carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* with retention of cell viability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**(5), 506–511.
- Sánchez, F.J., de la Torre, R., Sancho, L.G.<sup>a</sup>, Mateo-Martí, E., Martínez-Frías, J. & Horneck, G. (2010). *Aspicilia fruticulosa*: one of the most resistant organisms to outer space conditions and Mars simulated environment. In Special Issue: Abstracts from the 9th European Workshop on Astrobiology, Brussels, October 12–14, 2009. *Orig. Life Evol. Biosph.* **40**(6), 546.
- Sánchez, F.J., Mateo-Martí, E., Raggio, J., Meeßen, J., Martínez-Frías, J., Sancho, L.G.<sup>a</sup>, 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, L.G., Schroeter, B. & del Prado, R. (2000). Ecophysiology and morphology of the globular erratic lichen *Aspicilia fruticulosa* (EVERSM.) FLAG. From Central Spain. New aspects in cryptogamic research. *Bibl. Lichenol.* **75**, 137–147.
- 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 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**, 103–109.
- Sanderson, M.J. (2003). Molecular data from 27 proteins do not support a Precambrian origin of land plants. *Am. J. Bot.* **90**, 954–956.
- Sass, L. & Vass, I. (1998). Characterization of UV-B tolerance in lichens by photosystem II electron transport measurements. In *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, ed. Gareb, G., pp. 2381–2384. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 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.
- Schreiber, U., Bilger, W. & Neubauer, C. (1994). Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. *Ecol. Stud.* **100**, 49–70.
- Sohrabi, M. (2012). Taxonomy and phylogeny of the manna lichens and allied species (Megasporeaceae). *PhD Thesis*, Publications in

- Botany from the University of Helsinki. <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-10-7400-4>
- Solhaug, K.A. & Gauslaa, Y. (1996). Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina*. *Oecologia* **108**, 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**, 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.
- Sonesson, M., Callaghan, T.V. & Bjorn, L.O. (1995). Short-term effects of enhanced UV-B and CO<sub>2</sub> on lichens at different latitudes. *Lichenologist* **27**, 547–557.
- Strid, A., Chow, W.S. & Anderson, J.M. (1990). Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochim. Biophys. Acta* **1020**, 260–268.
- Strid, A., Chow, W.S. & Anderson, J.M. (1994). UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynth. Res.* **39**, pp. 475–489.
- Teramura, A.H. & Sullivan, J.H. (1994). Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynth. Res.* **39**, 463–473.
- Tevini, M. & Häder, D.-P. (1985). *Allgemeine Photobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p. 25.
- Tschermak-Woess, E. (1978). The Phycobionts in the Section *Cystophora* of *Chaenotheca*, especially *Dictyochloropsis splendid* and *Trebouxia simplex*, spec. nova. *Plant Syst. Evol.* **129**, 185–208.
- Tschermak-Woess, E. (1989). Developmental studies in trebouxoid algae and taxonomical consequences. *Plant. Syst. Evol.* **164**, 161–195.
- Ünal, D. & Uyanikgil, Y. (2011). UV-B induces cell death in the lichen *Physcia semipinnata* (J.F. Gmel) Turk. *J. Biol.* **35**, 137–144.
- Van de Poll, W.H., Hanelt, D., Hoyer, K., Buma, A.G.J. & Breeman, A.M. (2002). Ultraviolet-B-induced cyclobutane-pyrimidine dimer formation and repair in Arctic marine macrophytes. *Photochem. Photobiol.* **76**, 493–500.
- Wynn-Williams, D.D., Holder, J.M. & Edwards, H.G.M. (2000). Lichens at the limits of life: past perspectives and modern technology. *Bibl. Lichenol.* **75**, 275–288.
- Wynn-Williams, D.D., Edwards, H.G.M., Newton, E.M. & Holder, J.M. (2002a). Pigmentation as a survival strategy for ancient and modern photosynthetic microbes under high ultraviolet stress on planetary surfaces. *Int. J. Astrobiol.* **1**, 39–49.
- Wynn-Williams, D.D. & Edwards, H.G.M. (2002b). Environmental UV radiation: biological strategies for protection and avoidance. In *Astrobiology, The Quest for the Conditions of Life*, ed. G. Horneck & C. Baumstark-Khan, pp. 245–260. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Yamazaki, J., Takahisa, S., Emiko, M. & Yasumaro, K. (2005). The stoichiometry and antenna size of the two photosystems in marine green algae, *Bryopsis maxima* and *Ulva pertusa*, in relation to the A light environment of their natural habitat. *J. Exp. Bot.* **56**(416), 1517–1523.
- Yoon, H.S., Hackett, J.D., Ciniglia, C., Pinto, G. & Bhattacharya, D. (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 809–818.
- Young, A.J., Phillip, D. & Savill, J. (1997). Carotenoids in higher plant photosynthesis. In *Handbook of Photosynthesis*, ed. Pessaraki, M., pp. 575–596. Marcel Dekker, New York.

# Publicación III

Onofri, S.; de la Torre, R.; de Vera, J.P.; Ott, S.; Zucconi, L.; Selbmann, L.; Scalzi, G.; Venkateswaran, K.J.; Rabbow, E.; Sánchez, F.J.; Horneck, G. 2012. **Survival of rock-colonizing organisms after 1.5 year in outer space** *Astrobiology* 12 (5): 508-516

**Resumen:** Algunas comunidades microbianas criptoendolíticas y líquenes epilíticos han sido considerados como candidatos apropiados para el escenario de la hipótesis de la Litopanspermia, que propone un intercambio interplanetario natural de organismos por medio de rocas eyectadas por un impacto en su planeta de origen. Hasta ahora, la resistencia de estos organismos terrestres bajo las severas y hostiles condiciones espaciales, no ha sido evaluada durante largos períodos de tiempo. Un primer experimento de exposición espacial a largo plazo (1,5 años) se llevó a cabo con una variedad de organismos eucarióticos colonizadores de rocas en la Estación Espacial Internacional a bordo de la plataforma europea EXPOSE-E. Los organismos seleccionados fueron aquellos que estaban especialmente adaptados para sobrevivir los ambientes extremos de sus hábitats de origen. Se demostró que algunas (pero no todas) de esas resistentes comunidades microbianas procedentes de las regiones más extremas de la Tierra eran parcialmente resistentes a las condiciones presentes en el espacio exterior, que incluye alto vacío, fluctuación de temperaturas, el espectro completo de radiación electromagnética solar extraterrestre y radiación cósmica ionizante. A pesar de que el período de 1,5 años no es comparable con los intervalos de tiempo de miles o millones de años que se consideran necesarios para el transporte interplanetario en la hipótesis de la Litopanspermia, los datos obtenidos suponen la primera evidencia de la resiliencia diferencial de distintas comunidades criptoendolíticas sometidas a condiciones espaciales.

To: Comisión de Doctorado  
Facultad de Biología  
Universidad Complutense de Madrid - UCM  
C/ José Antonio Novais, 12 - Ciudad Universitaria  
28040 - MADRID

### **Authorization**

I, Dr. Silvano Onofri, Botany professor and director of the Department of Ecological and Biological Sciences of the Tuscia University, in quality of first author of the paper entitled *Survival of rock-colonizing organisms after 1.5 years in outer space* published in the journal *Astrobiology* (Volume 12, Number 5, 2012), hereby authorize its inclusion in my name and of the rest of co-authors in the PhD thesis of Fco. Javier Sánchez Íñigo to be defended in the Complutense de Madrid University.

In witness whereof and at the request of the interested person, I sign this certificate.

Viterbo, 13 november 2013



# Survival of Rock-Colonizing Organisms After 1.5 Years in Outer Space

Silvano Onofri,<sup>1</sup> Rosa de la Torre,<sup>2</sup> Jean-Pierre de Vera,<sup>3</sup> Sieglinde Ott,<sup>4</sup> Laura Zucconi,<sup>1</sup>  
Laura Selbmann,<sup>1</sup> Giuliano Scalzi,<sup>1,5</sup> Kasthuri J. Venkateswaran,<sup>5</sup> Elke Rabbow,<sup>6</sup>  
Francisco J. Sánchez Iñigo,<sup>2</sup> and Gerda Horneck<sup>6</sup>

## Abstract

Cryptoendolithic microbial communities and epilithic lichens have been considered as appropriate candidates for the scenario of lithopanspermia, which proposes a natural interplanetary exchange of organisms by means of rocks that have been impact ejected from their planet of origin. So far, the hardiness of these terrestrial organisms in the severe and hostile conditions of space has not been tested over extended periods of time. A first long-term (1.5 years) exposure experiment in space was performed with a variety of rock-colonizing eukaryotic organisms at the International Space Station on board the European EXPOSE-E facility. Organisms were selected that are especially adapted to cope with the environmental extremes of their natural habitats. It was found that some—but not all—of those most robust microbial communities from extremely hostile regions on Earth are also partially resistant to the even more hostile environment of outer space, including high vacuum, temperature fluctuation, the full spectrum of extraterrestrial solar electromagnetic radiation, and cosmic ionizing radiation. Although the reported experimental period of 1.5 years in space is not comparable with the time spans of thousands or millions of years believed to be required for lithopanspermia, our data provide first evidence of the differential hardiness of cryptoendolithic communities in space. Key Words: Astrobiology—Lithopanspermia—Radiation resistance—Survival—Vacuum. Astrobiology 12, 508–516.

## 1. Introduction

THE LITHOPANSPERMIA hypothesis suggests that impact-ejected rocks could transfer living organisms through space from one planet to another. This scenario implies that rock-embedded organisms need to survive the following three phases: first (phase-I), the ejection into space inside rock fragments due to an impact of a cosmic projectile on one planet (Melosh, 1984); second (phase-II), the journey through space for a long time (hundreds, even thousands or millions, of years) (Gladman *et al.*, 1996); and last (phase-III), the capture by and landing on another planet (Mileikowsky *et al.*, 2000; Horneck *et al.*, 2008; Nicholson, 2009). This hypothesis dates back to Lord Kelvin's presidential address to the British Association in 1871 (Thomson, 1871). However, it was dismissed by most contemporary scientists at the time because the general opinion was that outer space would kill any living

being exposed to it and there was no way to test the idea experimentally. Another severe criticism was that such a hypothesis just shifts the problem of the origin of life to another planet. Only in the last decade, after the detection of several meteorites that originated from Mars (Nyquist *et al.*, 2001; Fritz *et al.*, 2005; Shuster and Weiss, 2005; The Meteoritical Society, 2011), has lithopanspermia been seriously considered again (Sancho *et al.*, 2007; Stöffler *et al.*, 2007; Horneck *et al.*, 2008, 2010; Nicholson, 2009; de la Torre *et al.*, 2010).

Shock recovery experiments performed to test phase-I of lithopanspermia showed that spores of *Bacillus subtilis* and the lichen *Xanthoria elegans* could survive pressures up to 40 GPa, which are comparable to those experienced by the martian meteorites (Stöffler *et al.*, 2007; Horneck *et al.*, 2008). Space technology provided the opportunity to study a variety of biological specimens after exposure to space. Among the systems tested, bacterial spores (*B. subtilis*) and the

<sup>1</sup>Department of Ecological and Biological Sciences, University of Tuscia, Viterbo, Italy.

<sup>2</sup>Department of Earth Observation, Spanish Aerospace Research Establishment-INTA, Torrejón de Ardoz, Madrid, Spain.

<sup>3</sup>Institute of Planetary Research, German Aerospace Center (DLR), Berlin, Germany.

<sup>4</sup>Institut für Botanik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany.

<sup>5</sup>Jet Propulsion Laboratory, California Institute of Technology, Pasadena, California, USA.

<sup>6</sup>Institute of Aerospace Medicine, German Aerospace Center (DLR), Cologne, Germany.

lichens *Rhizocarpon geographicum* and *X. elegans* stood out due to their high resistance to the hostile space environment (Sancho *et al.*, 2007; de la Torre *et al.*, 2010; Horneck *et al.*, 2010). However, eukaryotes have never been studied after long-term exposures to space conditions.

To investigate the fate of lithic organisms and communities during long-term travel in space, we used ESA's EXPOSE-E facility (Rabbow *et al.*, 2009, 2012). This facility was attached to the balcony of the Columbus module of the International Space Station (ISS) (Fig. 1A). EXPOSE-E was designed to expose a variety of biological systems to selected parameters of space over time spans of one year and more. All biological test systems of the LIFE (Lichens and Fungi Experiment) experiment were rock-dwelling organisms from hostile regions: Antarctic cryptoendolithic (dwelling inside rocks) communities in their natural sandstone, microcolonial black cryptoendolithic fungi (*Cryomyces antarcticus* and *Cryomyces minteri*) isolated from Antarctic sandstone, and high mountain epilithic lichens (*R. geographicum* and *X. elegans*) (de Vera *et al.*, 2003, 2008; Selbmann *et al.*, 2005; Sancho *et al.*, 2007; de la Torre *et al.*, 2010). These lichens were selected as test systems due to their high resistance to space conditions demonstrated during short-term (10–16 days) exposures (Lichens experiment on ESA's Foton-M2 Mission 2005 and Lithopanspermia experiment on ESA's Foton-M3 Mission 2007) (Sancho *et al.*, 2007; de la Torre *et al.*, 2010). The biological samples were accommodated in small chambers (1.4 cm in diameter) of the EXPOSE-E facility (Fig. 1B). During the space mission, they were exposed either to the full space environment (vacuum from  $10^{-7}$  to  $10^{-4}$  Pa, fluctuations of temperature between  $-21.5^{\circ}\text{C}$  and  $+59.6^{\circ}\text{C}$ , cosmic ionizing radiation up to 190 mGy, and solar extraterrestrial electromagnetic radiation up to  $6.34 \times 10^8 \text{ J m}^{-2}$ ) or they were shielded from insolation. After 1.5 years in space, the samples were retrieved and their viability investigated. During the mission, the Sun-exposed LIFE samples were

exposed to 1879 estimated solar constant hours (Rabbow *et al.*, 2012).

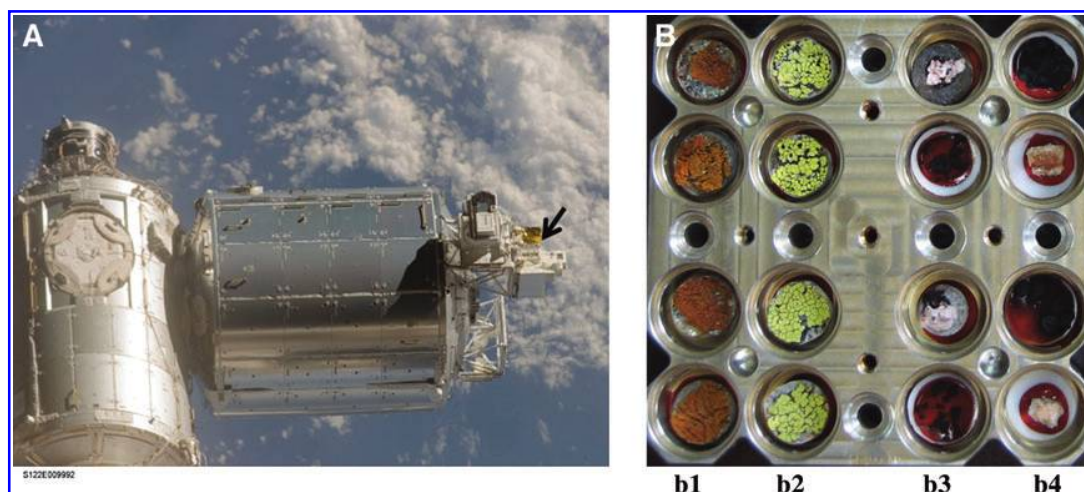
## 2. Material and Methods

### 2.1. Experiment hardware and biological samples of the LIFE experiment on board the International Space Station

The EXPOSE-E facility is part of the European Technology Exposure Facility (EuTEF) (Fig. 1A), which was designed for testing different materials under selected parameters of space. On 7 February 2008, EuTEF with EXPOSE-E accommodating the biological samples of the LIFE experiment (Fig. 1B) was launched on board Space Shuttle STS-122 for the ISS. On 15 February 2008, EXPOSE-E was mounted onto the outside balcony of the Columbus module by extravehicular activity. EXPOSE-E was decommissioned on 1 September 2009, retrieved by extravehicular activity on 2 September 2009, and returned to Earth on 12 September 2009 with STS-128. During the 1.5 years mission, the samples were exposed to space vacuum ( $10^{-7}$  to  $10^{-4}$  Pa) (Horneck *et al.*, 2010), galactic cosmic radiation ( $\leq 190$  mGy) (Berger *et al.*, 2012), and the full spectrum of solar extraterrestrial electromagnetic radiation ( $\lambda > 110$  nm) with fluences of  $9.19 \times 10^5 \text{ J m}^{-2}$  (below a 0.1% transmission neutral density filter) and  $6.34 \times 10^8 \text{ J m}^{-2}$  (100% transmission insolated samples). All fluences were calculated for the biologically active UV range of  $200 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$ , depending on the orientation of the ISS to the Sun. Temperature varied between  $-21.5^{\circ}\text{C}$  and  $+59.6^{\circ}\text{C}$  (Rabbow *et al.*, 2012).

### 2.2. Test systems of the LIFE experiment

The lichen *Xanthoria elegans* was collected from alpine habitats between 2000 and 3000 m altitudes at Zermatt, Switzerland ( $45^{\circ}59'\text{N}$ ,  $7^{\circ}48'\text{E}$ ) (de Vera *et al.*, 2003, 2008);



**FIG. 1.** Experiment hardware and biological samples of the LIFE experiment. (A) EXPOSE-E facility (arrow) attached to the Columbus module of the ISS during orbital flight, accommodating the LIFE samples. (B) Samples of the LIFE experiment accommodated in one of the compartments of the EXPOSE-E facility (well diameter 1.4 cm). Vertical rows show *X. elegans* (b1) and *R. geographicum* (b2) on their natural rock habitat; dried cultures of the lichen fungus (mycobiont) of *X. elegans* (1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> sample from the top in b3); sandstone fragments colonized by a stratified cryptoendolithic microbial community (2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> samples from the top in b4), and the fungi *C. antarcticus* and *C. minteri* (from the top 2<sup>nd</sup> and last sample in b3, upper and 3<sup>rd</sup> sample in b4). Color images available online at [www.liebertonline.com/ast](http://www.liebertonline.com/ast)

*Rhizocarpon geographicum* was collected from the Plataforma de Gredos, Spain (40°17'N, 5°14'W) at an altitude of 2020 m (de la Torre *et al.*, 2010); sandstone fragments colonized by a stratified cryptoendolithic microbial community were collected by L. Zucconi at Battleship Promontory (76°54'37.6"S, 160°55'27.5"E), Southern Victoria Land, Antarctica, in January 2004; and the microcolonial black yeast-like fungi *Cryomyces antarcticus* CCFEE 515 and *Cryomyces minteri* CCFEE 5187, both dwelling cryptoendolithically, were isolated from sandstone collected in McMurdo Antarctic Dry Valleys (Selbmann *et al.*, 2005). The survival of those cryptoendolithic organisms is of special interest in terms of lithopanspermia because rocks may supply an additional external protection to face the impact-driven ejection into space (Horneck *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2011) and transfer from one planet to another.

### 2.3. Viability assays of the LIFE test systems

The photosynthetic activity of the lichens *X. elegans* and *R. geographicum* was measured after reactivating the samples in a climatic chamber under the following controlled conditions: constant temperature of 10°C, 12 h light and 12 h dark cycles for 96 h (*X. elegans*) or 72 h (*R. geographicum*). Irradiation with photosynthetically active light was performed by using a mercury lamp with a  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  photosynthetic photon flux density. For rehydration, samples were sprayed twice a day with deionized water. After reactivation, the activity of the photosystem II (PSII) of the photobiont was measured with a Mini-PAM fluorometer (Heinz Walz GmbH), as described previously (Sancho *et al.*, 2007; de Vera *et al.*, 2010). Lichens were rewetted immediately before each measurement. The optimum quantum yield of chlorophyll *a* was determined by fluorescence measurements after 20 min of dark adaptation, according to the equation

$$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$$

with  $F_v$  = variable fluorescence yield,  $F_m$  = maximal fluorescence yield, and  $F_o$  = minimal fluorescence yield. This optimum quantum yield of PSII was taken as an indication of the PSII activity of the photobiont of the lichen system after the exposure to space parameters. The percentage ( $n=2$  for space 100% insolated and for space 0.1% insolated, and  $n=4$  space dark samples) of PSII activity was determined from the ratio of the  $F_v/F_m$  of the same flight sample before and after flight. Control data are given for the same sample measured before spaceflight (preflight).

The survival of *C. antarcticus* and *C. minteri* was determined from their colony-forming ability as percentages of colony-forming units (CFU). Growth tests were performed by suspending fungal cells from rehydrated colonies in a 0.9% NaCl solution, inoculating them on malt agar Petri dishes (five replicates), and incubating them at 15°C for 30 days. Control data were obtained from fresh colonies. Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) and pairwise multiple comparison procedure (Tukey test), which was carried out by using the statistical software SigmaStat 2.0 (Jandel, USA). The means ( $n=5$ )  $\pm$  standard deviation (s.d.) are plotted. \* $P=0.001$ ; power of performed test with  $\alpha=0.050$ : 1.000.

The propidium monoazide (PMA) assay was used to check the integrity of the cell membranes after spaceflight. Fractions of DNA extracted from intact cells of cryptoendolithic fungi *C. antarcticus* and *C. minteri* colonies were compared with the fraction of DNA extracted from cells isolated from the space-exposed colonized sandstone fragments. It was performed by adding PMA (Biotium, Hayward, CA) at a final concentration of 200  $\mu\text{M}$  to the rehydrated fungal colonies or to powdered rock suspensions in phosphate-buffered saline solution. PMA penetrates only damaged cell membranes, cross-links then to DNA after light exposure, and thereby prevents polymerase chain reaction (PCR). Following DNA extraction and purification (Maxwell 16 automated DNA extraction instrument, Promega, Madison, WI), quantitative PCR (Bio-Rad CFX96 real time PCR detection system) was used to quantify the number of fungal internal transcribed spacer (ITS) ribosomal DNA fragments present in both PMA treated and non-treated samples. For all reactions, 1  $\mu\text{L}$  of purified genomic DNA was added to 23  $\mu\text{L}$  of PCR cocktail containing 1X Power Sybr-Green PCR Master Mix (Applied Bios, Foster City, CA), as well as NS91 forward (5'-gtc cct gcc ctt tgt aca cac-3') and ITS51 reverse (5'-acc ttg tta cga ctt tta ctt cct c-3') primers, each at 0.02 M final concentration. These primers amplify a 203 bp product spanning the 18S/ITS1 region of rRNA-encoding genes.

A standard quantitative PCR cycling protocol consisting of a hold at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturing at 95°C for 15 s, annealing at 58°C for 20 s, and elongation at 72°C for 15 s, was performed. Fluorescence measurements were recorded at the end of each annealing step. At the conclusion of the 40<sup>th</sup> cycle, a melt curve analysis was performed by recording changes in fluorescence as a function of raising the temperature from 60°C to 95°C in 0.5°C per 5 s increments. These protocols were applied to the processing of both fungal colonies and cryptoendolithic sandstone samples.

Control data were obtained for an identical sample stored on ground in the laboratory during the mission (Control). Because cryptoendolithic communities are not uniformly distributed within the rocks, different quantities of total fungal DNA were obtained from different rock samples.

Space data are given for samples shielded from extraterrestrial UV radiation (Space Dark), exposed to  $\lambda > 110 \text{ nm}$  at a fluence of  $9.19 \times 10^5 \text{ J m}^{-2}$  beneath a 0.1% transmission MgF<sub>2</sub> filter (Space 0.1% insolated), or at a higher fluence of  $6.34 \times 10^8 \text{ J m}^{-2}$  (Space 100% insolated). Statistical analyses were performed by one-way ANOVA and pairwise multiple comparison procedure (Tukey test), which was carried out by using the statistical software SigmaStat 2.0 (Jandel, USA) \* $P=0.001$ ; \*\* $P>0.05$ . Power of performed test with  $\alpha=0.050$ : 1.000. The means ( $n=3$ ) and  $\pm$  s.d. are plotted.

### 2.4. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) imaging: viability of *X. elegans* analyzed by LIVE/DEAD staining kit FUN 1

Adult lichen thallus, young thallus, and the isolated mycobiont of *X. elegans* were stained by FUN 1 to determine their viability. A green and yellow color of the cells indicates that they still maintain vitality. A change from green to yellow in the cytoplasm and from green to red in the vacuoles is an indication of physiological activity expressed by accumulation of the dye in the vacuoles. Dead cells cannot

be stained; therefore, red crystals are not formed in the vacuoles.

Instruments used for imaging are as follows: LSM 510 META of Carl Zeiss Mikroskopsysteme Jena GmbH with objective lenses 10 $\times$  and 40 $\times$ /oil immersion, scanning resolution 1024 $\times$ 1024 pixels and time 64  $\mu$ s to 1.76  $\mu$ s, scan zoom 0.7 $\times$ –2.8, image bit depth 12 bit, experimental temperature condition 22 $^{\circ}$ C, UV-laser with emission wavelength 488/561/633 nm and VIS-laser HeNe with 633 nm excitation and 5 mW power, filters with ChS1 679–754; Ch2 BP 505–550; Ch3 BP 575–615. For operation of the instrument, the Carl Zeiss Jena GmbH software system at the Institute of Genetics of the Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf was used.

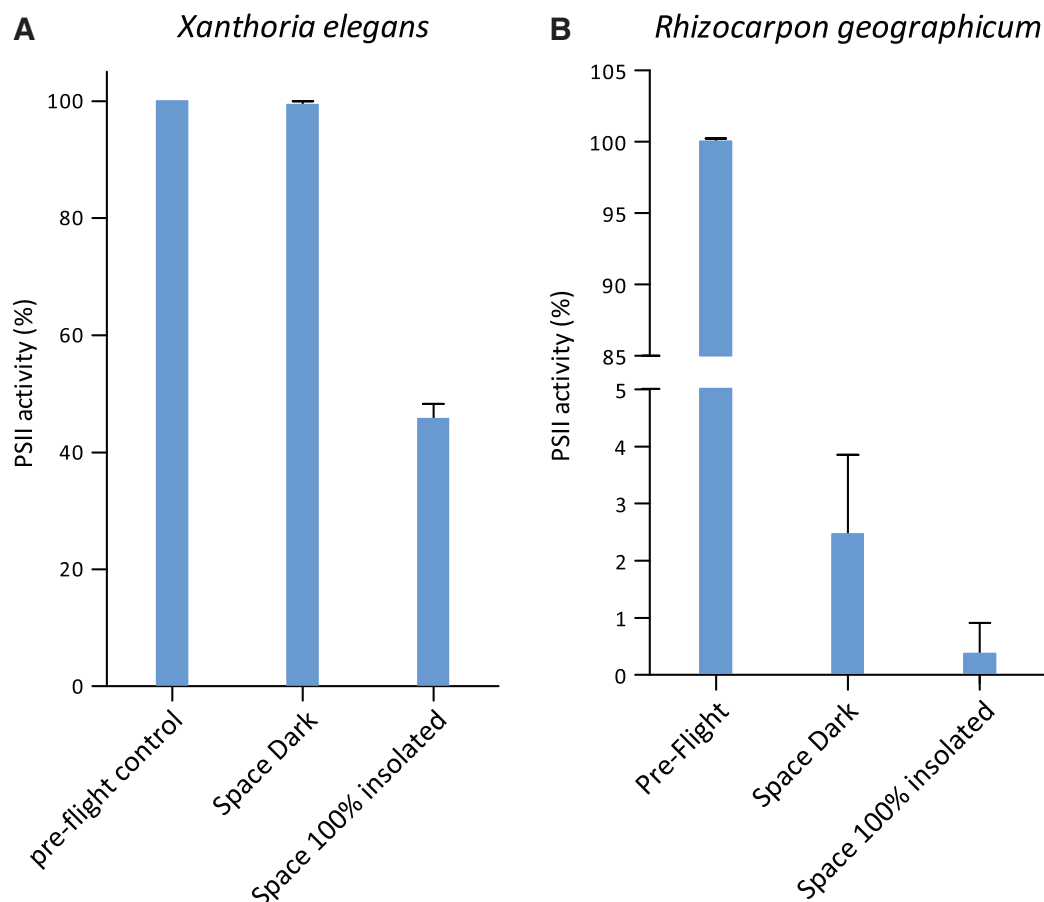
### 3. Results

First visual inspections assured that the “space samples” had not changed in shape and color compared to their pre-flight appearances. Tailored to each test system, different viability assays were applied: (i) photosynthetic activity of the lichenized alga (photobiont) of *X. elegans* and *R. geographicum* (Fig. 2); (ii) colony-forming ability of *C. antarcticus* and *C. minteri* (Fig. 3A and 3B); (iii) fraction of DNA amplified from intact cells of *C. antarcticus* and *C. minteri* and of

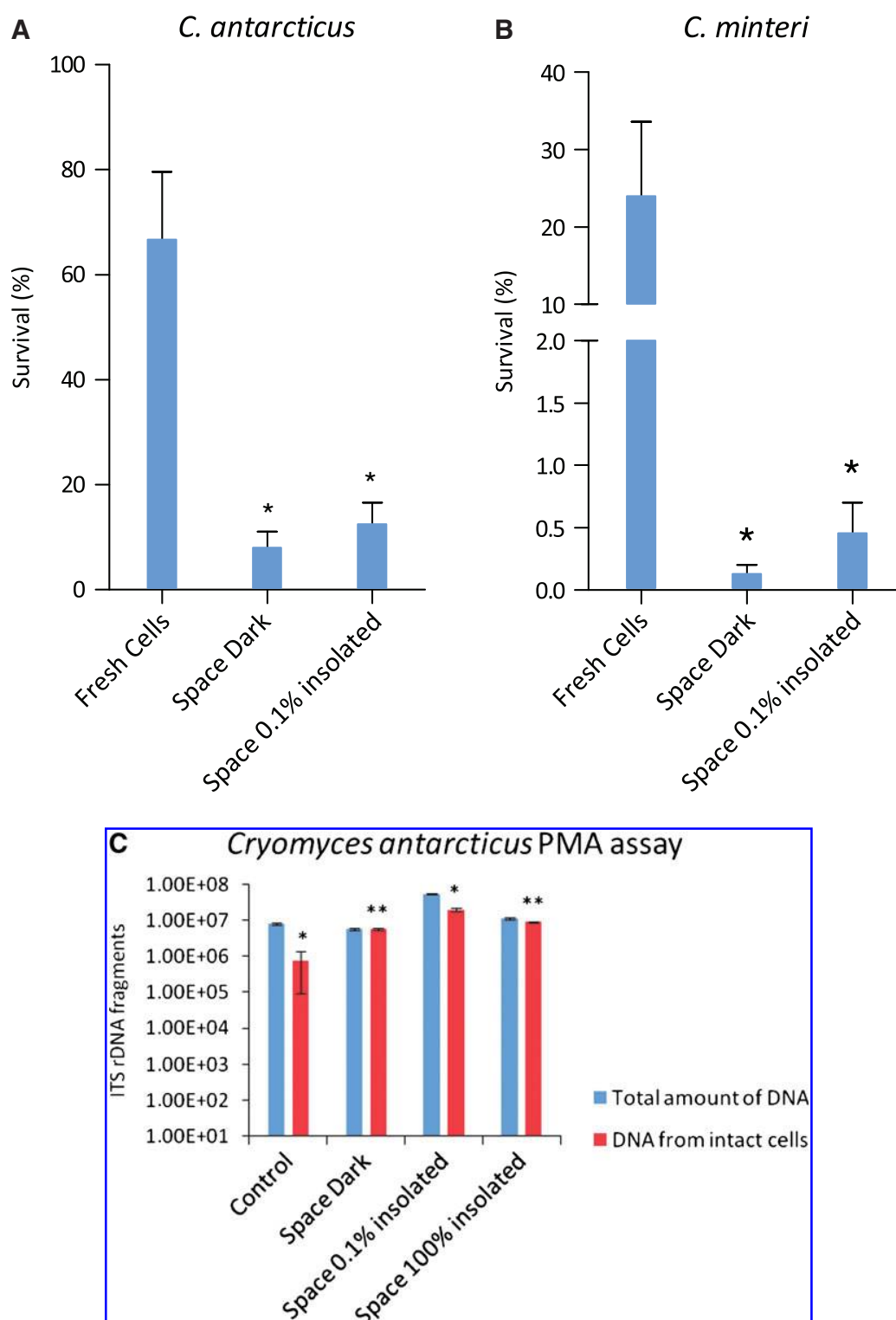
cryptoendolithic communities inside sandstone fragments (Fig. 3C, 3D, and 3E); and (iv) viability of *X. elegans* and the fungus of the lichen (mycobiont, cultured without the algal symbiont and dried) by means of vital staining (Fig. 4).

Among those space samples that were shielded from extraterrestrial insolation but exposed to space vacuum, cosmic radiation, and temperature fluctuations (Space Dark in Figs. 2 and 3), the lichen *X. elegans* excelled by a PSII activity of  $99.35 \pm 0.59\%$  compared to the preflight data of the same samples (Fig. 2A). This high viability was not reached by the other space test systems kept in the dark during the mission:  $2.46 \pm 1.39\%$  for the PSII activity of the lichen *R. geographicum* (Fig. 2B), and  $8.04 \pm 3.05\%$  and  $0.13 \pm 0.07\%$  surviving cells for *C. antarcticus* and *C. minteri*, respectively (Fig. 3A and 3B). PMA assay showed  $98 \pm 4.67\%$  and  $8.14 \pm 0.35\%$  of DNA amplified from intact cells from colonies of *C. antarcticus* and *C. minteri*, respectively (Fig. 3C and 3D), in comparison to total extracted DNA; the percentage of DNA amplified from intact fungal cells in sandstone fragments was  $18 \pm 0.18\%$  (Fig. 3E).

The viability of culturable cells was not further decreased in the black fungi ( $12.5 \pm 4.11\%$  for *C. antarcticus* and  $0.46 \pm 0.24\%$  for *C. minteri*) that were insolated with the full extraterrestrial spectrum ( $\lambda > 110$  nm) of the Sun, having



**FIG. 2.** Viability of the lichens (A) *X. elegans* and (B) *R. geographicum*, determined by fluorescence measurements of the photosynthetic activity of the photobiont. Control data are given for the same sample measured before spaceflight (preflight), as 100% viability. Space data are given for samples shielded from extraterrestrial UV radiation (Space Dark), and insolated ( $\lambda > 110$  nm) at a fluence of  $6.34 \times 10^8$  J m $^{-2}$  (Space 100% insolated). Color images available online at [www.liebertonline.com/ast](http://www.liebertonline.com/ast)



**FIG. 3.** Viability of the fungi (A) *C. antarcticus* and (B) *C. minteri*, as percentage of survival, determined as CFU. Control data were obtained from fresh colonies. No CFU were obtained from the samples "Space 100% insolated." The means  $\pm$  s.d. are plotted. \* $P=0.001$ . Power of performed test with  $\alpha=0.050$ : 1.000. ITS rDNA fragments amplified from intact cells of *C. antarcticus* and *C. minteri* (C and D) colonies and from sandstone fragments (E) after different space conditions, compared to total extracted DNA. PMA penetrates only damaged cells' membranes, cross-linking to DNA after light exposure and thereby preventing PCR amplification. Following DNA extraction and purification, quantitative PCR was used to quantify the number of fungal ITS rDNA fragments (203 bp) amplifiable in samples treated and non-treated with PMA. The means ( $n=3$ ) and  $\pm$  s.d. are plotted. Statistical significance was calculated by using the Tukey test. \* $P=0.001$ . \*\* $P>0.05$ . Power of performed test with  $\alpha=0.050$ : 1.000. Color images available online at [www.liebertonline.com/ast](http://www.liebertonline.com/ast)

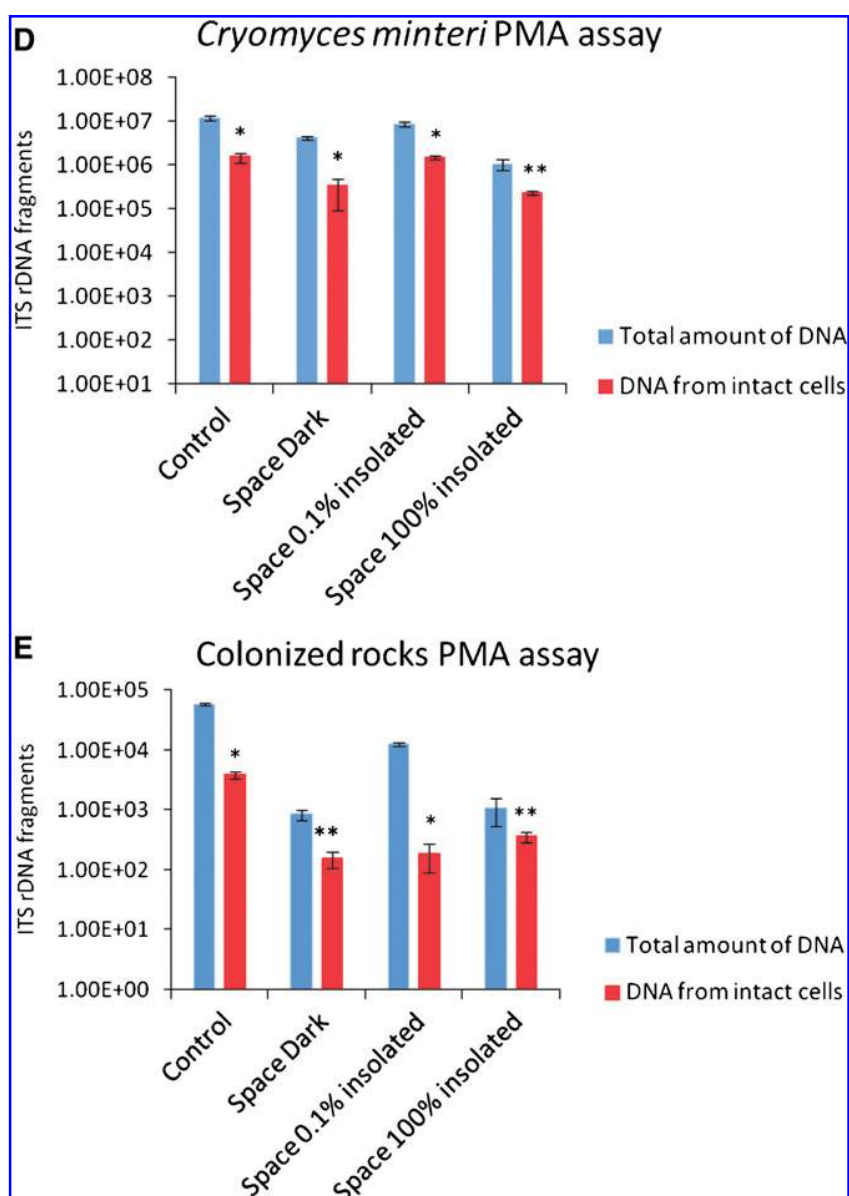


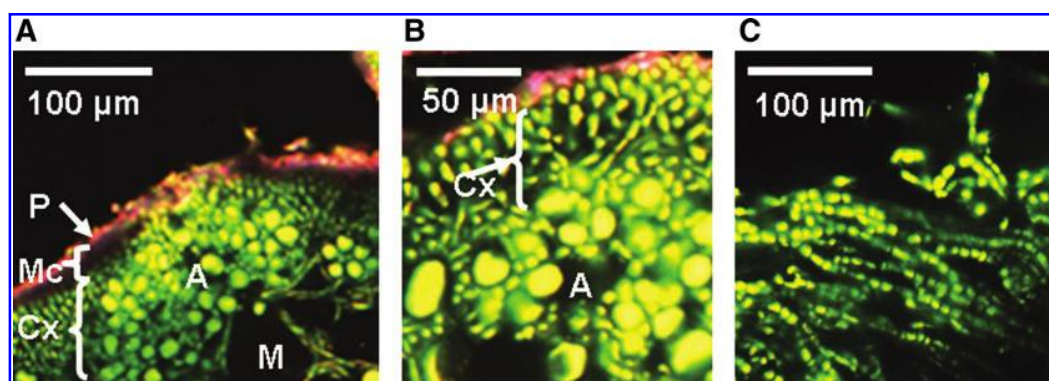
FIG. 3. Continued.

received an UV irradiation of  $9.19 \times 10^5 \text{ J m}^{-2}$  (Space 0.1% insolated, Fig. 3A and 3B). The highest fraction of intact fungal cells ( $35 \pm 0.15\%$ ) occurred in a sandstone sample that had received the full influx of solar electromagnetic radiation of  $6.34 \times 10^8 \text{ J m}^{-2}$  (Space 100% insolated, Fig. 3E). When comparing all test systems exposed to outer space, including the high influx of full solar extraterrestrial radiation ( $6.34 \times 10^8 \text{ J m}^{-2}$ ), again the lichen *X. elegans*, with a PSII activity of  $45 \pm 2.50\%$  (Fig. 2A) and *C. antarcticus* with  $80 \pm 0.82\%$  of DNA from intact cells (Fig. 3C), were the most resistant test systems of LIFE. However, black Antarctic cryptoendolithic fungi lost colony-forming ability after exposure to full insolation; no survivors were detected in the space 100% insolated samples. Resistance of *X. elegans* and its mycobiont after exposure to the combined action of all space parameters tested, including full insolation, was confirmed by vital staining and CLSM. Figure 4 shows the high

capacity of the lichenized fungus (part of the symbiotic lichen association) in a young thallus (B), and of the lichen fungus of *X. elegans* in pure culture (C), to resist space exposure. The fungal cells in the cortex (Cx) of the young thallus were still vital, although a protecting mucilage layer had not been formed, and the parietin layer appeared to be very thin. The same features appeared to (C), the fungal cells of the mycelium.

#### 4. Discussion

The LIFE experiment provided for the first time data on the viability of rock-dwelling organisms and microbial communities after a long-term exposure to space parameters. These conditions cannot easily be simulated in the laboratory, if at all. The test systems collected from hostile conditions, such as Antarctica and high mountain regions, are



**FIG. 4.** CLSM imaging: viability of *X. elegans* analyzed by LIVE/DEAD staining kit FUN I. (A) Adult lichen thallus, (B) young thallus, and (C) lichen fungus isolated in pure culture (mycobiont) of *X. elegans*, all dried and exposed to 100% insolation and space vacuum. Green to yellow cells are stained by FUN 1, indicating vital cells. Turning from green to yellow and finally to red indicates physiological activity expressed by the accumulation of the dye in the vacuoles. The high degree of maintained viability is due to a cortex Cx, a mucilage layer Mc, and crystal deposits of parietin P on the surface of the lichen. These layers are able to protect interior cells of the algal layer A and the medulla M.

adapted to cope with high radiation intensities, arid phases, and extreme temperature fluctuations that are in some ways similar to those experienced in space. In *C. antarcticus*, for example, globular cells are enveloped in a thick melanized cell wall, which protects them from radiation and desiccation. Their meristematic way of producing colonies (*i.e.*, dividing in all directions) further supports their resistance (Onofri *et al.*, 2008, 2009; Selbmann *et al.*, 2005; Sterflinger, 2005). Special protection against environmental extremes is also granted for the photobiont, the green alga *Trebouxia* sp. of the lichen *X. elegans*. In this symbiotic organization, the fungus forms a cortex with an upper layer encrusted with parietin and a mucilage layer that envelops the algal cells in a medulla matrix (Fig. 4A and 4B) (de Vera *et al.*, 2003, 2008).

All organisms selected for the LIFE experiment are poikilohydric, that is, they are able to dehydrate till most biochemical activities stop. In this state, they are highly tolerant to stresses and may resume their metabolism once water becomes available again. Specifically, exposure to vacuum should inhibit any oxidative process related to their metabolism; this particular effect could protect against other damaging effects induced, for example, by solar UV radiation, cosmic ray ions, and temperature extremes.

The LIFE experiment has demonstrated that some, but not all, of those most robust microbial communities from extremely hostile regions on Earth are also partially resistant against the even more hostile environment of outer space. In this experiment, the following species stood out as the most persistent survivors after 1.5 years in outer space: the black fungus *C. antarcticus* (as determined from PMA assay) and the symbiotic *X. elegans* (as determined from PSII activity) and its mycobiont (as determined by LIVE/DEAD staining). However, the CFU test did not yield any survivors of *C. antarcticus* flight samples that were exposed to the unattenuated solar extraterrestrial spectrum (space 100% insolated) and less than 10% survivors for the space dark samples. This means that even if the cell membrane seemed to be intact, as indicated by the PMA test, the cells had lost their ability to grow and divide.

Earlier studies have shown that the circumpolar and alpine red lichen *X. elegans* was able to retain its photosyn-

thetic activity almost completely after 14 days in space (Sancho *et al.*, 2007; de la Torre *et al.*, 2010). This observation was confirmed in the present study for a much longer exposure time of 565 days in space, although this high viability was only observed for the lichen that had been shielded from solar electromagnetic irradiation, maintaining 45% PSII activity after 100% insolation exposure. CLSM, in combination with the use of specific fluorescent probes, allowed for the assessment of the physiological state of the cells. Particularly, the mycobiont seemed to play a fundamental role in maintaining the viability of the entire lichen system, because 565 days in space appeared not to have any effect on its physiological activity, even after 100% insolation (Fig. 4C). These observations are in agreement with earlier ones from short-term space exposures (de la Torre *et al.*, 2010); in those studies the spores also maintained a high germination capacity, even after exposure to the full spectrum of solar UV radiation. However, so far, the ability of *X. elegans* to reproduce after this long-term space exposure remains an open question.

Interestingly, it has been earlier shown that *X. elegans* also resisted shock pressures comparable to those experienced by the martian meteorites during impact ejection (Horneck *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2011), as required for phase-I of lithopanspermia.

Although we have demonstrated that some rock-dwelling species are capable of partially withstanding the harsh environment of outer space, or certain parameters of it, for at least 1.5 years, the data are insufficient for drawing any consequences for the likelihood of lithopanspermia. The possibility of surviving a much longer journey in space, as would be required for natural travel from Mars to Earth or vice versa, still remains an open question. This especially applies to organisms that dwell at the surface of rocks, like the lichen *X. elegans*, which would be fully exposed to the lethal spectrum of solar extraterrestrial UV radiation during a hypothetical interplanetary transfer. The only one data point at an exposure time of 1.5 years, resulting in a viability of  $45 \pm 2.50\%$ , as determined by PSII activity, does not allow any extrapolation over hundreds, thousands, or even millions of years, as would be required for lithopanspermia (Gladman *et al.*, 1996). The situation would be much more favorable for

endolithic organisms, because they would be shielded from solar UV radiation by the surrounding rock material. However, the cryptoendolithic organisms tested in this study did not show a high survival rate in space, even if shielded from solar UV radiation. Our experiments also demonstrate that outer space can act as a selection pressure on the composition of microbial communities (Cockell *et al.*, 2011). Further studies are needed with more resistant communities. An example is the vagrant lichen species *Aspicilia fruticulosa* that, after 10 days in space, showed a complete recovery of space-induced damage after 72 h of reactivation (Raggio *et al.*, 2011).

Natural transfer of microorganisms between planets via lithopanspermia could have occurred over the course of billions of years (Gladman *et al.*, 1996; Nicholson, 2009). In the last 50 years, human activities in space exploration have become another potential source of spreading microorganisms between planets. Nearly 40 robotic missions have been launched with Mars as their destination (Horneck *et al.*, 2007). To prevent the introduction of microbes from Earth to another celestial body or vice versa, a concept of contamination control has been elaborated by the Committee on Space Research (COSPAR) under consideration of specific classes of mission/target combinations, which have been recommended to be followed by each space-faring organization (COSPAR, 2011). Lander missions to Mars require especially strict measures of cleanliness and partial sterility of the spacecraft (COSPAR, 2011). The test systems that have been used in the LIFE experiment, though unlikely to be found on spacecraft, can be considered as models for demonstrating how life, if accidentally transferred from Earth to outer space, may resist and contaminate other celestial bodies and planets (*i.e.*, Mars) and thereby interfere with future life-detection missions.

### Acknowledgments

We thank the staff at the European Space Agency for the provision and operations of the EXPOSE-E facility and Thomas Berger for the cosmic ray dosimetry data. We also thank the Italian National Program of Antarctic Research and National Antarctic Museum for funding the collection of Antarctic samples, strains, and sample analyses, as well as the European Coordination Action for Research Activities on life in Extreme Environments (CAREX) for one ToK Grant to G.S. Collection and preparation of samples, and CLSM and photosynthetic activity analyses of *X. elegans* have been supported partly by the Helmholtz Association through the research alliance "Planetary Evolution and Life" and the BMWi, 50WB0614; the selection and preparation of the *Rhizocarpon geographicum* samples have been financed by the Space Program of the Spanish Ministry of Science and Education (ESP2005-25292-E) and INTA. We thank Philipp Holzwig, Isabella Halezki, Eva-Maria Posthoff, and the Institute of Genetics at the Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf for skillful technical assistance. Special thanks also go to Prof. Giovanni Bignami for his scientific advice.

### Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist for Silvano Onofri, Rosa de la Torre, Jean-Pierre de Vera, Sieglinde Ott, Laura Zucconi, Laura Selbmann, Giuliano Scalzi, Kasthuri J. Ven-

kateswaran, Elke Rabbow, Francisco Javier Sánchez Iñigo, or Gerda Horneck.

### Abbreviations

ANOVA, analysis of variance; CFU, colony-forming units; CLSM, confocal laser scanning microscopy; COSPAR, Committee on Space Research; EuTEF, European Technology Exposure Facility; ISS, International Space Station; ITS, internal transcribed spacer; PCR, polymerase chain reaction; PMA, propidium monoazide; PSII, photosystem II; s.d., standard deviation.

### References

- Berger, T., Hajek, M., Bilski, P., Körner, C., Vanhavere, F., and Reitz, G. (2012) Cosmic radiation exposure of biological test systems during the EXPOSE-E mission. *Astrobiology* 12:387–392.
- Cockell, C.S., Rettberg, P., Rabbow, E., and Olsson-Francis, K. (2011) Exposure of phototrophs to 438 days in low Earth orbit: microbial selection pressures in outer space and on early Earth. *ISME J* 10:1671–1682.
- COSPAR. (2011) *COSPAR Planetary Protection Policy* (20 October 2002, as amended 24 March 2011), COSPAR, Paris. Available online at <http://cosparhq.cnes.fr/Scistr/PPPPolicy%20%2824-Mar2011%29.pdf>.
- de la Torre, R., Sancho, L., Horneck, G., de los Ríos, A., Wierzbosch, J., Olsson-Francis, K., Cockell, C.S., Rettberg, P., Berger, T., de Vera, J.-P.P., Ott, S., Martínez Frías, J., Melendi, P.G., Lucas, M.M., Reina, M., Pintado, A., and Demets, R. (2010) Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions—results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus* 208:735–748.
- de Vera, J.P., Horneck, G., Rettberg, P., and Ott, S. (2003) The potential of 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. *International Journal of Astrobiology* 1:285–293.
- de Vera, J.P., Rettberg, P., and Ott, S. (2008) Life at the limits: capacities of isolated and cultured lichen symbionts to resist extreme environmental stresses. *Orig Life Evol Biosph* 38:457–468.
- de Vera, J.P., Möhlmann, D., Butina, F., Lorek, A., Wernecke, R., and Ott, S. (2010) Survival potential and photosynthetic activity of lichens under Mars-like conditions: a laboratory study. *Astrobiology* 10:215–227.
- Fritz, J., Artemieva, N.A., and Greshake, A. (2005) Ejection of martian meteorites. *Meteorit Planet Sci* 40:1393–1411.
- Gladman, B.J., Burns, J.A., Duncan, M., Lee, P., and Levison, H.F. (1996) The exchange of impact ejecta between terrestrial planets. *Science* 271:1387–1392.
- Horneck, G., Debus, A., Mani P., and Spry J.A. (2007) Astrobiology exploratory missions and planetary protection requirements. In *Complete Course in Astrobiology*, edited by G. Horneck and P. Rettberg, Wiley-VCH, Berlin, pp 353–397.
- Horneck, G., Stöffler, D., Ott, S., Hornemann, U., Cockell, C.S., Moeller, R., Meyer, C., de Vera, J.-P., Fritz, J., Schade, S., and Artemieva, N.A. (2008) Microbial rock inhabitants survive impact and ejection from host planet: first phase of lithopanspermia experimentally tested. *Astrobiology* 8: 17–44.
- Horneck, G., Klaus, D.M., and Mancinelli, R.L. (2010) Space microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:121–156.

- Melosh, H.J. (1984) Impact ejection, spallation, and the origin of meteorites. *Icarus* 59:234–260.
- Meyer, C., Fritz, J., Misgaiski, M., Stöffler, D., Artemieva, N.A., Hornemann, U., Moeller, R., de Vera, J.-P., Cockell, C., Horneck, G., Ott, S., and 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* 46:701–718.
- Mileikowsky, C., Cucinotta, F., Wilson, J.W., Gladman, B., Horneck, G., Lindegren, L., Melosh, J., Rickman, H., Valtonen, M., and Zheng, J.Q. (2000) Natural transfer of viable microbes in space: 1. From Mars to Earth and Earth to Mars. *Icarus* 145:391–427.
- Nicholson, W.L. (2009) Ancient micronauts: interplanetary transport of microbes by cosmic impacts. *Trends Microbiol* 17:243–250.
- Nyquist, L.E., Bogard, D.D., Shih, C.-Y., Greshake, A., Stöffler, D., and Eugster O. (2001) Ages and geological histories of martian meteorites. *Space Sci Rev* 96:105–164.
- Onofri, S., Barreca, D., Selbmann, L., Isola, D., Rabbow, E., Horneck, G., de Vera, J.P.P., Hatton, J., and Zucconi, L. (2008) Resistance of Antarctic black fungi and cryptoendolithic communities to simulated space and martian conditions. *Stud Mycol* 61:99–109.
- Onofri, S., Selbmann, L., Barreca, D., Isola, D., and Zucconi, L. (2009) Fungal survival in space conditions, new insights for lithopanspermia. *Plant Biosyst* 143:S85–S87.
- Rabbow, E., Horneck, G., Rettberg, P., Schott, J.-U., Panitz, C., L'Afflitto, A., von Heise-Rotenburg, R., Willnecker, R., Baglioni, P., Hatton, J., Dettmann, J., Demets, R., and Reitz, G. (2009) EXPOSE, an astrobiological exposure facility on the International Space Station—from proposal to flight. *Orig Life Evol Biosph* 39:581–598.
- 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., and Reitz, G. (2012) EXPOSE-E: an ESA astrobiology mission 1.5 years in space. *Astrobiology* 12:374–386.
- Raggio, J., Pintado, A., Ascaso, C., de la Torre, R., de los Ríos, A., Wierzchos, J., Horneck, G., and Sancho, L.G. (2011) Whole lichen thalli survive exposure to space conditions: results of Lithopanspermia experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* 11:281–292.
- Sancho, L.G., de la Torre, R., Horneck, G., Ascaso, C., de los Ríos, A., Pintado, A., Wierzchos, J., and Schuster, M. (2007) Lichens survive in space: results from the 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology* 7:443–454.
- Selbmann, L., de Hoog, G.S., Mazzaglia, A., Friedmann, E.I., and Onofri, S. (2005) Fungi at the edge of life, cryptoendolithic black fungi from Antarctic deserts. *Stud Mycol* 51:1–32.
- Shuster, D.L. and Weiss, B.P. (2005) Martian surface paleotemperatures from thermochronology of meteorites. *Science* 309:594–597.
- Sterflinger, K. (2005) Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. In *Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, edited by C. Rosa and P. Gabor, Springer, New York, pp 505–518.
- Stöffler, D., Horneck, G., Ott, S., Hornemann, U., Cockell, C.S., Moeller, R., Meyer, C., de Vera, J.-P., Fritz, J., and Artemieva, N.A. (2007) Experimental evidence for the potential impact ejection of viable microorganisms from Mars and Mars-like planets. *Icarus* 186:585–588.
- The Meteoritical Society. (2011) *Meteoritical Bulletin Database*, The Meteoritical Society. Available on line at <http://www.lpi.usra.edu/meteor/metbull.php>.
- Thomson, W. (Lord Kelvin). (1871) The British Association meeting at Edinburgh. Inaugural address of Sir William Thomson, LL.D., F.R.S., President. *Nature* 4:262–270.

Address correspondence to:

Professor Silvano Onofri  
Department of Ecological and Biological Sciences (DEB)  
Largo dell'Università snc  
01100 Viterbo (Italy)

E-mail: onofri@unitus.it

Submitted 30 September 2011

Accepted 1 April 2012



# Publicación IV

Meeßen, J.; Sánchez, F.J.; Brandt, A.; Balzer, E.-M.; de la Torre, R.; Sancho, L.G<sup>a</sup>.; de Vera, J.-P.; Ott, S. 2013. **Extremotolerance and resistance towards space conditions in 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

**Resumen:** Los líquenes son simbiosis de dos organismos, un micobionte fúngico y un fotobionte fotoautótrofo. En la naturaleza, muchos líquenes toleran condiciones ambientales extremas y por lo tanto representan valiosos modelos en investigación astrobiológica para evaluar la resistencia biológica a condiciones extraterrestres incluyendo exposición espacial, simulaciones de impactos a hipervelocidad así como simulaciones de parámetros espaciales y marcianos. Todos los estudios han demostrado una alta resistencia hacia factores abióticos extraterrestres de los líquenes extremotolerantes seleccionados. Entre otras adaptaciones, este estudio se centra en los caracteres morfológicos y anatómicos, comparando cinco especies de líquenes -*Circinaria gyrosa*, *Rhizocarpon geographicum*, *Xanthoria elegans*, *Buellia frigida* y *Pleopsidium chlorophanum*- utilizados en investigación astrobiológica reciente. Una investigación detallada de la organización del talo por métodos de microscopía permite el estudio del efecto de la morfología en la resistencia del líquen y constituye una base para interpretar los resultados de experimentos recientes y futuros. Todos los líquenes investigados revelan una estructura heterómera común del talo, pero rasgos anatómico-morfológicos diferentes, al igual que matrices mucilaginosas intra- y extratalinas, córtex, distribuciones algales y hebras fúngicas. En *B. frigida*, *R. geographicum* y *X. elegans* la combinación de córtex pigmentado, distribución algal y mucílago parece favorecer la resistencia mientras que el subcortex y el agrupamiento de las células algales parece ser crucial en *C. gyrosa*, así como el córtex pigmentado y las protrusiones basales del talo en *P. chlorophanum*. Por lo tanto, las generalizaciones en cuanto a la resistencia otorgada por rasgos morfológicos deben ser evitadas. Estas diferencias pueden reflejar los distintos caminos evolutivos que han podido conducir a los líquenes a adaptarse a agentes abióticos de estrés prevalentes en sus hábitats. La peculiar morfología líquénica demuestra su importante papel en la resistencia a condiciones terrestres extremas y puede ayudar a explicar la alta resistencia de los líquenes encontrada durante la investigación astrobiológica.

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ☒ 40204 Düsseldorf

To: Comisión de Doctorado  
Facultad de Biología  
Universidad Complutense de Madrid - UCM  
C/ José Antonio Novais, 12  
Ciudad Universitaria  
28040 - MADRID  
SPAIN

**Institut für Botanik**  
AG Prof. Dr. Sieglinde Ott

**Dr. Joachim Meeßen**

Telefon +49 (0)211 8113262  
Telefax +49 (0)211 8112881  
joachimmeessen@gmx.de


**Düsseldorf, 18.11. 2013**

### Statement of agreement

To whom it may concern: Me, Joachim Meeßen, researcher at the Institute of Botany of the Heinrich-Heine University (Düsseldorf, Germany), in quality of being the first author of the paper entitled *Extremotolerance and resistance towards space conditions in lichens: Comparative studies on five studies used in astrobiological research I. Morphological and anatomical characteristics* (published in the journal *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, Volume 43, Number 3, 2013), hereby authorize its inclusion in the name of all co-authors in the PhD thesis of Francisco Javier Sánchez Íñigo which is to be defended at the Complutense de Madrid University. In witness whereof and at the request of the interested person, I sign this certificate.

**Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**  
Universitätsstraße 1  
40225 Düsseldorf  
Gebäude 26.13  
Ebene 02 Raum 35

[www.uni-duesseldorf.de](http://www.uni-duesseldorf.de)



Joachim Meeßen

Düsseldorf, 18.11.2013

# 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- $\alpha$ -fluorescence of PSII and by light dependent gas exchange analyses, live/dead-staining of both symbionts utilizing CLSM (apo- 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 $2.2 \times 10^4$ kJ m <sup>-2</sup> )	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, $7 \times 10^3$ – $5 \times 10^6$ kJ m <sup>-2</sup> ), UV (200–400 nm, $9.2 \times 10^2$ – $6.3 \times 10^5$ kJ m <sup>-2</sup> ), GCR ( $\leq 190$ mGy), vac. ( $10^{-4}$ – $10^{-7}$ Pa) or Mars atm. (100 % CO <sub>2</sub> , 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 $8 \times 10^5$ kJ m <sup>-2</sup> ), vac. ( $10^{-4}$ – $10^{-7}$ Pa) or Mars atm. (100 % CO <sub>2</sub> , 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 <sup>-2</sup> ), 3) vac. + UV ( $10^{-5}$ Pa, $160$ – $400$ nm, $2.8+8.8+0.7$ W m <sup>-2</sup> )	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 <sup>-2</sup> ) 3) vac. + UV ( $10^{-5}$ Pa), 200–400 nm; 40, 466, 3,347 kJ m <sup>-2</sup> ) 4) vac. + UV ( $10^{-3}$ Pa, 160–400 nm, 8.1 W m <sup>-2</sup> )	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 <sup>-2</sup> )	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. ( $2.8 \times 10^{-1}$ – $3.6 \times 10^{-5}$ Pa) and UV (200–400 nm, $2.8 \text{ W m}^{-2}$ )	Life/Dead staining (FunI, 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 <sub>2</sub> , 6 mbar, 100 % rH, –55–+20 °C) 2) Mars atm. (95 % CO <sub>2</sub> , 6 mbar, 100 % rH, +15 °C) 3) Mars atm. (95 % CO <sub>2</sub> , 6 mbar, 100 % rH, –+5 °C) 4) Earth atm. (100 % rH, +15 °C)	PSII activity, Life/Dead staining (FunI)	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 (FunI, 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, $2.7 \times 10^2$ – $6.3 \times 10^3 \text{ kJ m}^{-2}$ ), Mars atm. (95 % CO <sub>2</sub> , 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 ( $3.0 \times 10^{-7}$ 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, $30 \text{ mW cm}^{-2}$ ), –93 °C 2) Mars atm. (95 % CO <sub>2</sub> , 0.6 % H <sub>2</sub> O, 7 mbar), –93 °C 3) Mars UV (200–400 nm, $30 \text{ mW cm}^{-2}$ ), 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 (Kranter 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-/hypothecium*: 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.

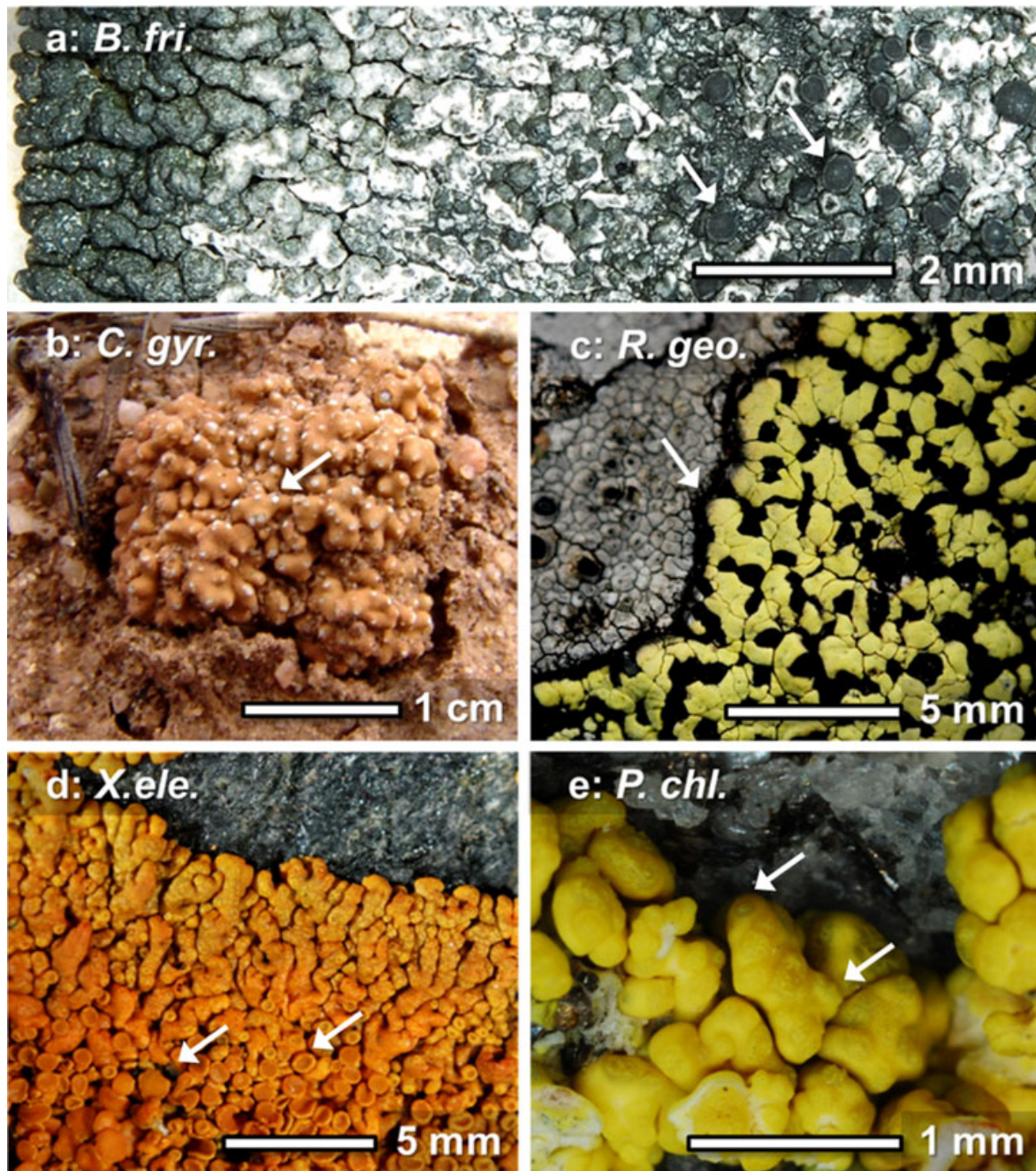
In the hydrated state, the thallus is significantly swollen by water uptake, reducing the density of its blackish melanin pigmentation in the cortex (Fig. 4a). Consequently, the photobiont in the algal layer becomes effectively exposed to light in the wet state. During dehydration, the thallus shrinks, 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

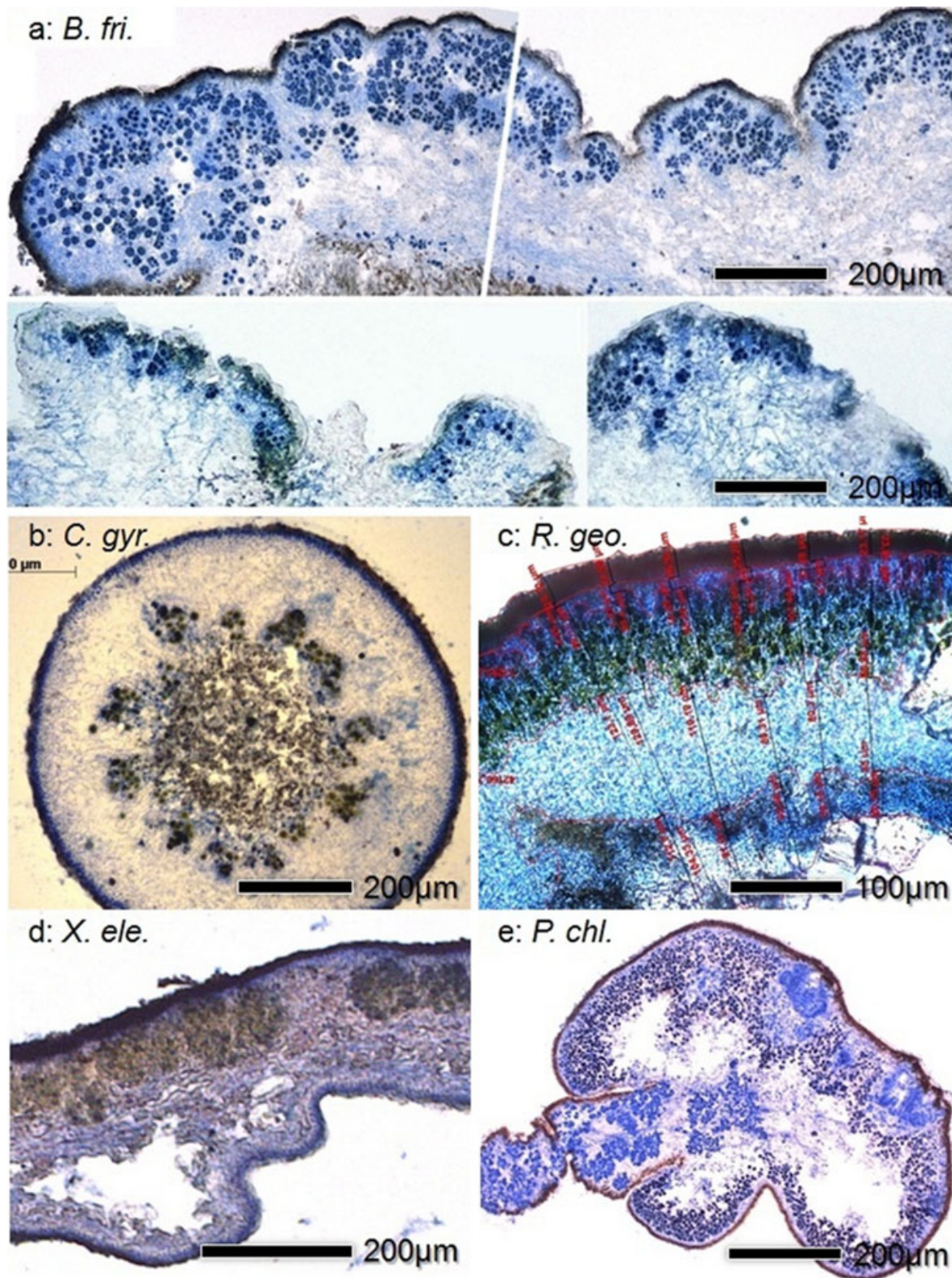
Lichen (from)	Thickness of thalline strata in [ $\mu\text{m}$ ] $\pm$ standard deviation					Hypo-thallus
	Mucilage layer	Cortex pigm.	Sub-cortex	Algal layer	Medulla	
<b>B. frigida</b> (from Gondwana Station, North Victoria Land and Inexpressible Island, both Antarctica)						
Gondwana	9.4 $\pm$ 2.9	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	–
<b>C. gyrosa</b> (from Zaorejas, Guadalajara, Central Spain)						
Proximal	–	20.8 $\pm$ 0.9	18.3 $\pm$ 1.3	69.2 $\pm$ 12.0	385.9 $\pm$ 12.2	–
Distal	–	24.3 $\pm$ 9.5	21.4 $\pm$ 2.4	78.3 $\pm$ 39.7	346.3 $\pm$ 111.0	–
<b>R. geographicum</b> (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
<b>X. elegans</b> (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
<b>P. chlorophanum</b> (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*

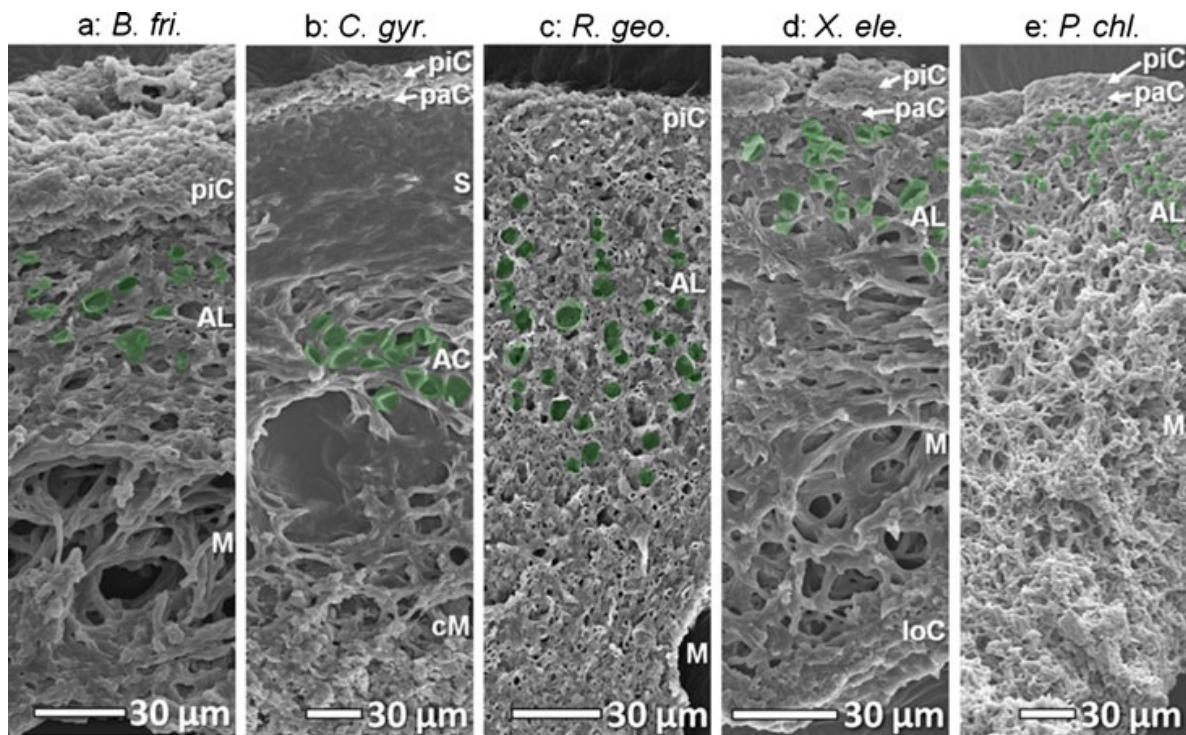


**Fig. 1** Habitus macrographs of the five investigated lichens. **1a** thallus detail of *B. frigida* from marginal zones (*left*) to the center (*right*) with black rectangular areolae at the margin and angular areolae and black apothecia (*arrows*) in the center. **1b** vagrant, spherical, fruticose, 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.



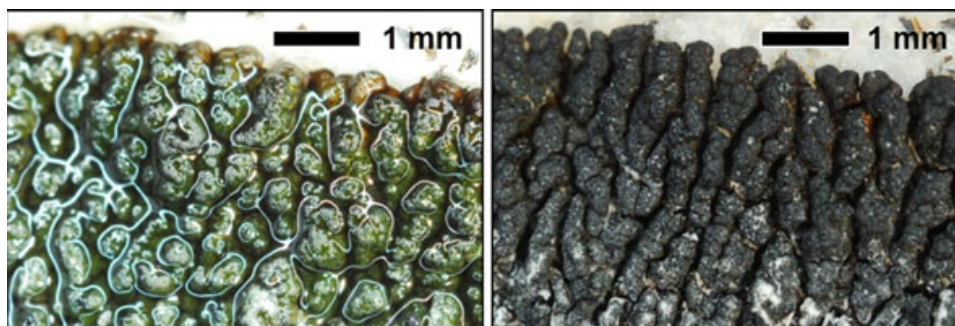
**Fig. 2** Thin sections of five investigated lichens. **2a** *B. frigida*, high amounts of algal cells below a pigmented cortex at younger marginal areolae (upper row) and decreased algal numbers below the depigmented cortex in older, central areolae (lower row). **2b** *C. gyrosa*, distal cross section, 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*). Mucilageous epicortex (*B. frigida*, *R. geographicum*, *P. chlorophanum*) not visible in the chosen micrographs

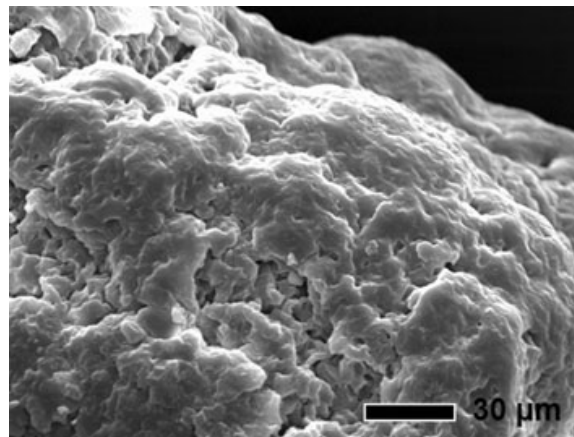
### *Circinaria gyrosa*

**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 unsheathed 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)

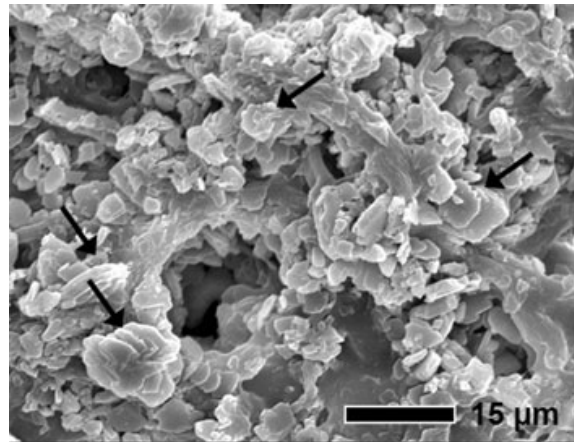
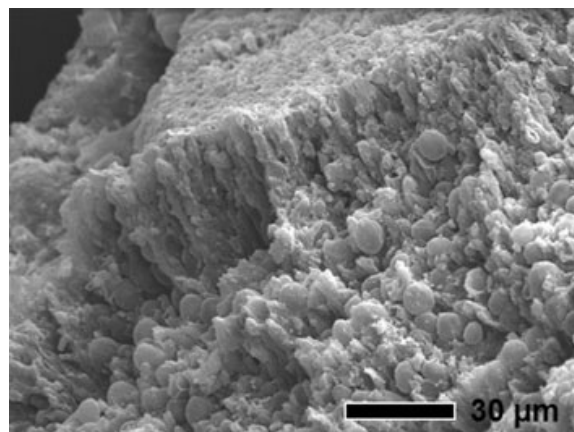


Fig. 2c). The samples collected in Spain were covered by a gelatinous layer upon the cortex which is thinner compared to samples from the Alps while the algal layer is thicker and the medulla is thinner. Samples from both locations display densely arranged cortical cells (Fig. 7) that are intensely coloured 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 (ø 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 astrobologically 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. mucilagenous 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 mucilagenous 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 astrobologically 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  $\mu\text{m}$  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  $\text{UVC}_{(254\text{nm})}$  at  $2.1\text{--}201.8 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$  (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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ -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 CO<sub>2</sub> 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



## Parte V

# Discusión y conclusiones



## Capítulo 6

# Discusión y síntesis de resultados

Este trabajo de investigación se ha centrado en el estudio de los mecanismos de tolerancia y resistencia de las especies de líquenes extremotolerantes *Rhizocarpon geographicum* y *Circinaria gyrosa* en relación con investigación astrobiológica.

El estudio del efecto de las condiciones espaciales y marcianas sobre los líquenes se justifica, por el gran interés que tiene en astrobiología la elevada resistencia detectada de estos organismos bajo condiciones extraterrestres y el desconocimiento generalizado sobre los mecanismos que expliquen éste hecho. Por ello, uno de los objetivos primordiales de esta investigación fue el de aportar nuevos datos sobre los límites de la tolerancia y resistencia de la vida en general y de estos organismos en particular al enfrentarse a condiciones extraterrestres. Adicionalmente, estos estudios trataron de aportar nuevos conocimientos y datos experimentales a la hipótesis de la Litopanspermia.

### 6.1. Publicación I: Simulaciones marcianas

Tras los buenos resultados de supervivencia y de recuperación de vitalidad demostrados por el líquen *C. gyrosa* tras el experimento LITHOPANSPERMIA, se planteó la posibilidad de evaluar (por primera vez sobre la fisiología de un líquen extremotolerante) el efecto de la influencia simultánea de la mayoría de parámetros ambientales presentes en la superficie de Marte (composición de gases, presión atmosférica y radiación UV-C) a una temperatura restrictiva (-93 °C), así como a diferentes combinaciones de los mismos.

Esta investigación tenía relación con el interés del momento (y actual) en la búsqueda de biomarcadores, relacionándolos con la búsqueda de vida en Marte. Los biomarcadores son sustancias (o sus productos de degradación) que proceden exclusivamente de la actividad biológica y, que por lo tanto, indican la presencia de vida presente o pasada en el lugar donde se encuentran [8], [85]. El interés por los biomarcadores se incrementó tras la confirmación de la presencia de agua sobre la superficie del planeta Marte [63] y actualmente se está acumulando información sobre los mismos y sus técnicas de detección para implementar el equipamiento necesario en futuras misiones espaciales [11]. De esta forma será posible detectar trazas inequívocas de vida pasada o presente sobre la superficie del planeta rojo.

Las simulaciones marcianas que fueron aplicadas sobre muestras latentes (fisiológicamente inactivas) de *C. gyrosa* (descritas en el apartado 5.2.1 del capítulo 5) provocaron distintos efectos sobre la fisiología del líquen en cuanto al posterior rendimiento cuántico máximo del PSII (fotobionte) y con relación al intercambio gaseoso dependiente de luz (líquen completo).

En cuanto a la actividad fotosintética del fotobionte, no se registraron diferencias significativas tras ninguna de las simulaciones marcianas llevadas a cabo al comparar las muestras expuestas con las muestras control. Tras el *tratamiento 1*, tanto las muestras expuestas a radiación UV-C del nivel 1 como las muestras control del nivel 2 (superior e inferior respectivamente) mostraron una reducción no significativa en los valores de máximo rendimiento cuántico (MQY, véase sección 5.3.1 del capítulo 5) al comparar los valores registrados tras la simulación con las medidas tomadas previamente a ésta (sobre las mismas muestras y habiendo seguido un idéntico proceso de revitalización). Las medidas realizadas con el fluorómetro Mini-PAM sobre las muestras sometidas a las condiciones del *tratamiento 2* mostraron un incremento leve en los valores de MQY para las

muestras del nivel 2 mientras que las irradiadas en el nivel 1 no mostraron cambios. Por último, terminado el *tratamiento 3* (que contenía la combinación de parámetros más letal para la vida), sólo se registraron pequeños descensos de MQY no significativos al comparar los datos registrados de forma previa y posterior a la simulación. La intercomparación de resultados con controles externos y con los obtenidos para las distintas muestras de los tres tratamientos no mostraron diferencias significativas.

Los análisis de intercambio gaseoso dependientes de luz revelaron un patrón comparable de aumento asintótico de las tasas fotosintéticas en respuesta a intensidades de luz crecientes. Igualmente mostraron tendencia a la saturación en los niveles lumínicos más altos. Por último, todas las muestras medidas (procedentes de ambos niveles) mostraron similares puntos de compensación lumínica (luz mínima para conseguir valores positivos de fotosíntesis neta) sin mostrar síntomas de fotoinhibición hasta  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Los tests ANOVA de dos vías ( $P > 0,005$ ) mostraron que el efecto de las tres simulaciones sobre la tasa fotosintética neta máxima y la de respiración era significativo, independientemente de la ubicación en el nivel 1 ó 2, o de la interacción entre tratamiento y nivel. Para profundizar en el conocimiento de cuál de los tres tratamientos aplicados era más influyente sobre la fisiología de *C. gyrosa* se llevaron a cabo dos tests estadísticos del tipo T de Student. Para ello, por un lado se compararon todas las muestras (de ambos niveles 1 y 2) de cada tratamiento con los controles y por otro se compararon sólo las muestras del nivel 1 con los controles. Los tests estadísticos revelaron diferencias significativas en ambos casos sólo para el *tratamiento 2* (radiación UV, atmósfera y presión marcianas a una temperatura de  $-93^\circ\text{C}$ ).

La intercomparación de los datos conduce a pensar que sólo las muestras irradiadas con UV-C muestran una diferencia significativa en relación con los controles, mientras que el resto de parámetros analizados no parece tener un efecto claro sobre la fisiología de *C. gyrosa*. Mientras que los análisis de MQY no revelaron diferencias significativas, los análisis de tasas fotosintéticas netas mostraron un efecto significativo cuando las muestras eran sometidas a la combinación de condiciones marcianas simuladas: radiación, temperatura, presión y composición de gases. Por lo tanto, se deberá continuar en la investigación sobre los límites de esta especie de líquen al enfrentarse a condiciones simuladas de Marte, de cara a obtener unos datos claros sobre qué factores del ambiente marciano son los más influyentes en su fisiología.

Independientemente de la desviación estándar particular de los diferentes tratamientos, todas las muestras mostraron unas condiciones fisiológicas levemente alteradas tras las tres simulaciones. Ésto puede explicarse por una elevada variabilidad natural en relación con la capacidad de intercambio gaseoso de *C. gyrosa* más que por un efecto de los tratamientos en sí mismos, sobre todo teniendo en cuenta que el tratamiento más agresivo (combinando vacío LEO, radiación UV y temperatura restrictiva de  $-93^\circ\text{C}$ ) no afectó la actividad metabólica de forma significativa. A pesar de que se detectaron diferencias significativas en cuanto a la fotosíntesis neta entre los controles y las muestras del *tratamiento 2* (atmósfera, presión y radiación UV marcianas a una temperatura de  $-93^\circ\text{C}$ ), que no se encontraron ni en las muestras expuestas al *tratamiento 1* ni en sus respectivas muestras control, no se hallaron diferencias entre el nivel 1 y nivel 2 para el *tratamiento 2*. Valorando estos resultados, el efecto añadido de la radiación UV en el experimento de simulación no puede considerarse como extremadamente dañino para *C. gyrosa*.

Estudios llevados a cabo con *C. gyrosa* en el contexto del experimento LITHOPANSPERMIA en relación con la tasa de intercambio gaseoso de talos expuestos a condiciones LEO revelaron valores normales de respiración y fotosíntesis [69]. De esta manera se puede concluir que la primera aproximación al estudio del desempeño del líquen extremotolerante *C. gyrosa* tras ser sometido a diversas combinaciones de condiciones marcianas finalizó con éxito, confirmando las expectativas creadas tras los buenos resultados obtenidos en el experimento LITHOPANSPERMIA. Nuestros estudios mejoran el conocimiento sobre los límites de supervivencia de este organismo extremotolerante, en este caso bajo condiciones marcianas. Tras 120 horas de exposición a condiciones tan letales como la radiación UV-C o el vacío (o la combinación de ambas) no se detectaron cambios significativos, ni en el rendimiento fotosintético del fotobionte, ni en el funcionamiento fisiológico normal del líquen.

Además hay que tener en cuenta que la atmósfera marciana es totalmente anóxica (ver sección 5.2.1 del capítulo 5), siendo el  $\text{CO}_2$  el componente mayoritario (97%). Esto hace que sea totalmente imposible que la respiración tenga lugar bajo esas condiciones. Este hecho obliga a distinguir

claramente entre resistencia y posibilidad de supervivencia bajo esas condiciones, pues el oxígeno es un requisito *sine qua non* para el normal crecimiento y desarrollo de los líquenes.

Los buenos resultados de actividad fisiológica obtenidos en este experimento, puestos en conjunto con los obtenidos previamente y que ya hemos resumido, llevan a proponer que la aparente inalterabilidad de *C. gyrosa* tras las diversas exposiciones a condiciones espaciales y marcianas (reales y simuladas respectivamente) pueda deberse a una adaptación general de esta especie de líquen a las duras condiciones del hábitat natural en el que se desarrolla, y que de forma secundaria puedan conferirle protección frente a éstas otros parámetros del ambiente extraterrestre. En este estudio se propone que las características morfo-anatómicas de *C. gyrosa* puedan ser claves en la elevada tolerancia a la radiación UV-C detectada. Se propone que el inusualmente grueso subcortex actúe como barrera frente a la radiación UV-C, evitando la penetración de este agente deletéreo. Adicionalmente, la profunda localización de los *clusters* algales detectada y la presencia potencial de sustancias gelatinosas filtradoras del UV presentes en la capa subcortical influirían decisivamente en la tolerancia de esta especie de líquen a las condiciones espaciales y marcianas detectadas. Además, se considera que la poiquilohidria podría influir en la capacidad de tolerancia de esta especie. Tal y como ya se ha explicado, éste es un mecanismo presente en líquenes y briófitos por el cual estos organismos (incapaces de regular su contenido en agua) son capaces de tolerar la desecación durante largos períodos. De esta forma, cuando las condiciones ambientales cambian, se recuperan sin daños fisiológicos [54], [40]. Bajo condiciones adversas, el líquen pierde hasta un 97 % de su contenido en agua y entra en una fase latente altamente resistente. A pesar de que todos los líquenes sean poiquilohídricos y presenten enormes diferencias en cuanto a su tolerancia a factores de estrés, proponemos que las características previamente mencionadas (grueso subcortex, profunda localización de *clusters* algales y presencia de agentes filtrantes de la radiación UV) junto con su carácter poiquilohídrico supongan la combinación de factores que hace que este líquen presente unas propiedades de resistencia tan elevadas.

Las registros prácticamente inalterados de actividad fotosintética y fisiológica obtenidos para *C. gyrosa* tras la aplicación de las simulaciones marcianas detalladas anteriormente reforzaron la idea de lo buen sistema modelo que este líquen es para estudios en astrobiología. Si a su elevada tolerancia le añadimos el carácter simbiótico y eucariótico de los líquenes, su interés para estudios sobre el origen y los límites de la vida es aún mayor. Consideramos que las especiales características de tolerancia y resistencia que conducen a que este organismo sobreviva sin daños aparentes a una exposición a condiciones extraterrestres deben ser aprovechadas en investigación astrobiológica para profundizar en el conocimiento sobre las posibilidades de supervivencia de comunidades eucarióticas simbióticas y sus posibles implicaciones.

Además, este experimento cumplió su objetivo de aportar nuevos datos experimentales que apoyaban la fase III de la hipótesis de la Litopanspermia, sirviendo de punto de partida para una posterior investigación en profundidad acerca de la posible supervivencia de un organismo sobre la superficie de Marte.

Por último, se demostró la importancia clave de las cámaras de simulación a la hora de estudiar la influencia de los parámetros ambientales de otros planetas en astrobiología.

## 6.2. Publicación II: Irradiaciones UV-C bajo distintas condiciones experimentales

La aproximación más plausible para tratar de profundizar en el conocimiento del efecto de los factores ambientales espaciales y extraterrestres sobre los organismos vivos, así como para conocer más sobre los mecanismos de tolerancia y resistencia una vez ya se han detectado, es la aplicación individualizada de esos factores a fin de evaluar la respuesta concreta del organismo extremotolerante en cuestión.

Uno de los parámetros más letales para los organismos vivos sometidos al ambiente espacial es la radiación UV-C (200-280 nm) [49], [64]. En la Tierra, la capa de ozono actúa como filtro de este espectro de radiación UV, haciendo que alcance la superficie de nuestro planeta con una irradiancia muy baja ( $<0,1 \text{ W/m}^2$ ) y representando una proporción ínfima del total de radiación UV que nos alcanza ( $<0,1 \%$ ) [91]. El máximo de absorción UV de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) es de aproximadamente 260 nm. Este valor varía en función de la composición específica de

bases nitrogenadas, pues la absorción individual de nucleótidos oscila entre 256 y 281 nm [44], pero en cualquier caso está dentro del espectro de la radiación UV-C. La radiación UV en general y la UV-C particularmente, induce la producción de dos de las lesiones mutagénicas y citotóxicas más abundantes del ADN: los dímeros de pirimidina (CPDs) y los fotoproductos 6-4 (6-4PPs), lo que hace que normalmente la exposición a esta radiación altamente energética (y por tanto con una elevada capacidad de penetración) tenga un efecto deletéreo sobre las células de los organismos expuestos [86].

Para abordar nuestro objetivo de conocer más sobre los mecanismos de resistencia de *R. geographicum* y *C. gyrosa* a condiciones espaciales y en concreto para tratar de profundizar en la estrategia de estos organismos para tolerar dosis elevadas de radiación UV-C, aplicamos una serie de 23 dosis crecientes de radiación UV-C sobre talos de estas especies (ver tabla 5.1). Más concretamente, tal y como se ha detallado en el apartado 5.2.2 del capítulo 5, se trató de evaluar la función del estado fisiológico del talo (húmedo-activo, seco-latente) así como del córtex en el caso de *R. geographicum* y de los pigmentos fotoprotectores para *C. gyrosa* en el nivel de tolerancia/resistencia del simbionte fotosintético de estos líquenes extremotolerantes a altas dosis de radiación UV-C.

Los resultados obtenidos confirman que, tal y como se presuponía, el estado latente en el que se encuentra el líquen en estado seco le hace más resistente. Tanto es así que los resultados obtenidos en este estudio apuntan a que éste es el mecanismo en mayor medida responsable de la alta tolerancia a la radiación UV-C detectada.

Tal y como puede extraerse de la comparación entre las medidas de máximo rendimiento cuántico (MQY) realizadas antes y después de la aplicación de las dosis de UV-C sobre las muestras intactas y secas (y por lo tanto fisiológicamente inactivas) de *R. geographicum* y de *C. gyrosa*, el aparato fotosintético no se vio afectado por ninguna de las dosis aplicadas bajo estas condiciones. La misma comparación de medidas realizada sobre las muestras intactas pero húmedas y por lo tanto, metabólicamente activas, muestra una variabilidad en los valores registrados mucho mayor. Este estudio demuestra claramente para ambos simbiontes del género *Trebouxia* sp. que el rendimiento del PSII se ve más afectado por la radiación UV-C cuando el talo está metabólicamente activo (húmedo), comenzando a descender en su actividad transportadora de electrones a partir de una dosis equivalente a  $5 \times 10^6$  J/m<sup>2</sup>. Este fenómeno puede estar producido por el hecho de que durante el proceso de desecación se produce la disociación del PSII y de los complejos captadores de luz [57], haciendo que sea más difícil que se produzca daño por exceso de energía lumínica. Además, en estado seco actúan los mecanismos de fotoprotección producidos por disipación térmica y/o separación de cargas en los centros de reacción [45], previniendo de la degradación del complejo D1/D2 y haciendo de nuevo más complejo el que se produzca daño. A la inversa esta situación se revertiría, haciendo que sea más sencilla la producción de daño por exceso de radiación UV-C cuando el talo se encuentra húmedo, fisiológicamente activo y con el PSII y los LHC reasociados.

Los resultados obtenidos en cuanto a MQY concuerdan con los obtenidos en el estudio de de Vera & Ott (2010b) [22] realizado sobre las especies de líquenes extremotolerantes *Xanthoria elegans* y *Peltigera aphthosa*. En ese trabajo se realizaron exposiciones a radiación UV-C con dosis mucho menores a las utilizadas en éste. A pesar de ello, se ha seguido detectando tolerancia, por lo que la expectativa de resistencia al UV-C por parte de *Trebouxia* sp. ha aumentado considerablemente.

Además del papel del estado metabólico del líquen (activo o latente) en la resistencia a la radiación UV-C, en este estudio se quiso analizar el papel protector de algunas estructuras talinas y el papel de algunos compuestos liquénicos secundarios (SLC) con función filtradora de luz. En campañas de campo desarrolladas con el objetivo de analizar el efecto de la radiación UV solar incidente (UV-A y UV-B) sobre muestras de *R. geographicum* se demostró que el córtex tiene una importante función protectora en talos fisiológicamente activos, pues el funcionamiento del PSII se vio afectado en muestras sin córtex respecto a muestras con córtex [13]. De hecho, en ese trabajo se concluía que el córtex además de proporcionar una barrera física, poseía una función protectora adicional basada en la presencia de SLC con actividad filtradora de radiaciones excesivas de PAR o UVR. Ambas propiedades supusieron la razón principal sobre la que basar la elevada resistencia de *R. geographicum* al espectro UV solar sin filtrar presente en LEO [16], [18].

Las medidas de MQY realizadas sobre las muestras en las que se había retirado el córtex, o lavado los potenciales pigmentos fotoprotectores (*C. gyrosa*) previamente a las irradiaciones, no mostraron unos valores de MQY distintos a los de las muestras intactas (para ambos casos, talos secos y húmedos) por lo que en base a los resultados obtenidos en este estudio es imposible

establecer un papel clave de esos agentes protectores frente a la radiación UV-C que proteja de daños el aparato fotosintético del fotobionte de *R. geographicum*.

En relación con *C. gyrosa* y el rendimiento del PSII, aparte de evaluar la importancia del estado fisiológico del talo en cuanto a su sensibilidad a la radiación UV-C, se probó a extraer los SLC con acetona para eliminar cualquier compuesto fotoprotector que potencialmente le otorgase al líquen una mayor resistencia al UV-C. Al igual que en el caso del córtex con *R. geographicum*, tras la aplicación de las distintas dosis de UV-C no se detectaron diferencias significativas entre las muestras de *C. gyrosa* en las que se habían extraído los SCL y las que no, por lo que de nuevo se considera que los posibles SLC presentes en el córtex de *C. gyrosa* no son los principales responsables de la resistencia de este líquen.

En base a los anteriores resultados, la idea de que el estado fisiológico del talo y fundamentalmente el resistente estado latente (anabiótico) en el que los líquenes entran cuando el talo está deshidratado, es uno de los mecanismos principales para explicar la elevada tolerancia del fotobionte de estos organismos extremotolerantes.

En cuanto a la capacidad de recuperación de la actividad fotosintética durante un período de 72 h tras las exposiciones al UV-C, sólo fue detectada en las muestras secas y en las muestras húmedas e intactas de *R. geographicum*, por lo que se concluyó que el papel protector del córtex y de los SLC en él presentes, era más importante cuando la radiación UV-C incidía sobre talos con metabolismo activo. No se detectó recuperación en la actividad fotosintética de *C. gyrosa*.

La estabilidad en los patrones de MQY registrados en *C. gyrosa* antes y después de la aplicación de las distintas dosis de UV-C nos lleva a plantear que el fotobionte de esta especie está muy bien protegido, y dado que se ha descartado la implicación en esa resistencia de los SLC [69], se consideró como más lógica la propuesta realizada por Meeßen *et al.* (2013) [62] en la que se propone que el denso y altamente gelatinizado subcortex entre el córtex y los núcleos algales actúa como una adaptación secundaria para bloquear radiación. A pesar de esa propuesta, aún no se ha diseñado un experimento para demostrar esa hipótesis.

La cuantificación de los pigmentos clorofila (chl *a*), clorofila *b* (chl *b*),  $\beta$ -caroteno y luteína realizada tras la aplicación de las dosis UV-C no reveló ninguna tendencia clara en relación con la influencia de la radiación UV-C bajo las distintas condiciones experimentales probadas. Aunque previamente se había detectado para fotobiontes líquénicos un aumento en el contenido en carotenoides tras la exposición a radiación UV-B, que se interpretó como mecanismo protector [9], [38]; en este caso concreto se detectó un descenso generalizado en el contenido de los pigmentos cuantificados tras las dosis UV-C más altas. Esto fue así especialmente para muestras de *R. geographicum* sin córtex y en las dosis comprendidas entre 4,8 y 7,2 x 10<sup>7</sup> J/m<sup>2</sup>, inducido ese descenso por las altas dosis de radiación UV-C y la ausencia de córtex. Aparte de lo anterior, lo único reseñable fue que en las muestras sometidas a las dosis de radiación UV-C más altas aparecieron en el cromatograma picos junto a las señales de clorofilas y carotenoides, que pueden indicar la degradación de estos pigmentos por la acción oxidativa del UV-C [36]. El resto de diferencias detectadas tras la aplicación de las distintas dosis de radiación UV-C se explicaron como variabilidad intermuestral.

Lo más interesante en cuanto a la cuantificación de pigmentos fue detectar para ambos fotobiontes *Trebouxia* sp. valores bajos en la relación chl *a*/chl *b* (debido a una mayor cantidad relativa de chl *b*), típica de plantas y organismos fotosintéticos adaptados a bajas condiciones de luz. Ésto indica que ambos simbiontes están adaptados a bajas condiciones lumínicas. Teniendo en cuenta que estos organismos en sus hábitas naturales están expuestos a altos niveles de insolación natural, la explicación más plausible para este fenómeno es que ambas especies de líquenes (con sus enormes diferencias morfo- anatómicas) han desarrollado eficientes mecanismos para proteger a sus fotobiontes del exceso de luz que podría llegar a sus fotosistemas y dañarlos.

### 6.3. Publicación III: Experimento LIFE

En primer lugar, el experimento LIFE [66] supuso un hito en la investigación astrobiológica con líquenes, siendo aún hoy la exposición más larga a las condiciones presentes en LEO. En este experimento se detectó una diferencia notable entre la tolerancia de los líquenes *X. elegans* y *R. geographicum* en cuanto a la actividad de su PSII tras una exposición espacial de 1,5 años. Mientras que los controles de vuelo (expuestos a vacío espacial, radiación cósmica y fluctuaciones

de temperatura) revelaron una reducción menor al 2% en la actividad fotosintética de *X. elegans* después del vuelo, en *R. geographicum* las medidas de MQY revelaron un drástico descenso de un 97,5% en comparación con los registros pre-vuelo. En el caso de las muestras de *X. elegans* y *R. geographicum* expuestas a la radiación solar y cósmica simultáneamente, se observó una disminución de su actividad de un 55% y un 99,5% respectivamente. Teniendo en cuenta que ambas especies de líquenes son epilíticas, se desarrollan preferentemente en hábitas de alta montaña y tienen un fotobionte del género *Trebouxia* sp., es necesaria una profundización que explicase las drásticas diferencias detectadas.

A pesar de que no se habla de esa posibilidad en la discusión, los prácticamente nulos resultados de supervivencia obtenidos para *R. geographicum* vinieron a confirmar que se trata de un líquen poco tolerante a períodos de desecación largos [41].

Aunque todos las comunidades microbianas criptoendolíticas y líquenes incluidos en el experimento LIFE coincidían en su elevada resistencia a condiciones extremas en la Tierra así como el hecho de ser poiquilohídricos, tal y como ya se ha apuntado, sólo algunos mostraron cierto nivel de resistencia al hostil ambiente espacial en base a los resultados obtenidos en cuanto a vitalidad y viabilidad post-exposición.

En relación con el líquen *C. gyrosa*, en la publicación III se plantea que teniendo en cuenta que ha mostrado una completa recuperación de su actividad fisiológica tras la exposición de 10 días en el espacio (experimento LITHOPANSERMIA), se debería realizar un experimento de duración similar al del experimento LIFE para evaluar su respuesta a exposiciones más largas. Afortunadamente, esa posibilidad será llevada a cabo en el experimento BIOMEX (sección 2.2.5 del capítulo 2), por lo que será posible obtener más información sobre la resistencia de esta especie de líquen vagante a una larga exposición bajo condiciones espaciales.

#### 6.4. Publicación IV: Anatomía comparada de cinco líquenes relevantes en astrobiología

La investigación recogida en el artículo de Meeßen et al. (2013) [62] e incluida en la presente tesis doctoral permitió profundizar de forma sustancial en el conocimiento de los mecanismos de resistencia de líquenes extremófilos y extremotolerantes a ambientes extremos en relación con investigación espacial y astrobiológica, así como demostrar algunos puntos propuestos en la bibliografía. En este trabajo se realiza una aproximación a la elevada tolerancia de los líquenes usados con fines astrobiológicos hasta la fecha a partir de aspectos concretos de su morfología y anatomía.

Es muy interesante de esta publicación la detallada descripción que se hace de los caracteres morfo- anatómicos de los líquenes estudiados en la presente tesis doctoral, *R. geographicum* y *C. gyrosa* (ver sección 5.1 del capítulo 5) y lo que es más importante, la discusión sobre la implicación de distintos aspectos de su anatomía en la elevada resistencia a las condiciones extraterrestres a las que han sido sometidos hasta la fecha.

Por un lado se apunta a que en el caso de *R. geographicum*, el epicórtex gelatinoso, el córtex y la disposición vertical de las células algales rodeadas de hifas altamente gelatinizadas suponen las principales barreras frente al exceso de radiación PAR y UV.

Con respecto a *C. gyrosa*, se propone que el inusual subcórtex, considerablemente grueso, compacto y altamente gelatinizado confiere a los talos no sólo estabilidad mecánica sino también protección frente a la radiación UV. También se propone que la agrupación de las células del fotobionte en *clusters* rodeados de hifas gelatinizadas contribuye a la resistencia del fotobionte frente a factores de estrés como la UVR.

Otro aspecto destacable a mencionar de la discusión de esta publicación es la importancia de distinguir entre estructuras talinas diferenciadas y no hablar simplemente del “micobionte” o del “fotobionte” a la hora de hablar de la tolerancia de éstos a distintos factores de estrés, pues los resultados obtenidos en los experimentos realizados hacen pensar en que la tolerancia no está mediada por mera biomasa fúngica o fotosintética.

Por último, algo muy importante que este estudio pone de relieve es que las generalizaciones sobre la resistencia de los líquenes a condiciones ambientales extremas han de ser evitadas. Esto ha de hacerse en base a dos ideas:

1. Las claras diferencias de sensibilidad detectadas entre líquenes muy similares desde el punto de vista ecológico, morfológico y anatómico.
2. Las distintas historias evolutivas de cada líquen que han provocado adaptaciones a cada nicho ecológico concreto.

## 6.5. Visión de conjunto

A pesar de que en la publicación I se aplicaron varias combinaciones de parámetros marcianos (y de vacío espacial) y en la publicación II se evaluó la influencia de la radiación UV-C como agente aislado, ambas publicaciones deben considerarse en conjunto, pues en ambos casos se estaba profundizando en el conocimiento de la respuesta a condiciones extraterrestres de especies de líquenes extremotolerantes utilizadas previamente en investigación astrobiológica. Tras la revisión de las peculiaridades de cada experimento descrita en el apartado anterior, hay que poner en común los resultados y sus posibles implicaciones.

Las Publicaciones I y II mostraron, confirmando los resultados de experimentos anteriores y las hipótesis de partida, altos valores de resistencia a las tres combinaciones de condiciones marcianas y de vacío espacial aplicadas así como la influencia del estado fisiológico del talo y de otras estructuras de protección sobre la resistencia al UV-C por parte de *C. gyrosa* y *R. geographicum*.

La comparación de los resultados obtenidos en la publicación I con otro experimento de simulación marciana con líquenes [23], confirmó los resultados previamente obtenidos. El trabajo de de Vera et al. (2010) consistió en evaluar el efecto de varias combinaciones de condiciones termofísicas simuladas de Marte sobre talos del líquen extremotolerante previamente utilizado en experimentos espaciales de carácter astrobiológico *Xanthoria elegans*, así como sobre apotecios del mismo durante distintos períodos de tiempo, con el objetivo de analizar distintos parámetros de vitalidad en cada simulación. En primer lugar se simularon unas condiciones atmosféricas de un 95 % CO<sub>2</sub>, 100 % humedad, ciclos de temperatura de -55 °C a 20 °C cada 12 h, PAR, suministro de 0,8 ml de agua y presión constante de 1000 Pa durante un período de 22 días. Los análisis de viabilidad post-simulación elegidos tras esta simulación fueron de microscopía confocal asociados a tinción vital fluorescente y análisis de rendimiento fotosintético tras exposiciones más cortas. Entre un 75 % y un 92 % de las células del micobionte y entre un 65 % y un 81 % de las células del fotobionte se tiñeron con el marcador fluorescente vital FUN I, valores muy próximos a los de las muestras control no expuestas a la combinación de parámetros marcianos, indicando el alto porcentaje de células viables tras la simulación marciana [23]. Por otro lado se realizaron otras tres simulaciones más cortas de parámetros ambientales de la superficie de Marte: dos de 24 h a 15 °C y 5 °C respectivamente (combinando una composición atmosférica de un 95 % de CO<sub>2</sub>, humedad del 100 %, ciclos oscuridad/PAR de 1h/2h, un suministro de agua de 0,8 ml y una presión que se iba reduciendo de 101300 Pa a 1000 Pa progresivamente) y una última de 95 h de duración en la que se recreó la composición atmosférica marciana (95 % de CO<sub>2</sub>) bajo una humedad del 100 % con irradiación PAR continua y presión constante de 1000 Pa además de un ciclo de temperaturas de entre -55 °C y 20 °C cada 12 h. El objetivo de estas tres simulaciones era evaluar el efecto de las distintas temperaturas sobre la actividad fotosintética. Para ello se monitorizó en tiempo real el rendimiento del PSII durante cada una de las tres simulaciones. Los resultados indicaron que existía una correlación entre las presiones más bajas de la atmósfera rica en CO<sub>2</sub> y una actividad fotosintética óptima, que se explica por una saturación inducida por el CO<sub>2</sub> y la probable saturación de agua inicial al comienzo de los experimentos. La temperatura influye en el rendimiento fotosintético, reduciéndose los valores de MQY a temperaturas más bajas. Por lo tanto, a la luz de los resultados descritos las conclusiones de este estudio establecieron que no tuvo lugar un descenso significativo en la vitalidad del líquen. De forma similar y tal y como se ha explicado, los análisis realizados en la publicación I concluyeron que ninguna de las combinaciones de parámetros atmosféricos y de la superficie de Marte ni las condiciones de vacío LEO aplicadas inducían un descenso significativo en la vitalidad del líquen tras 120 h de exposición en cuanto a actividad del PSII e intercambio gaseoso dependiente de luz. Cabe destacar, que a pesar de que las simulaciones marcianas realizadas en la publicación I fueron más cortas (5 días frente a 22 días), las combinaciones de parámetros fueron mucho más restrictivas, incluyendo radiación UV-C y vacío espacial, a pesar de lo cual no se detectó un descenso significativo de vitalidad.

Si analizamos los resultados de la publicación II y los ponemos en contraste con las conclusiones derivadas de los experimentos espaciales LITHOPANSERMIA ([18] y sección 2.2.2 del capítulo 2) y LIFE ([66] y sección 2.2.4 del capítulo 2), podemos extraer algunas conclusiones. Por un lado, los talos intactos y secos de *R. geographicum* no mostraron una caída significativa en los valores de MQY tras una dosis de radiación UV-C equivalente a 67 días en condiciones espaciales, al igual que ocurrió tras la exposición de 10 días en LEO del experimento LITHOPANSERMIA. Sin embargo, el experimento LIFE sí reveló una reducción drástica (al 0,5 % de los valores pre-exposición) en los registros de actividad del PSII tras una exposición espacial de 1,5 años [66]. Por lo tanto, esta pérdida de actividad puede ser explicada bien por el considerable aumento en la duración de la exposición del experimento LIFE con respecto a los otros experimentos y la consiguiente acumulación de daños en el PSII o por el mayor efecto deletéreo de la exposición multifactorial frente a la exposición aislada a un único parámetro. Cuando quitamos el córtex de *R. geographicum*, la reducción del 8 % en los registros de MQY post-exposición es equivalente a la pérdida de actividad del 4 al 10 % detectada tras diez días en el experimento LITHOPANSERMIA en muestras sometidas al mismo tratamiento [18]. Ésto permite suponer que el daño acumulativo sobre el PSII tras 10 días en LEO es comparable al estrés que supone la exposición a la radiación UV-C equivalente a un período espacial de 67 días. La reducción mínima (de entre un 0,1 % y un 0,5 %) de actividad del PSII tras la exposición del experimento LITHOPANSERMIA se puede equiparar al mismo comportamiento detectado para las dosis intermedias aplicadas en la publicación II; indicando de nuevo que la radiación UV-C no es tan dañina como la exposición espacial completa. Los resultados obtenidos en cuanto a la resistencia del fotobionte a la radiación UV-C hacen que sea necesario revisar la asunción previa de que es éste el simbiote más sensible de la simbiosis líquénica, tal y como ha sido recientemente propuesto por Sadowsky et al. [73].

En la publicación III se hace hincapié en que los datos obtenidos durante el experimento LIFE fueron insuficientes para poder extraer ninguna conclusión relacionada con la plausibilidad de la hipótesis de la Litopanspermia. Esto es así por la escala temporal utilizada, que a pesar de ser mucho más larga que en experimentos anteriores, no es comparable a la estimación de tiempo requerida para el transporte interplanetario (cientos, miles o millones de años [39]).

Onofri et al. (2012) [66] proponen que para un transporte interplanetario real, los microorganismos endolíticos presentan una ventaja con respecto a los líquenes crustáceos. Ésto es así porque al crecer éstos sobre rocas, están totalmente expuestos al espectro letal de radiación UV solar extraterrestre, mientras que los microorganismos endolíticos presentan cierta protección debida al material circundante. A pesar de lo anterior, los resultados del experimento mostraron que sólo los organismos epilíticos enviados (líquenes) mostraron cierto grado de supervivencia.

En la publicación IV y para el caso de la considerable diferencia detectada en cuanto a la resistencia del aparato fotosintético de *X. elegans* y *R. geographicum* tras el experimento LIFE detallada en el apartado anterior, se proponen tres explicaciones desde el punto de vista morfológico/anatómico:

1. Distintos SLCs predominantes en cada líquen: parietina en *X. elegans* y ácido rhizocárpico en *R. geographicum*.
2. Córtex paraplectenquimático de 20  $\mu\text{m}$  de ancho presente en *X. elegans*.
3. Clusterización de las células algales en *X. elegans* frente a la disposición alineada en *R. geographicum*.

Es conveniente recordar que en el caso de *R. geographicum*, a pesar de su carácter extremotolerante para factores como cambios drásticos de temperatura y altos niveles de insolación, se trata de un líquen que no soporta bien períodos de desecación largos [41]. Es probable que ésa sea la explicación más probable para las bajos valores de rendimiento fotosintético registrados tras el experimento LIFE, añadido a los factores previamente mencionados y destacados en la publicación IV.

Por último, algo que ya se ha indicado en la discusión de la publicación IV pero que es conveniente volver a recordar es que para no incurrir en errores es clave el no hacer generalizaciones sobre la tolerancia y/o resistencia de los líquenes a condiciones ambientales extremas.

## 6.6. Relación con otras publicaciones

La publicación de Böttger et al. (2013) [7] incluida en los anexos y en la que el autor participó como coautor tiene relación con el objeto de investigación de la presente tesis doctoral y es por ello que se considera oportuno discutir brevemente sus resultados en el contexto de los previamente detallados.

La espectroscopía Raman permite investigar la composición molecular y estructural de casi cualquier material, compuesto orgánico o inorgánico sin alterarlo. Se basa en el examen de luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático, por ejemplo, la luz láser. Los cambios de frecuencia de la luz dispersada inelásticamente son característicos del material analizado e independientes de la frecuencia de la luz incidente, permitiendo así la identificación del material analizado. Desde el punto de vista astrobiológico, la capacidad de identificación que el Raman ofrece se va a aprovechar en la futura misión de exploración marciana ExoMars (ESA robotic exploration of Mars) con la intención de buscar biomarcadores (tal y como se ha indicado previamente, sustancias exclusivamente formadas por actividad biológica y que por lo tanto indican inequívocamente la presencia de vida reciente o pasada en un material [8], [85]) en la superficie de Marte.

Partiendo de la consideración de idoneidad de *Circinaria gyrosa* como organismo modelo para estudios astrobiológicos, en este estudio se trataron de obtener los conocimientos básicos del espectro Raman de esta especie para poder utilizarla en experimentos de búsqueda de vida fuera de la Tierra mediante la utilización de algunos de sus productos de biomineralización como biomarcadores. El objetivo concreto de Böttger et al. (2013) era encontrar en esta especie biomarcadores con espectros Raman inequívocos así como evaluar en el conocimiento de la estructura interna y propiedades Raman de *C. gyrosa*. Se enfocó en el estudio del oxalato cálcico monohidrato (whewellitita en el contexto mineralógico), un raro mineral producido por *C. gyrosa* en algunas zonas de su anatomía [62] y por ello buen candidato a biomarcador. Para ello se investigaron e interpretaron las propiedades Raman de:

1. Secciones talinas de 15-30  $\mu\text{m}$  para determinar la cantidad y distribución de oxalato cálcico y otros compuestos liquénicos secundarios (SLCs) en la anatomía del líquen
2. Parte del talo fracturada de forma natural para averiguar cuáles de las anteriores propiedades podrían ser descubiertas en una muestra aleatoria.

Pues bien, lo que se descubrió fue:

- Diferencias en la distribución de trazas identificables por Raman entre las distintas estructuras anatómicas y tejidos del líquen.
- El espectro “típico” hallado en *C. gyrosa* se caracteriza por señales Raman ya conocidas como son el  $\beta$ -caroteno (pigmento accesorio del aparato fotosintético del fotobionte y por lo tanto cercano a los *clusters* algales) y la quitina (componente mayoritario de la pared celular del micobionte e identificada mayoritariamente en el subcórtez y médula interior) complementadas por el patrón altamente característico del oxalato cálcico monohidrato ( $\text{Ca}_2(\text{C}_2\text{O}_4)\cdot\text{xH}_2\text{O}$ ). En conjunto supone un mosaico adecuado para fines de identificación.
- La detección de patrones de  $\beta$ -caroteno, quitina y oxalato cálcico monohidrato identificables por Raman fue más insatisfactoria en la parte naturalmente fracturada de un talo. Sin embargo, ambas aproximaciones coinciden en la correlación de la biomolécula detectada y la parte anatómica correspondiente del líquen.
- El oxalato cálcico monohidrato encontrado en *C. gyrosa* siempre se encuentra unido a las hifas y es más abundante en la parte interior de la médula.

El descubrimiento más interesante en relación con los mecanismos de resistencia y tolerancia de *C. gyrosa* a las condiciones extremas de su medio es el de la presencia de oxalato cálcico extracelularmente a las hifas. Se propone que tiene un papel en la regulación del balance hídrico del líquen. Ésto se basa tanto por su localización (espacio interior de la médula) y estrecha unión a las hifas como en la insolubilidad y función promotora del intercambio gaseoso de la propia médula

[76], [74]. Al hidratarse por completo, los espacios circundantes a las hifas de este líquen se llenarían de agua, lo que provocaría una disminución de la difusión de  $\text{CO}_2$  al exterior, viéndose reducido el rendimiento fotosintético precisamente en el momento en que el agua no es un factor limitante. Eso ocurriría si no existiese algún mecanismo que facilitase esa difusión, como es la presencia del oxalato cálcico monohidrato (hidrófobo) en las hifas de la zona interior de la médula, previniendo la anegación completa por agua de los espacios interiores y mejorando el rendimiento fotosintético del líquen.

# Capítulo 7

## Conclusiones

En los anteriores capítulos se ubica en su marco conceptual, se revisan los conocimientos alcanzados hasta la fecha y se resume la investigación realizada durante el desarrollo de la presente tesis doctoral. Llegados a este punto es necesario hacer una recopilación de todo lo anterior y enumerar las conclusiones alcanzadas durante todo este proceso.

### 7.1. Conclusiones Publicación I

Los experimentos de simulación recogidos en esta publicación suponen la primera aproximación al análisis de la capacidad de supervivencia del líquen extremotolerante *C. gyrosa* a una completa combinación de parámetros ambientales marcianos.

Los resultados obtenidos en la Publicación I (IV) conducen a varias conclusiones:

1. Elevada resistencia y capacidad de supervivencia de un organismo simbiótico eucariótico bajo condiciones marcianas y espaciales simuladas.
  - Ni los parámetros ambientales marcianos ni el vacío LEO inducen un descenso significativo en la actividad del líquen tras una exposición de 120 h.
2. Las tres combinaciones de parámetros marcianos (y de vacío espacial) analizados no produjeron un daño severo ni sobre el aparato fotosintético del fotobionte de *C. gyrosa* ni sobre el funcionamiento global del líquen.
  - La capacidad de tolerancia de *C. gyrosa* es mucho mayor que si adscribe únicamente al rango de parámetros presentes en su hábitat natural en cuanto a composición de gases, presión y radiación UV-C.
3. La elevada tolerancia detectada hace pensar en un mecanismo de resistencia liquénico global como es la poiquilohidria unido a adaptaciones anatómicas específicas de este líquen que en conjunto explicarían la resistencia de *C. gyrosa* a las condiciones experimentales aplicadas.
4. Basándonos en sus propiedades de tolerancia, *C. gyrosa* es un buen sistema modelo para futuros estudios de resistencia, supervivencia, tolerancia y otras cuestiones relacionadas con astrobiología y la búsqueda de vida en otros planetas.
  - Sus características la hacen especialmente indicada para tratar cuestiones de organismos eucariotas y simbióticos.
5. Estos resultados junto con los obtenidos en el experimento LITHOPANSPERMIA aportan datos positivos que apoyan la hipótesis de la Litopanspermia, aunque sería necesario aumentar las escalas temporales.
6. Se demuestra la relevancia de las cámaras de simulación en investigación astrobiológica.
7. La posibilidad de comparación entre las muestras del nivel superior e inferior queda demostrada.

## 7.2. Conclusiones Publicación II

Igualmente, los resultados obtenidos en la Publicación II (IV) hacen que puedan establecerse las siguientes conclusiones:

1. El límite de supervivencia del fotobionte *Trebouxia* sp. presente en las especies de líquenes *R. geographicum* y *C. gyrosa* a la radiación UV-C se ha visto aumentado considerablemente en comparación con datos obtenidos previamente.
2. Ambos fotobiontes del género *Trebouxia* sp. han mostrado una alta tolerancia en términos de actividad del PSII, estando esta alta tolerancia claramente influida por el estado fisiológico del talo
  - El fotobionte mostró valores inalterados de MQY en estado latente, mientras que se detectaron menores niveles de actividad en muestras fisiológicamente activas.
3. La presencia de estructuras complementarias de protección “pasiva” es propuesta como un mecanismo complementario para explicar la alta tolerancia al UV-C detectada. Su mecanismo de actuación estaría basado en bloquear el exceso de radiación y actuar como mecanismos de protección primaria en hábitats con elevada exposición solar. Estas estructuras serían:
  - El grueso epicórtex pigmentado con incrustaciones de SLC en *R. geographicum*
  - El extremadamente denso, grueso y gelatinizado subcórtex en *C. gyrosa*
4. Los líquenes, entre otros organismos extremotolerantes, poseen características fisiológicas que los hacen excelentes modelos para investigación en astrobiología.

## 7.3. Conclusiones Publicación III

- En la investigación recogida en el artículo de Onofri et al. (2012) [66] se concluyen una serie de puntos sobre la resistencia de los líquenes extremotolerantes expuestos en la ISS durante 1,5 años:
  1. Las muestras de *R. geographicum* no expuestas a la radiación solar electromagnética no mostraron tanta tolerancia y vieron disminuida su capacidad fotosintética hasta un  $2,46 \pm 1,39\%$  si comparamos los registros post-vuelo con los realizados sobre las mismas muestras previamente al mismo.
  2. El liquen *Xanthoria elegans* mantuvo prácticamente inalterada ( $99,35 \pm 0,59\%$ ) su capacidad fotosintética cuando estuvo sometido a 565 días de exposición en LEO a vacío espacial, radiación cósmica y fluctuaciones de temperatura pero protegido de la radiación solar electromagnética. La funcionalidad del PSII se vio reducida considerablemente (45%) en las muestras 100% expuestas.
  3. Los análisis de microscopía confocal asociada a tinción vital apuntaron a que el micobionte otorgue protección y estabilidad a los talos completos de *X. elegans*, no habiéndose detectado tras los análisis cambios en su fisiología, incluso en las muestras expuestas a la totalidad de parámetros presentes en LEO.

## 7.4. Conclusiones Publicación IV

- La comparación de caracteres anatómicos y morfológicos entre los distintos líquenes utilizados hasta la fecha en investigación astrobiológica que podemos encontrar en el trabajo de Meeßen et al. (2013) [62] permitió la identificación de algunas características que contribuyen a explicar su tolerancia y resistencia a condiciones espaciales.

1. En el caso de *R. geographicum*:
  - Formación de un epicortex gelatinoso que puede favorecer la resistencia del liquen modificando sus propiedades reflexivas y reduciendo así la intensidad de la PAR o UVR que alcanza el talo (además de influir en la toma y retención de agua).
  - El córtex se considera un elemento clave de protección mecánica para aumentar la resistencia a la radiación UV.
  - En *R. geographicum* las células algales están rodeadas por hifas fúngicas altamente gelatinizadas y dispuestas en filas verticales y perpendiculares a la superficie del talo. El alineamiento del fotobionte pueden suponer un mecanismo extra de protección frente al exceso de radiación.
  - Las propias esporas de *R. geographicum* están altamente melanizadas, lo que supone una ventaja para su desarrollo en áreas con altos niveles de insolación.
2. Respecto a *C. gyrosa*:
  - De los cinco líquenes extremotolerantes estudiados, *C. gyrosa* es el único que presenta un grueso subcortex (150  $\mu\text{m}$ ) totalmente despigmentado y que posee una estructura compacta de hifas fúngicas densamente dispuestas. Se cree que la presencia de esta estructura está relacionada con su defecto en SLC y es la encargada de proveer a los talos no sólo de estabilidad mecánica (clave en su estilo de vida vagante) sino también de compensar la falta de SLCs fotoprotectores.
  - Presencia considerable de sustancias gelatinosas en el subcortex. Se cree que suponen un elemento muy importante de defensa frente al exceso de PAR y UVR.
  - El córtex (despigmentado, paraplectenquimático y epinecral) contribuye también a la resistencia, estando entre sus funciones fundamentales la protección del fotobionte además de la estabilización mecánica, protección frente a herbívoros y limitación fisiológica.
  - El agrupamiento de células algales (*clusterización*) y su recubrimiento por hifas altamente gelatinizadas contribuye a la resistencia frente a la radiación.

## 7.5. Conclusiones generales

De forma global, teniendo en cuenta los aspectos comunes de los experimentos llevados a cabo pueden extraerse una serie de conclusiones generales de la investigación realizada.

1. Se deduce que no hay un mecanismo único sobre el que basar la tolerancia a exposiciones cortas en condiciones espaciales reales o marcianas simuladas. Se propone que se trate de una combinación entre el resistente estado latente (deshidratado) en el que los líquenes entran bajo condiciones adversas debido a su carácter poiquilohídrico, unido a alguno de los siguientes factores, los que sean responsables de la elevada resistencia detectada:
    - La combinación de un córtex incrustado con múltiples SLCs, el agrupamiento y disposición algal y las capas mucilaginosas en *R. geographicum*.
    - El grueso, compacto y gelatinizado subcortex de *C. gyrosa*.
- Además, lo anterior nos permite concluir que no deben realizarse generalizaciones sobre los mecanismos de tolerancia/resistencia de líquenes extremotolerantes a condiciones extremas, ya sean éstas terrestres o extraterrestres.
2. Se demuestra por primera vez la tolerancia del liquen *C. gyrosa*, un sistema eucariótico simbiótico, a distintas combinaciones de condiciones marcianas. Entre éstas está incluida la simulación más real realizada hasta la fecha sobre estos organismos, simulando composición atmosférica, presión y UVR marcianas a una temperatura restrictiva.
  3. En comparación con los datos previamente obtenidos tras irradiar con UV-C, el límite de resistencia del fotobionte *Trebouxia* sp. de las especies *R. geographicum* y *C. gyrosa* estudiadas ha incrementado sus expectativas de tolerancia bajo las condiciones experimentales aplicadas.

4. La presencia de oxalato cálcico monohidrato junto a las hifas de la zona interior de la médula en *C. gyrosa* pueden actuar mejorando la difusión de CO<sub>2</sub> en momentos de alta hidratación, ayudando a mejorar su rendimiento fotosintético.

# Bibliografía

- [1] Arrhenius, S. *Die Verbreitung des Lebens im Weltenraum*. Umschau 7, pp. 481-485 (1903).
- [2] Ahmadjian, Vernon. *The Lichen Symbiosis* John Wiley & Sons, Inc., New York, 250 pp (1993). ISBN 0-471-57885-1
- [3] Barceló Coll, J.; Nicolás Rodrigo, G.; Sabater García, B.; Sánchez Tamés, R. *Fisiología Vegetal* Ediciones Pirámide (2001).
- [4] Barreno, Eva; Pérez-Ortega, Sergio. *Líquenes de la Reserva Natural Integral de Muniellos, Asturias* Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras del Principado de Asturias. KRK Ediciones (2003).
- [5] Berry, B.J.; Jenkins, D.G. and Schuerger, A.C. *Effects of Simulated Mars Conditions on the Survival and Growth of Escherichia coli and Serratia liquefaciens* Appl. Envir. Microbiol. 76(8): 2377-2386 (2010).
- [6] Billi, D.; Viaggiu, E.; Cockell, C.S.; Rabbow, E.; Horneck, G. and Onofri, S. *Damage Escape and Repair in Dried Chroococcidiopsis spp. from Hot and Cold Deserts Exposed to Simulated Space and Martian Conditions*. Astrobiology. February 2011, ahead of print.
- [7] Böttger, U.; Meeßen, J.; Martínez-Frías, J.; Hübers, H.-W.; Rull, F.; Sánchez, F.J.; de la Torre, R. and de Vera, J.-P. *Raman spectroscopic analysis of the calcium oxalate producing extremotolerant lichen Circinaria gyrosa*. International Journal of Astrobiology 13 (1): 19-27 (2014).
- [8] Brack, A.; Clancy, P.; Fitton, B.; Hoffmann, B.; Horneck, G.; Kurat, G.; Maxwell, J.; Ori, G.; Pillinger, C.; Raulin, F.; Thomas, N.; Westall, F. *Search for life on Mars*. Biological Sciences in Space 12 (2): 119-123 (1998).
- [9] Buffoni Hall, R. *Effects of increased UV-B radiation on the lichen Cladonia arbuscula spp. mitis: UV-absorbing pigments and DNA damage*. PhD Dissertation, Department of Cell and Organism Biology, Lund University, Sweden (2002).
- [10] Brodo, I.M.; Sharnoff, S.D and Sharnoff, S. *Lichens of North America*. University Press New Haven and London (2001).
- [11] Cady, S.L.; Farmer, J.D.; Grotzinger, J.P.; William Schopf, J.; Steele, A. *Morphological Biosignatures and the Search for Life on Mars* Astrobiology 3 (2): 351-368 (2003).
- [12] Crespo, A.; Barreno, E. *Sobre las comunidades terrícolas de líquenes vagantes (Sphaerothallio-Xanthoparmelion vagantis al. nova)*. Acta Botánica Malacitana, 4: 55-62 (1978).
- [13] de la Torre, R. *Estudios de los efectos de la radiación UV sobre ecosistemas epilíticos* Memoria Doctoral, Universidad Complutense de Madrid (2002).
- [14] de la Torre, R.; Horneck, G.; G<sup>o</sup>Sancho, L.; Scherer, K.; Facius, R.; Urlings, T.; Rettberg, P.; Reina, M. and Pintado, A. *Photoecological characterization of an epilithic ecosystem at a high mountain locality (Central Spain)* Proceedings of Second European Workshop on Exo/Astrobiology. ESA SP-518: 443-445 (2002).

- [15] de la Torre, R.; Horneck, G.; Sancho, L.G.; Pintado, A.; Scherer, K.; Facius, R.; Deutschmann, U.; Reina, M.; Baglioni, P. and Demets, R. *Studies of LICHENS from high mountains regions in outer space, the BIOPAN experiment*. In: Harris R.A., Ouwehand, L. (eds) Proceedings of the Third European Workshop on Exo/Astrobiology. ESA Publications Division, ESTEC, Noordwijk, The Netherlands. ESA SP-545: 193-194 (2004).
- [16] de la Torre, R.; Sancho, L.G. and Horneck, G. *Adaptation of the lichen Rhizocarpon geographicum to harsh high-altitude conditions: relevance to a habitable Mars*. ROME: Response of Organisms to the Martian Environment, ESA SP. 1299 (ESTEC, Noordwijk) 145-150 (2007a).
- [17] de la Torre, R.; Sancho, L.G.; Pintado, A.; Rettberg, P.; Rabbow, E.; Panitz, C.; Deutschmann, U.; Reina, M.; Horneck, G. *BIOPAN experiment LICHENS on the Foton M2 mission Pre-flight verification tests of Rhizocarpon geographicum- granite ecosystem* Adv. Space Res. 40: 1665-1671 (2007b).
- [18] de la Torre, R.; Sancho L.G<sup>a</sup>.; Horneck G.; de los Ríos A.; Wierzchos J.; Olsson-Francis K.; Cockell C.S.; Rettberg P.; Berger T.; de Vera J.-P.; Ott S.; Martínez-Frías J.; González-Melendi P.; Mercedes-Lucas M.; Reina M.; Pintado A. and Demets R. *Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions - Results of the Lithopanspermia experiments*. Icarus, 208(2): 735-748 (2010).
- [19] Demets, R.; Schulte, W. and Baglioni, P. *The past, present and future of BIOPAN*. Advances in Space Research 36: 311-316 (2005).
- [20] de Vera, J.P. *Lichens as survivors in space and on Mars* Fungal Ecology 5:472-479 (2012a).
- [21] de Vera, J.P.; Boettger, U.; de la Torre Noetzel, R.; Sánchez, Francisco J.; Grunow, D.; Schmitz, N.; Lange, C.; Hübers, H-W. and Co-I team of BIOMEX *Supporting Mars exploration: BIOMEX in Low Earth Orbit and further astrobiological studies on the Moon using Raman and PanCam technology*. Planetary and Space Science 74: 103-110 (2012b).
- [22] de Vera, J.-P.; Ott, S. *Resistance of Symbiotic Eukaryotes. Survival to Simulated Space Conditions and Asteroid Impact Cataclysms*. Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology J. Seckbach and M. Grube (Eds.), 17(5), pp. 595-611 (2010b).
- [23] de Vera, J.P.; Möhlmann, D.; Butina, F.; Lorek, A.; Wernecke, R. and Ott, S. *Survival Potential and Photosynthetic Activity of Lichens Under Mars-Like Conditions: A Laboratory Study*. Astrobiology 10 (2): 215-227 (2010a).
- [24] de Vera, J.P.; Rettberg, P. and Ott, S. *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, 457-468 (2008).
- [25] de Vera, J.P.; Tilmes, F.; Heydenreich, T.; Meyer, C.; Horneck, G. and Ott, S. *Potential of Prokaryotic and Eukaryotic organisms in a Mars like environment and as reference system for the search of life on other planets* Proceeding of DGLR Int. Symp. "To the moon and beyond" (2007).
- [26] de Vera, J.P.; Horneck, G.; Rettberg, P. and Ott, S. *In the context of Panspermia: May lichens serve as shuttles for their bionts in Space?* In: Harris R.A., Ouwehand, L. (eds) Proceedings of the Third European Workshop on Exo/Astrobiology. ESA SP-545: 197-198 (2004b).
- [27] de Vera, J.P.; Horneck, G.; Rettberg, P. and Ott, S. *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): 1236-43 (2004a).
- [28] de Vera, J.P.; Horneck, G.; Rettberg, P. and Ott, S. *The potential of 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 (2003).

- [29] Díaz, B. and Schulze-Makuch, D. *Microbial Survival Rates of Escherichia coli and Deinococcus radiodurans Under Low Temperature, Low Pressure and UV-Irradiation Conditions, and Their Relevance to Possible Martian Life*. *Astrobiology* 6(2): 332-347 (2006).
- [30] Fajardo-Cavazos, P.; Link, L.; Melosh, H.J. and Nicholson, W.L. *Bacillus subtilis spores on artificial meteorites survive hypervelocity atmospheric entry: implications for Lithopanspermia*. *Astrobiology* 5 (6):726-736 (2005).
- [31] Fendrihan, S.; Bercés, A.; Lammer, H.; Musso, M.; Rontó, G.; Polacsek, T.J.; Holzinger, A.; Kolb, C. and Stan-Lotter, H. *Investigating the Effects of Simulated Martian Ultraviolet Radiation on Halococcus dombrowskii and Other Extremely Halophilic Archaeobacteria*. *Astrobiology* 9 (1): 104-112 (2009).
- [32] Feuerer, T. *Zur Kenntnis der Flechtengattung Rhizocarpon in Bayern, Ber. Bayer. Bot. Ges.* 49: 59-135 (1978).
- [33] Follmann, G.; Crespo, A. *Observaciones acerca de la distribución de líquenes españoles. II. Sphaerothallia fruticulosa (Eversm.)*. *Anal. Inst. Bot. Cavanilles* 31 (1): 325-333 (1974).
- [34] Friedman E.I.; Wierzbos, J.; Ascaso, C. and Winklhoferer, M. *Chains of magnetite crystals in the meteorite ALH84001: Evidence of biological origin*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (98):2176-2181 (2001).
- [35] Gargaud, M., editor-in-chief; Amils, R.; Cernicharo Quintanilla, J.; Cleaves, H.J.; Irvine, W.M.; Pinti, D.; Viso, M., editors. *Encyclopedia of Astrobiology*. ISBN 978-3-642-11279-9 (2011).
- [36] Gao, Y.; Cui, Y.; Xiong, W.; Li, X. and Wu, Q. *Effect of UV-C on algal evolution and differences in growth rate, pigmentation and photosynthesis between prokaryotic and eukaryotic algae*. *Photochem. Photobiol.* 85: 774-782 (2009).
- [37] Gauslaa, Y. and Solhaug, K.A. *Photoinhibition in lichens depends on cortical characteristics and hydration*. *The Lichenologist* 36: 133-143 (2004).
- [38] Gautam, S.; Singh, J. and Pant, A.B. *Effect of UV-B radiations on the pigments of two Antarctic lichens of Schirmacher Oasis, East Antarctica*. *Pol. Polar Research* 32(3): 279-287 (2011).
- [39] Gladman, B.J.; Burns, J.A.; Duncan, M.; Lee, P. and Levinson, H.F. *The exchange of impact ejecta between the terrestrial planets*. *Science* 271: 1387-1392 (1996).
- [40] Green, T.G.A. and Lange, O.L. *Photosynthesis in Poikilohydric Plants: A Comparison of Lichens and Bryophytes*. In: *Ecophysiology of Photosynthesis*, Springer Study Edition, 100, pp. 319-341 (1994).
- [41] Green, T.G.A.; Sancho, L.G. and Pintado, A. *Ecophysiology of Dessication/Rehydration Cycles in Mosses and Lichens*. En: *Dessication tolerance of plants*. Bartels, Beck and Luetzge (eds.). Chapter 3.2, *Ecological Studies*, Springer Verlag (2011).
- [42] Hansen, A.A.; Jensen, L.L.; Kristoffersen, T.; Mikkelsen, K.; Merrison, J.; Finster K.W. and Lomstein B.A. *Effects of Long-Term Simulated Martian Conditions on a Freeze-Dried and Homogenized Bacterial Permafrost Community*. *Astrobiology* 9 (2): 229-240 (2009).
- [43] Hawksworth, D. L. *Fungi-algae interactions in lichen and lichenoid symbioses*. *Anales Jard. Bot. Madrid* 46(1): 235-247 (1988).
- [44] Heptinstall, J. and Rapley, R. *Spectrophotometric Analysis of Nucleic Acids*. *The Nucleic Acid Protocols Handbook*, Humana Press, ISBN 978-0-89603-459-4, pp. 57-60 (2000).
- [45] Heber, U.; Soni, V. and Strasser, R.J. *Photoprotection of reaction centers: thermal dissipation of absorbed light energy vs charge separation in lichens*. *Physiol. Plantarum* 142 (1): 65-78 (2011).

- [46] Henssen, A. and Jahns, H.M. *Lichenes. Eine Einführung in die Flechtenkunde* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 11-71 (1974).
- [47] Horneck, G.; Bücker, H. and Reitz, G. *Long-term survival of bacterial spores in space*. Adv. Space Res. 14 (10): 41-45 (1994).
- [48] Horneck, G.; Stöffler, D.; Ott, S.; Hornemann, U.; Cockell, C.S.; Möller, R.; Meyer, C.; de Vera, J.P.; Fritz, J.; Schade, S.; Artemieva, N. *Microbial rock inhabitants survive hypervelocity impacts on Mars-like host planets: First phase of Lithopanspermia experimentally tested*. Astrobiology 8, 17-44 (2008).
- [49] Horneck, G. *European Activities in Exobiology in Earth Orbit: Results and Perspectives*. Adv. Space Res., 23(2), 381-386 (1999).
- [50] Horneck, G. and Baumstark-Khan, C. *Astrobiology. The Quest for the Conditions of Life* Chapter 3: Habitable Zones in Extrasolar Planetary Systems. Springer-Verlag. ISBN 3-540-42101-7 (2002).
- [51] International Lichenological Newsletter. Volume 15, Number 2:18 (1982).
- [52] Jensen, L.L.; Merrison, J.; Hansen A.A.; Mikkelsen K.A.; Kristoffersen T.; Nomberg P.; Lomstein B.A.; Finster, K. *A Facility for Long-Term Mars Simulation Experiments: The Mars Environmental Simulation Chamber (MESCH)*. Astrobiology 8 (3): 537-548 (2008).
- [53] Jorge Villar, S.E. and Edwards, H.G.M. *Raman spectroscopy in Astrobiology* Anal Bioanal Chem 384: 100-113 (2006).
- [54] Kappen, L.; Schroeter, B.; Scheidegger, C.; Sommerkorn, M. and Hestmark, G. *Cold resistance and metabolic activity of lichens below 0°C* Adv. Space Res. 18 (12): 119-128 (1996).
- [55] Kranner, I.; Cram, W.J.; Zorn, M.; Wornik, S.; Yoshimura, I.; Stabentheiner, E. and Pfeifhofer, H.W. *Antioxidants and photoprotection in lichen as compared with its isolated symbiotic partners* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 3141-3146 (2005).
- [56] Kunkel, G. *Microhabitat and structural variation in the Aspicilia desertorum group (Lichenized Ascomycetes)*. American Journal of Botany 67: 1137-1144 (1980).
- [57] Lange, O.L.; Bilger, W.; Rinke, S. and Schreiber, U. *Chlorophyll fluorescence of lichens containing green and blue-green algae during hydration by water vapor and by addition of liquid water* Bot. Acta 102: 306-313 (1989).
- [58] Lutzoni, F.; Pagel, M. and Reeb, V. *Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors* Nature 411: 937-940 (2001).
- [59] Mateo Martí, E.; Prieto-Ballesteros, O.; Sobrado, J.M.; Gómez-Elvira, J. and Martín-Gago, J.A. *A chamber for studying planetary environments and its applications to astrobiology*. Meas. Sci. Technol. 17 2274-2280 (2006).
- [60] Mayer, C.; Moritz, R.; Kirschner, C.; Borchard, W.; Maibaum, R.; Wingender, J. and Flemming, H.C. *The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms* Int. J. Biol. Macromol. 26, 3-16 (1999).
- [61] McKay D.S.; Gibson E.K.Jr.; Thomas-Keprta K.L.; Vali H.; Romanek C.S.; Clemett S.J.; Chillier X.D.F.; Maechling C.R. and Zare R.N. *Search for past life on Mars: Possible relic biogenic activity in martian meteorite ALH 84001*. Science 273, 924-930 (1996).
- [62] Meeßen, J.; Sánchez, F.J.; Brandt, A.; Balzer, E.-M.; de la Torre, R.; Sancho, L.G<sup>a</sup>; de Vera, J.-P.; Ott, S. *Extremotolerance and resistance towards space conditions in 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 (2013).

- [63] Mehta, M.; Renno, N.O.; Marshall, J.; Grover, M.R.; Sengupta, A.; Rusche, N.A.; Kok, J.F.; Arvidson, R.E.; Markiewicz, W.J.; Lemmon, M.; Smith, P.H. *Explosive erosion exposes the subsurface ice on Mars*. *Icarus*, 211: 172- 194 (2011).
- [64] Nicholson, W.L. and Schuerger, A.C. *Bacillus subtilis Spore Survival and Expression of Germination-induced Bioluminescence After Prolonged Incubation Under Simulated Mars Atmospheric Pressure and Composition: Implications for Planetary Protections and Lithopanspermia*. *Astrobiology* 5 (4): 536-544 (2005).
- [65] Onofri, S.; Barreca, D.; Selbmann, L.; Isola, D.; Rabbow, E.; Horneck, G.; de Vera, J.P.P.; Hattton, J. and Zucconi, L. *Resistance of Antarctic black fungi and cryptoendolithic communities to simulated space and Martian conditions*. *Studies in Mycology* 61: 99-109 (2008).
- [66] Onofri, S.; de la Torre, R.; de Vera, J.-P.; Ott, S.; Zucconi, L.; Selbmann, L.; Scalzi, G.; Venkateswaran, K.J.; Rabbow, E.; Sánchez Iñigo, F.J. and Horneck, G. *Survival of Rock-Colonizing Organisms After 1.5 Years in Outer Space*. *Astrobiology*, 12(5), pp. 508-516 (2012).
- [67] Owen, T.C. *The Composition and Early History of the Atmosphere of Mars*. University of Arizona Press, Tucson (1992).
- [68] Ozenda, P. and Clauzade, G. *Les Lichens. Étude biologique et flore illustré*. Ed. Masson et Cie., París, 801 pp. (1970).
- [69] Raggio, J., Pintado, A., Ascaso, C., de la Torre, R., de los Ríos, A., Wierzchos, J., Horneck, G., Sancho G<sup>a</sup>, L. *Whole Lichen Thalli Survive Exposure to Space Conditions: Results of Lithopanspermia Experiment with Aspicilia fruticulosa* *Astrobiology* 11(4):281-292 (2011).
- [70] Richter, H.E. *Zur darwinschen Lehre* Schmidts Jahrbücher Ges. Med. 126: 243-249 (1865).
- [71] Rothschild, L.J. and Mancinelli, R.L. *Life in Extreme Environments* *Nature* 409: 1092-1101 (2001).
- [72] Rettberg, P.; Rabbow, E.; Panitz, C. and Horneck, G. *Biological space experiments for the simulation of Martian conditions: UV radiation and Martian soil analogues* *Advances in Space Research* 33: 1294-1301 (2004).
- [73] Sadowsky, A.; Ott, S. *Photosynthetic symbionts in Antarctic terrestrial ecosystems: the physiological response of lichen photobionts to drought and cold*. *Symbiosis*, 58: 81-90 (2012).
- [74] Sánchez, F.J.; Mateo-Martí, E.; Raggio, J.; Meeßen, J.; Martínez-Frías, J.; Sancho, L.G.; Ott, S.; de la Torre, R. *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 (2012).
- [75] Sánchez, F. J.; Meeßen, J.; Ruiz, M.C.; G.<sup>a</sup> Sancho, L.; Ott, S.; Vílchez, C.; Horneck, G.; de la Torre, R. *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 (2014).
- [76] Sancho, L.G.; Schroeter, B.; and del-Prado, R. *Ecophysiology and morphology of the globular erratic lichen *Aspicilia fruticulosa* from Central Spain* *Bibl. Lichenol.* 75: 137-147 (2000).
- [77] Sancho, L.G.; de la Torre, R.; Horneck, G.; Ascaso, C.; de los Ríos, A.; Pintado, A.; Wierzchos, J. and Schuster, M. *Lichens Survive in Space: Results from the 2005 LICHENS Experiment* *Astrobiology* 7 (3): 443-454 (2007).
- [78] Sancho, L.G.; de la Torre, R. and Pintado, A. *Lichens, new and promising material from experiments in Astrobiology* *Fungal Biology Reviews* 22 (3-4): 103-109 (2008).
- [79] Sancho, L.G. and Pintado, A. *Evidence of high annual growth rate for Antarctic lichens*. *Polar Biology* 27: 132-317 (2004).

- [80] Scalzi, G., Selbmann, L., Zucconi, L., Rabbow, E., Horneck, G., Albertano, P., Onofri, S. *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* 42:253-262 (2012).
- [81] Schoch, C.L.; Sung, G.H.; López-Giráldez, F.; Townsend, J.P.; Miadlikowska, J.; Hofstetter, V.; Robbertse, B.; Matheny, P.B.; Kauff, F.; Wang, Z.; Gueidan, C.; Andrie, R.M.; Trippe, K.; Ciuffetti, L.M.; Wynns, A.; Fraker, E.; Hodkinson, B.P.; Bonito, G.; Groenewald, J.Z.; Arzanlou, M.; de Hoog, G.S.; Crous, P.W.; Hewitt, D.; Pfister, D.H.; Peterson, K.; Gryzenhout, M.; Wingfield, M.J.; Aptroot, A.; Suh, S.O.; Blackwell, M.; Hillis, D.M.; Griffith, G.W.; Castlebury, L.A.; Rossman, A.Y.; Lumbsch, H.T.; Lücking, R.; Büdel, B.; Rauhut, A.; Diederich, P.; Ertz, D.; Geiser, D.M.; Hosaka, K.; Inderbitzin, P.; Kohlmeyer, J.; Volkmann-Kohlmeyer, B.; Mostert, L.; O'Donnell, K.; Sipman, H.; Rogers, J.D.; Shoemaker, R.A.; Sugiyama, J.; Summerbell, R.C.; Untereiner, W.; Johnston, P.R.; Stenroos, S.; Zuccaro, A.; Dyer, P.S.; Crittenden, P.D.; Cole, M.S.; Hansen, K.; Trappe, J.M.; Yahr, R.; Lutzoni, F. and Spatafora, J.W. *The Ascomycota Tree of Life: A Phylum-wide Phylogeny Clarifies the Origin and Evolution of Fundamental Reproductive and Ecological Traits*. *Systematic Biology*, 58: 224-239 (2009).
- [82] Schreiber U., Bilger W. and Neubauer C. *Chlorophyll Fluorescence as a Noninvasive Indicator for Rapid Assessment of In Vivo Photosynthesis* *Ecophysiology of Photosynthesis* 100: 49-70 (1994).
- [83] Schreiber U. *Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview* En: *Chlorophyll a Fluorescence*, G.C Papageorgiou y Govindjee (eds.), Springer Netherlands, pp. 279-319 (2004).
- [84] Schuerger, A.C.; Mancinelli, R.L.; Kern, R.G.; Rothschild, L.J. and McKay, C.P. *Survival of endospores of Bacillus subtilis on spacecraft surfaces under simulated martian environments: implications for the forward contamination of Mars Icarus* 165: 253-276 (2003).
- [85] Simoneit, B.R.T. *Molecular Indicators (Biomarkers) of Past Life*. *The anatomical record* 268: 186-195 (2002).
- [86] Sinha, R.P. and Häder, D-P. *UV-induced DNA damage and repair: a review* *Photochem. Photobiol. Sci.* 1 (4): 225-236 (2002).
- [87] Smith, D.J.; Schuerger, A.C.; Davidson, M.M.; Pacala, S.W.; Bakermans, C.; Onstott, T.C. *Survivability of Psychrobacter cryohalolentis K5 under Simulated Martian Surface Conditions* *Astrobiology* 9 (2): 221-228 (2009).
- [88] Sohrabi, M. *Taxonomy and phylogeny of the manna lichens and allied species (Megasporeaceae)* PhD thesis, Publications in Botany from the University of Helsinki (2012).
- [89] Stöffler, D.; Horneck, G.; Ott, S.; Hornemann, U.; Cockell, C.S.; Möller, R.; Meyer, C.; de Vera, J.P.; Fritz, J. and Artemieva, N.A. *Experimental evidence for the impact ejection of viable microorganisms from Mars-like planets Icarus* 186, 585-588 (2007).
- [90] Tauscher, C.; Schuerger, A.C. and Nicholson, W.L. *Survival and Germinability of Bacillus subtilis Spores Exposed to Simulated Mars Solar Radiation: Implications for Life Detection and Planetary Protection* *Astrobiology* 6 (4): 592-605 (2006).
- [91] Tevini, M. and Häder D.-P. *Allgemeine Photobiologie* Georg Thieme Verlag Stuttgart, p. 25 (1985).
- [92] Weber, P. and Greenberg, J.M. *Can Spores Survive in Interstellar Space?* *Nature*, 316: 403 (1985).
- [93] Wynn-Williams, D.D.; Edwards H.G.M.; Newton, E.M. and Holder, J.M. *Pigmentation as a survival strategy for ancient and modern photosynthetic microbes under high ultraviolet stress on planetary surfaces* *International Journal of Astrobiology* 1: 39-49 (2002a).

- [94] Young, A.J., Phillip, D. and Savill, J. *Carotenoids in higher plant photosynthesis*. En: Handbook of photosynthesis, Marcel Dekker, New York (Pessaraki M. (ed.)), pp. 575- 596 (1997).
- [95] Zhukova, A.I. and Kondratyev, I.I. *On Artificial Martian Conditions Reproduced for Microbiological Research*. Life Sci. Space. Res. 3: 120-126 (1965).



**Parte VI**

**Anexos**



# Raman spectroscopic analysis of the calcium oxalate producing extremotolerant lichen *Circinaria gyrosa*

U. Böttger<sup>1</sup>, J. Meessen<sup>2</sup>, J. Martinez-Frias<sup>3</sup>, H.-W. Hübers<sup>1,4</sup>, F. Rull<sup>3</sup>, F. J. Sánchez<sup>5</sup>, R. de la Torre<sup>5</sup> and J.-P. de Vera<sup>1</sup>

<sup>1</sup>German Aerospace Center DLR e.V, Institute of Planetary Research, Rutherfordstr. 2, 12489 Berlin, Germany  
e-mail: ute.boettger@dlr.de

<sup>2</sup>Institut für Botanik, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstr.1, 40225-Düsseldorf, Germany

<sup>3</sup>Centro de Astrobiología (CSIC-INTA), Ctra. de Ajalvir km. 4, 28850-Torrejón de Ardoz, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Technische Universität Berlin, Institut für Optik und Atomare Physik, Hardenbergstr. 36, 10623 Berlin, Germany

<sup>5</sup>Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial (INTA), Ctra. de Ajalvir km. 4, 28850-Torrejón de Ardoz, Madrid, Spain

**Abstract:** In the context of astrobiological exposure and simulation experiments in the BIOMEX project, the lichen *Circinaria gyrosa* was investigated by Raman microspectroscopy. Owing to the symbiotic nature of lichens and their remarkable extremotolerance, *C. gyrosa* represents a valid model organism in recent and current astrobiological research. Biogenic compounds of *C. gyrosa* were studied that may serve as biomarkers in Raman assisted remote sensing missions, e.g. ExoMars. The surface as well as different internal layers of *C. gyrosa* have been characterized and data on the detectability and distribution of  $\beta$ -carotene, chitin and calcium oxalate monohydrate (whewellite) are presented in this study. Raman microspectroscopy was applied on natural samples and thin sections. Although calcium oxalates can also be formed by rare geological processes it may serve as a suitable biomarker for astrobiological investigations. In the model organism *C. gyrosa*, it forms extracellular crystalline deposits embedded in the intra-medullary space and its function is assumed to balance water uptake and gas exchange during the rare, moist to wet environmental periods that are physiologically favourable. This is a factor that was repeatedly demonstrated to be essential for extremotolerant lichens and other organisms. Depending on the decomposition processes of whewellite under extraterrestrial environmental conditions, it may not only serve as a biomarker of recent life, but also of past and fossilized organisms.

Received 13 May 2013, accepted 30 July 2013

**Key words:** biomarker, calcium oxalate, *Circinaria gyrosa*, Raman spectroscopy.

## Introduction

The search for former, extant or recent life on other celestial objects of our Solar system will be one of the priority goals of future planetary missions (Steele & Beatty). The answer to the question of the uniqueness of life on Earth will change mankind's view in all fields of science, philosophy and society and will be of the uttermost relevance for our perspective on bio-science. Since its characteristics and constraints are roughly unknown, the search for extraterrestrial life must be prepared very carefully. It is essential to know what to look for before flying to other planets, satellites and moons. Methodological diversity, objectiveness in interpretation and detailed background knowledge are crucial prerequisites for planning scientific experiments on future planetary missions in the Solar system. One astrobiological approach in reference to this question is to investigate the chemical, physiological and ecological characteristics of terrestrial extremotolerant and extremophile organisms with respect to their adaptations to predominant abiotic factors and harsh environmental conditions. Such studies will broaden our knowledge on the limits

and limitations of terrestrial life and thus may help to focus our efforts on the detection of life.

Several spaceflight and ground based experiments were already performed with colonies of (cyano-)bacteria, fungi and lichens that survived to a certain extent real space exposure or simulated space conditions and were able to recover their activity afterwards (de Vera *et al.* 2003, 2004a, b, 2010; de la Torre *et al.* 2004; de la Torre Noetzel *et al.* 2007, 2010; Sancho *et al.* 2007; Sancho 2009; Raggio *et al.* 2011; Onofri *et al.* 2012; Sánchez *et al.* 2012). The Biology and Mars Experiment (BIOMEX) is an international and interdisciplinary Low Earth Orbit (LEO) exposure experiment which will be performed on EXPOSE-R2 – the ESA exposure facility attached to the Russian Module Zvezda on the International Space Station (ISS). This facility is designed for the exposure of samples to vacuum, temperature, solar and cosmic radiation as well as the insolation regimen of the LEO (Rabbow *et al.* 2009, 2012; Cottin 2011; de Vera *et al.* 2012). The launch is scheduled for April 2014. The exposure duration is scheduled to be 1.5 years. BIOMEX focuses on two main objectives: (1) The first objective of BIOMEX is to investigate the resistance and

# Summary in English



# Study of the mechanisms of resistance of lichens to extreme environments relevant to outer space and planetary bodies.

## Structure

This doctoral thesis is divided in six main parts:

The **Introduction** (I) is an explanatory section where the conceptual framework of the research undertaken is depicted, together with the motivation that lead to the realization of the studies and experiments included in the thesis. The main objective of this part is to make the review process easier to the Assessment Committee, guiding them to a correct theoretical location.

In the **State of the art review** (II), we try to offer a summarized version of the research undertaken and of the knowledge gained to date with extremophile and extremotolerant lichens in relation with astrobiological research. Additionally an enumeration of the objectives described in the bibliography is described, providing an overall perspective of the topics that are currently attracting more attention and that are supposed to set the basis of this research line in the upcoming years.

In the **Research undertaken** (III) section, the hypotheses and objectives of the articles on which this thesis is based are listed, putting down in black and white the innovative aspects of this research and its justification. Other aspects related with the methods employed in the different experiments that were not included in the corresponding papers are included too, as it is thought that this information could be somehow enriching.

After the description of the most important aspects of the research undertaken, in the fourth section (**Copy of the scientific publications**, IV) the corresponding publications I, II, III and IV are included, being the bulk of this document. In each of them, it is possible to find a detailed description of the context, state of the art, material & methods, specific conclusions and discussion. In the publications III and IV there are results that correspond to other lichens species different from *R. geographicum* and *C. gyrosa* and accordingly, won't be taken in consideration.

The **Discussion and conclusions** (V) section is the most important one of the present document. It is in this part where the results are analyzed from an holistic point of view, taking into consideration the different issues encountered during the realization of this studies as well as the different questions still to be tackled in the short-term frame. A general compilation is done with all the conclusions (particular and general) that can be derived from the studies carried out and that have been published in the different papers included in this thesis.

Finally, in the **Annexes** (VI) it is possible to find a scientific publication related with the research topic of this doctoral thesis and in whose development the doctorand has actively participated, having been an important part of his training period.

## Introduction

### Astrobiology

Astrobiology is a relatively young discipline, with its formal origin in 1998 coupled with the foundation of the NASA Astrobiology Institute. This discipline does not only try to elucidate the key points about life's origin. It goes further and studies the evolution, influence and distribution of life on Earth. It also considers the possibility that other parts of the Universe are apt or have had the conditions to allow the existence of life.

The essential questions tackled by astrobiologists are: How did life appear on Earth? Which is the future of life on Earth and in the Universe? Does it exist or did it ever exist another life form in the Universe? If so, how could we be able to detect it? Taking into account the philosophical implications of these questions, the answers cannot only come from a single discipline. In fact, this is one of the main characteristics of astrobiology, its strong transdisciplinary character.

Among many other topics, astrobiology deals with the search of habitable environments, both in our Solar System and beyond. It also studies the capacity of different life forms to adapt to extreme conditions. In line with this objective, it has been studied with great interest the wide variety of extremophile and extremotolerant organisms, considering their possibilities to survive in extreme environments and even thrive in other parts of the Universe with different environmental conditions from those present on Earth.

The Panspermia hypothesis is located in the astrobiological framework. Proposed in 1865 by H. E. Richter and modified several times until the recent Lithopanspermia hypothesis, it proposes the possibility that different life forms (microorganisms, reproductive structures...) present in a meteorite could develop in other parts of the Universe under favourable conditions. Apart from some controversy, many efforts have been directed towards the study of the feasibility of an interplanetary transfer with not few positive results.

### Extremophile and extremotolerant organisms

An extremophile organism is the one that develops under extreme physical or geochemical conditions (those that are harmful for the majority of organisms on Earth). On the other side, the organisms that thrive under more moderate environments but are capable of resisting extreme environmental parameters during a determined period are known as extremotolerants.

After more than forty years of research, extremophile and extremotolerant organisms belonging to the three life domains (*Archaea*, *Bacteria* and *Eukarya*) have been discovered. This fact means that extremophiles are not restricted to simple life forms. On the contrary, a wide variety of these organisms exists in terms of complexity, from the simplest microorganisms to complex animals. The most common way to classify them is based on the parameter or parameters to which they present resistance.

These findings have attracted the attention of the scientific community and great efforts have been dedicated to deepen the understanding of the physiology of these life forms. Like this, since the discovery of these organisms it has been possible to the broaden the knowledge about life's limits and of life itself.

### Lichens

Lichens are mutualistic symbiotic organisms composed of a fungus which is intimately associated with a photosynthetic partner (an alga or a cyanobacteria or sometimes both). The result is an autotrophic form of life that uses carbohydrates produced by the photosynthetic partner to live and grow [35]. Despite being poikilohydric and poikilotherm organisms, from an evolutive point of view the lichen symbiosis was a complete success. Nowadays it is believed that approximately 17500 lichen species dominate about the 8% of the terrestrial surface, being able to colonize environments where no other living organism can live. From an ecological point of view, lichens could be considered as microecosystems because:

- They integrate the two main metabolic processes on Earth: autotrophy and heterotrophy.

- A single thallus incorporate two or three organisms that could pertain to three different biological kingdoms: Fungi (*Domain Eukarya*), Cyanobacteria (*Domain Bacteria*) and Plantae (*Domain Eukarya*).

There are many extremophile and extremotolerant lichen species due to their capacity to resist and even grow in extreme environments in terms of temperature, UV radiation and desiccation. In fact, some lichen species are considered as the most resistant eukaryotes to the extreme conditions of Earth.

It has been proposed that the extraordinary tolerance of lichens is based on different properties such as the presence of a thick cortex (upper pigmented layer) that acts as a shielding agent for the inner parts of the thallus. Another explanation is that the secondary lichen substances (parietin, carotene, melanin, usnic acid...) play some role in the extraordinary resistance detected together with the presence of extracellular polymeric substances. Finally, the fact that they are poikilohydric (they cannot regulate their water content) make them enter a latent state under harsh conditions that is characterized for being extremely resistant.

## Lichens and astrobiology

Lichens have been widely studied in astrobiology due to their high resistance to extremely harsh environments. A number of studies have been carried out in order to test the resistance of these organisms against the harsh spatial environment: LICHENS II onboard BIOPAN 5/FOTON M2 in 2005, LITHOPANSPERMIA and STONE in 2007 onboard BIOPAN6/FOTON M3 and LIFE (Lichens and Fungi Experiment) in 2008 onboard EXPOSE-E/EuTEF. In these studies, the lichen species *Rhizocarpon geographicum*, *Circinaria gyrosa* and *Xanthoria elegans* were used. The main objective of these experiments was to assess the survival capacity and adaptation degree of the previously cited lichen species to the conditions present at low Earth orbit altitude (500 km approximately from Earth's surface).

After the exposition to conditions such as wide temperature fluctuations (from -23°C to +60°C), high vacuum (of approximately  $10^{-6}$  Pa, causing extreme dehydration) and unfiltered solar & cosmic radiation; the results were surprisingly positive. The analyses performed after the first two experiments revealed a high survival level with vitality values similar to those registered before the flights. The third experiment, that involved an exposure of the samples to the spatial environment during a period of approximately 1.5 years, impaired drastically the viability of the samples.

## Objectives

### Paper I

In the first publication the response of the extremotolerant lichen *C. gyrosa* when exposed to different simulated martian conditions was studied with the help of a simulation chamber. The main objective was to assess the influence of the martian parameters (and of the space vacuum) on this extremotolerant lichen's physiology.

Specific objectives:

1. Assess the survival capacity of the eukaryotic symbiotic organism *C. gyrosa* under the influence of different combinations of simulated martian environmental parameters.
2. Study the limits and limitations in the tolerance and resistance of this extremotolerant lichen species to selected martian surface environmental conditions.
3. Broaden our knowledge about the physiological impact of Martian conditions on *C. gyrosa* in order to obtain further information about its resistance & tolerance mechanisms.
4. Confirm the positive survival results obtained in the LITHOPANSPERMIA experiment (section 2.2.2) with *C. gyrosa* after its exposure to LEO conditions.
5. Collect new experimental data about the plausibility of the last phase of the Lithopanspermia hypothesis.

## Paper II

This paper includes a study about the effect of a increasing series of UV-C irradiations (being the maximum dose applied equivalent to the level of radiation to be received in LEO during 67 days of exposure) upon the photobiont of two lichen species. The main objective was to assess the effect of UV-C radiation on the photobiont *Trebouxia* sp. of the extremotolerant lichen species *R. geographicum* and *C. gyrosa* under different experimental conditions: on the one hand comparing the effect of the physiological state of the thalli and on the other the effect of the presence/absence of protective structures/substances.

Specific objectives:

1. Assess the influence of UV-C radiation as single stressor upon *Trebouxia* sp., photobiont of *R. geographicum* and *C. gyrosa* while being part of the symbiotic partnership.
2. Confirm the role of the metabolic state of the thalli (active or inactive) in terms of damage avoidance capability.
3. Study the protective role of the cortex (*R. geographicum*) and of pigments (*C. gyrosa*) against UV-C radiation.
4. Deepen the understanding on the specific role of UVR tolerance in the overall resistance capacity of the lichen symbiosis.
5. Discuss the different astrobiological implications of the obtained results.

## Paper III

The third publication gathers the results of the LIFE experiment, that supposed the longest space-exposure experiment (1.5 years) carried out up to date with lichens. In that experiment, lichen samples of *Xanthoria elegans* and *Rhizocarpon geographicum* were subjected to the conditions present in LEO.

Specific objective:

- The LIFE experiment explained in the paper of **Onofri et al. 2012** had as main objective to assess the impact upon different microbial and lichenic communities of a long-term exposure under LEO conditions onboard the Columbus laboratory of the ISS. The idea was to collect new data in the frame of the research related with the Lithopanspermia hypothesis.

## Paper IV

In the paper of **Meeßen et al. 2013** the objective was the in-deep study of the morphological and anatomical characteristics of the five lichen species used up to date in astrobiological research because of their resistance and tolerance to the harsh conditions present in their natural environments: *Buellia frigida*, *Circinaria gyrosa*, *Rhizocarpon geographicum*, *Xanthoria elegans* and *Pleopsidium chlorophanum*.

Specific objective:

- Detect a possible tolerance mechanism to the parameters found in space related with their morphology and anatomy.

## Results

The results of the research performed in relation with extremophile and extremotolerant lichens in space, have shown that these organisms constitute a promising model for the study of life limits in space.

In the martian simulations explained in Paper I, after 120 hours of exposure to simulated but representative Mars atmosphere, temperature, pressure and UV conditions (and to space vacuum), an unaltered photosynthetic performance demonstrated high resistance of the lichen photobiont. In order to perform that assessment, the quantum yield efficiency of the PSII was measured by

fluorometry in order to determine the state of the photobiont. Some light-dependent gas exchange analyses were also performed to assess the overall state of the whole lichenic symbiosis. As it has been already noted, both analyses revealed a high resistance to the different combinations of simulated martian conditions (and of space vacuum) applied.

In the second paper two approaches were followed to assess the effect of the different UV-C doses upon *Trebouxia* sp. In the first place the PSII activity was measured in order to investigate the overall state of the photosynthetic process and the resilience of *Trebouxia* sp. Additionally, a HPLC quantification of four essential photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, chlorophyll *b*,  $\beta$ -carotene and lutein) was done on one sample of each species and dose, looking for a relation between the concentration of these pigments and the UV-C dose applied. The results of the UV-C irradiations gathered in Paper II indicate that the physiological state of the thallus is the most important factor impairing the tolerance of *Trebouxia* sp. to UV-C radiation in both lichen species. Desiccated thalli were demonstrated to be more resistant to UV-C. No clear influence of UV-C radiation on the carotenoid content was detected. Comparing the respective doses applied, the individuals of *R. geographicum* are more sensitive to UV-C radiation than the ones of *C. gyrosa*.

In summary, Papers I and II confirmed previous research and their initial hypotheses: high resistance to the three combinations of applied martian conditions (and to spatial vacuum too), as well as the influence of the physiological state of the thalli and other protective structures in relation with the tolerance to UV-C by *C. gyrosa* and *R. geographicum*.

The results obtained after the LIFE experiment (Paper III) are not enough to set any firm conclusion related with the plausibility of the Lithopanspermia hypothesis. This is based on the fact that despite the length of the space exposure was considerable higher than in previous attempts, the estimated span required for an interplanetary transfer is supposed to be of hundreds or thousands of years. In any case, it is proposed that endolithic microorganisms could have more chances of survival when compared with crustose lichens in that kind of transfer. This is because rocks and the rest of surrounding material could provide the endolithic inhabitants some shielding from unfiltered solar UV and cosmic radiation. Despite that, the results of the experiment showed that among the test samples included in EXPOSE-E, only the lichens displayed some degree of survivability after the long-term exposure.

Finally, in Paper IV all investigated lichens revealed a common heteromorous thallus structure, but diverging sets of morphological-anatomical traits. A major conclusion was set and it was that generalizations on morphologically conferred resistance have to be avoided. In the lichens on which we are interested two main characteristics were found:

- *R. geographicum*: the combination of pigmented cortex, algal arrangement, and mucilage seems to enhance resistance.
- *C. gyrosa*: the subcortex and the algal clustering seem to be crucial for the outstanding space-resistant features of this lichen species.

## Conclusions

As a summary, having in mind the shared aspects of the different experiments carried out and leaving apart the especific conclusions of each study, the following can be concluded about the research performed:

1. There is no single mechanism on which base the tolerance to short space (real or simulated) or simulated martian conditions.
2. It is for the first time demonstrated that the lichen species *Circinaria gyrosa* (an eukaryotic and symbiotic system) is able to tolerate different combinations of martian parameters. Among them, the most real simulation performed up to now upon these organisms is included, simulating atmospheric composition & pressure and UV radiation under a restrictive temperature.
3. The comparison of data obtained in our research after applying UV-C doses with previously obtained results, lead to an increase in the resistance limit to that stressor of *Trebouxia* sp., the photobiont of *R. geographicum* and *C. gyrosa*.





Noviembre de 2013