



---

# **Die Rolle der durch Austrocknung induzierten Grundfluoreszenzlöschung als Lichtschutzmechanismus in Grünalgen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Paul Christian Wieners  
Kiel, Dezember 2018



Erster Gutachter:	Prof. Dr. Wolfgang Bilger
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Rüdiger Schulz
Tag der mündlichen Prüfung:	<u>18.03.2019</u>
Zum Druck genehmigt:	<u>18.03.2019</u>

gez. \_\_\_\_\_, Dekan

---

Die Idee des Meeres ist in einem Wassertropfen vereint.

*Baruch de Spinoza 1632-1677*

---

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Die Definition von $q_{des}$ .....	1
1.2 Bei welchen Organismen tritt $q_{des}$ auf? .....	3
1.3 Der Zusammenhang zwischen Austrocknungstoleranz und $q_{des}$ .....	10
1.4 Mögliche Entsprechung von $q_{des}$ und NPQ und der Schutz vor Photoinhibition durch $q_{des}$ .....	10
1.5 Vergleich zwischen osmotischem Stress und Austrocknung im Hinblick auf $q_{des}$ .....	11
2. Fragestellungen .....	12
2.1 Hat $q_{des}$ wirklich eine Schutzwirkung gegen Photoinhibition? .....	12
2.2 Was beeinflusst $q_{des}$ ? .....	12
2.3 Welche Rolle spielt der Xanthophyll-Zyklus bei $q_{des}$ ? .....	16
2.4 Reagieren poikilohydre Algen auch auf osmotischen Stress mit einer dem $q_{des}$ entsprechenden Reduktion von $F_0$ und $F_V/F_M$ ? .....	17
3. Ergebnisse .....	19
3.1 Desiccation-induced non-radiative dissipation in isolated green lichen algae ..	19
3.2 Survey of the occurrence of desiccation-induced quenching of basal fluore scence in 28 species of green microalgae.....	34
3.3 The influence of Zn and I on growth and desiccation-induced chlorophyll fluorescence quenching of <i>Trebouxia asymmetrica</i> .....	52
3.4 The role of zeaxanthin in desiccation-induced quenching of chlorophyll fluorescence in the lichen photobiont <i>Trebouxia asymmetrica</i> .....	70
3.5 Vergleichbarkeit von osmotischem Stress mit durch Austrocknung an der Luft verursachtem Stress in Hinblick auf $q_{des}$ .....	93
4. Diskussion .....	99
4.1 Die Bestimmung von $q_{des}$ .....	99
4.2 $q_{des}$ ist ein Schutzmechanismus gegen Photoinhibition.....	100
4.3 Die Fähigkeit zu $q_{des}$ ist unter aeroterrestrischen Grünalgen weit verbreitet ..	101
4.4 Die Lichtbedingungen während des Wachstums haben einen großen Einfluss auf $q_{des}$ .....	101
4.5 Die Austrocknungsgeschwindigkeit ist für $q_{des}$ ein kritischer Faktor.....	102
4.6 Wirkung von Arabitol und Trehalose .....	104
4.7 Die Wirkung von Jod- und Zink-Ionen auf $q_{des}$ .....	105
4.8 Vergleich der Ergebnisse zu den vorgeschlagenen Modellen für $q_{des}$ .....	109
4.9 Diskussion der Ergebnisse in Hinblick auf eine mögliche Rolle des Xanthophyllzyklus bei der Entstehung von $q_{des}$ .....	114

4.10	Osmotischer Stress führt nicht zu einer dem $q_{des}$ vergleichbaren Reaktion, wohl aber auch zu einer Reduktion von $F_0$ und $F_v/F_M$ .....	118
4.11	Wachstumsraten unter verschieden starkem Wachstumslicht .....	120
5.	Ausblick .....	122
5.1	Der Wirkmechanismus von Jod und Zink auf die Entstehung von $q_{des}$ .....	122
5.2	Gaswechselfmessungen parallel zur Chlorophyllfluoreszenzmessung.....	123
5.3	Bestimmung des Wassergehalts der Proben/der Algen während der Experimente.....	123
5.4	Beobachtung des $q_{des}$ an einer einzelnen Zelle .....	124
5.5	Genauere Quantifizierung der Schutzwirkung des $q_{des}$ gegen Lichtstress ....	124
5.6	Experimente mit verschiedenen Lichtspektren .....	125
5.7	Weitere Versuchsorganismen.....	125
6.	Literaturverzeichnis.....	126
7.	Zusammenfassung / Abstract.....	138
8.	Anhang: Weitere im Rahmen der Promotion durchgeführte Forschungsarbeiten .....	139
8.1	Entwicklung mathematischer Modelle zu Quantifizierung der maximalen Wachstumsraten von Mikroalgen in Flüssigkultur.....	139
8.2	Fraßschutz-Wirkung sekundärer Flechteninhaltsstoffe bei <i>Hypogymnia physodes</i> .....	140
	Modelling lipid production in <i>Microchloropsis salina</i> .....	142
	Carbon-based secondary compounds in the lichen <i>Hypogymnia physodes</i> deter detritivorous woodlice.....	158
8.3	Literaturverzeichnis zum Anhang .....	168
	Modelling lipid production in <i>Microchloropsis salina</i>	
	Erklärung zur Dissertation .....	169





*Xanthoria parietina*



## 1. Einleitung

### 1.1 Die Definition von $q_{des}$

Das Thema dieser Arbeit ist die austrocknungsinduzierte Reduktion der Chlorophyllgrundfluoreszenz, desiccation-induced chlorophyll fluorescence quenching, kurz  $q_{des}$ , bei austrocknungstoleranten Grünalgen. Aus Verständnisgründen ist es notwendig, diesen für diese Arbeit zentralen Begriff zunächst etwas näher zu erläutern:

Die Chlorophyllfluoreszenz tritt auf, wenn Chlorophyllmoleküle Lichtenergie absorbieren. Wie bei allen physikalisch-chemischen Umwandlungsprozessen wird niemals ein Wirkungsgrad von 100% erreicht und auch die Photosynthese, genauer, die Weiterleitung der Energie der absorbierten Lichtquanten auf die Elektronentransportkette, bildet dabei keine Ausnahme (Lehninger et al. 1987). Ein Teil der aufgenommenen Energie wird in Wärme umgewandelt, ein weiterer Teil als Fluoreszenzlicht abgestrahlt (Krause and Weis 1984). Unter der Grundfluoreszenz  $F_0$  versteht man das Fluoreszenzlicht, das bei der Messung in einem Fluoreszenzmessgerät nach der Einstrahlung eines sehr schwachen Messlichts auftritt. Die mit dem Fluorimeter untersuchten Proben wurden vorverdunkelt und es wird davon ausgegangen, dass die Energie, die durch das Messlicht auf das Chlorophyll übertragen wird, die Reaktionszentren nicht erreicht. Daher geht man davon aus, dass zu diesem Zeitpunkt alle Reaktionszentren „offen“ sind und das als Elektronenakzeptor fungierende Plastochinon  $Q_A$  vollständig oxidiert vorliegt (Schreiber et al. 1986). Wird nun diese Grundfluoreszenz  $F_0$  während der Austrocknung bestimmter photosynthetisch

aktiver Organismen beobachtet, kommt es bei diesen zu einem Rückgang der Signalstärke (Lange et al. 1989a; Heber et al. 2000; Bilger 2014; Karsten et al. 2014; Maksimov et al. 2014; Raanan et al. 2016). Dies wird als austrocknungsinduzierte Reduktion der Grundfluoreszenz,  $q_{des}$ , bezeichnet. Bei den meisten photosynthetisch aktiven Organismen und bei allen Höheren Pflanzen geschieht dies nicht. Bei ihnen kommt es stattdessen zu einem Anstieg von  $F_0$  (Stuhlfauth et al. 1990; Bilger 2014).

Mit einem kurzen Sättigungsimpuls hoher Lichtstärke zusätzlich zu dem schwachen Messlicht können alle Photosystem II ( $P_{680}$ ) der Reaktionszentren „geschlossen“ werden. Nun liegen alle primären Elektronenakzeptoren in reduziertem Zustand vor und ein weiterer Elektronentransport ist kurzfristig nicht möglich. Da dadurch der Abfluss der absorbierten Lichtenergie durch die Elektronentransportkette verhindert wird, bleiben nur die strahlungslose Dissipation, also die Umwandlung in Wärme, und das Abstrahlen von Fluoreszenzlicht als mögliche Wege. So kommt es zu einem sprunghaften Anstieg der Stärke des Fluoreszenz-Signals. Dessen Maximum wird maximale Fluoreszenz,  $F_M$  genannt. Aus  $F_0$  und  $F_M$  lässt sich nun über  $(F_M - F_0) / F_M = F_V / F_M$ , die maximale Quantenausbeute, errechnen (Schreiber et al. 1986).

Während des Prozesses des  $q_{des}$  geht nicht nur die Grundfluoreszenz stark zurück, sondern auch  $F_V / F_M$  fällt auf Werte nahe Null. Bei Organismen, die kein  $q_{des}$  zeigen ist das nicht der Fall. Hier sinkt zwar die maximale Quantenausbeute während der Austrocknung stark ab, bleibt aber weiter messbar (Lange et al. 1989a; Heber et al. 2000; Bilger 2014).

Im ausgetrockneten und somit stoff-

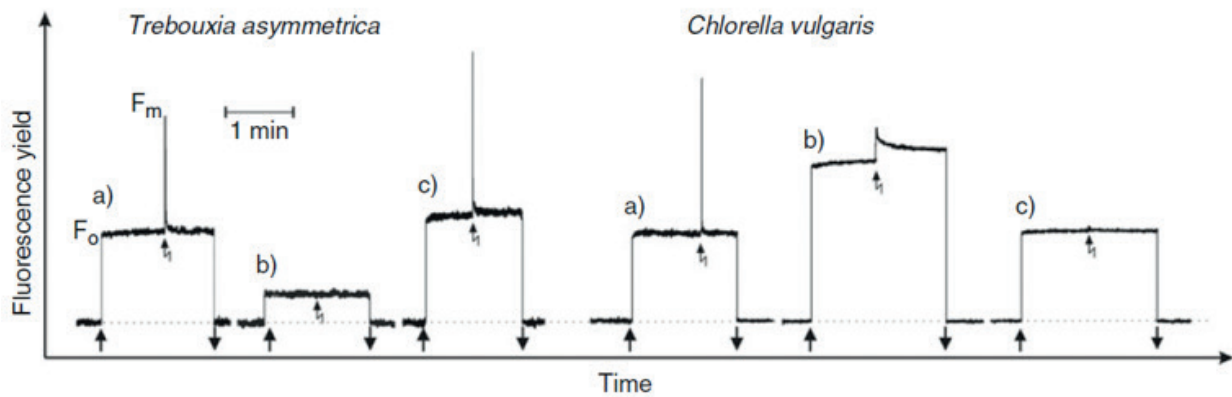


Abb. 1: Verlauf der  $F_0$  Signalstärke bei *Trebouxia asymmetrica*, einer austrocknungstoleranten Grünalge, und *Chlorella vulgaris*, einer austrocknungssensitiven Grünalge. Die Abbildung stellt den Verlauf von  $F_0$  vor der Austrocknung (a), im ausgetrockneten Zustand (b) und eine Stunde nach erneuter Hydrierung (c) dar. Die Pfeile am unteren Rand zeigen das An- bzw. Ausschalten des Messlichts. Zur Ermittlung der Maximalfluoreszenz  $F_M$  wurden Sättigungspulse gegeben (Blitze). Die Reduktion von  $F_0$  und der vollständige Verlust von  $F_V/F_M$  bei *T. asymmetrica* und der Anstieg von  $F_0$  mit weiterhin messbarem  $F_V/F_M$  bei *C. vulgaris* sind zu erkennen (Bilger 2014).

wechselinaktivem Zustand ist eine Weiterleitung der vom Chlorophyll absorbierten Lichtenergie über die Elektronentransportkette nicht mehr möglich, da dazu flüssiges Wasser unabdingbar ist. Folglich kann die Energie kontrolliert nur noch als Fluoreszenzlicht abgestrahlt oder über strahlungslose Dissipation in Wärme umgewandelt werden (Krause und Jahns 2004) oder aber unkontrolliert in diverse chemische Reaktionen, was zur Photoinhibition führt (s.u.). Daher ist es logisch, dass die Grundfluoreszenz von *Chlorella vulgaris* im ausgetrockneten Zustand höher ist als im stoffwechselaktiven Zustand mit funktionierender Elektronentransportkette. Auch ist so verständlich, dass weiterhin ein Sättigungsblitz zu einem Anstieg der Signalstärke der Fluoreszenz führt, da durch die zugeführte Lichtenergie weitere Chlorophyllmoleküle angeregt werden. Der langsame Abfall nach dem Sättigungslichtblitz zeigt, dass die PSII länger im angeregten Zustand verweilen als im stoffwechselaktiven Zustand, was auf eine ineffi-

ziente Ableitung der Anregungsenergie hinweist (Lange et al. 1989a; Heber et al. 2000; Bilger 2014).

Bei *Trebouxia asymmetrica* zeigt sich ein ganz anderes Bild: Hier fällt die Signalstärke der Grundfluoreszenz im ausgetrockneten Zustand im Vergleich zum hydrierten Zustand stark ab und auch ein Sättigungsblitz ist nicht mehr in der Lage, einen Anstieg der Stärke des Fluoreszenzsignals hervorzurufen. Wir sprechen in diesem Zusammenhang von  $q_{des}$ . Da die Energie, die das Chlorophyll durch Absorption von Lichtquanten aufnimmt, nur als Fluoreszenzlicht abgegeben oder der Elektronentransportkette zugeführt oder über strahlungslose Dissipation in Wärme umgewandelt werden kann, ist die einzige Erklärung für das Phänomen des  $q_{des}$ , dass die Geschwindigkeit mit der letzteres geschieht, so groß sein muss, dass trotz der durch die Austrocknung blockierten Elektronentransportkette, die Chlorophyllmoleküle nicht mehr lange genug im angeregten Zustand vorliegen, um

---

Fluoreszenzlicht abzustrahlen. Der Abfall von  $F_0$  im ausgetrockneten Zustand im Vergleich zum hydrierten stoffwechselaktiven Zustand zeigt, dass dieser Prozess ausgesprochen effektiv sein muss – effektiver als die Energieweiterleitung zur Elektronentransportkette und zur strahlungslosen Dissipation im hydrierten Zustand zusammengenommen. Selbst ein Sättigungslichtblitz vermag nicht länger einen Anstieg des Fluoreszenzsignals hervorzurufen, so rasch wird die Energie aus den PSII abgeleitet! (Heber et al. 2007a, 2010; Heber 2008; Yamakawa et al. 2012, 2018)

Besonders hervorzuheben ist allerdings der dritte Teil der Abbildung 1 (c): Bei *C. vulgaris* kommt es nach einer neuerlichen Hydrierung zu einem Abfall der Grundfluoreszenz und auch ein Sättigungslichtblitz kann keine variable Fluoreszenz mehr hervorrufen. *C. vulgaris* hat ihre Fähigkeit, Photosynthese zu betreiben, verloren und ist überdies tot. *T. asymmetrica* hingegen zeigt eine Stunde nach der neuerlichen Hydrierung einen Anstieg der Grundfluoreszenz und Photosyntheseaktivität. Diese Alge hat offensichtlich die Austrocknung überlebt und auch der Photosynthese-Apparat hat keine Schäden davongetragen! (Bilger 2014)

## 1.2 Bei welchen Organismen tritt $q_{des}$ auf?

Definitionsgemäß kann  $q_{des}$ , austrocknungsinduzierte Chlorophyllfluoreszenz-Löschung, nur bei der Austrocknung photosynthetisch aktiver Organismen beobachtet werden, auch wenn osmotischer Stress als weiterer, mit verringerter Wasserverfügbarkeit verbundener Umweltfaktor noch an späterer Stelle diskutiert werden wird.  $q_{des}$  wurde bislang bei Cyanobakterien, aeroter-

restrischen Grünalgen, den meisten Flechten und einigen Moosen, nicht aber bei Höheren Pflanzen beobachtet und tritt zusammen mit der Fähigkeit der Austrocknungstoleranz poikilohydrer photosynthetisch aktiver Organismen auf. Es gibt jedoch auch Ausnahmen: Bei der Untersuchung der wenigen poikilohydreren Höheren Pflanzen, wobei hier mit Höheren Pflanzen auch die Farngewächse mit eingeschlossen sind, wurde keine solche austrocknungsinduzierte Reduktion der Grundfluoreszenz beobachtet. Aus systematischer Sicht ist das Phänomen des  $q_{des}$  also extrem weit verbreitet, was aber erst dann offensichtlich wird, wenn man sich der Mannigfaltigkeit der verschiedenen Organismen, die sich hinter dem Begriff Alge verbirgt, erinnert: Er umfasst ebenso die prokaryotischen Cyanobakterien, die die oxygene Photosynthese entwickelt haben, wie auch die große Vielfalt an eukaryotischen Algen, die aus der primären Endosymbiose aber auch weiteren sekundären und tertiären Endosymbiosen sowie mehr als einer Milliarde Jahren fortgehender Evolution hervorgegangen sind (Nozaki et al. 2009; Adl et al. 2012). Die Pflanzen inklusive der Moose und Farne haben sich aus einer Untergruppe der Streptophyta entwickelt, sind also untereinander relativ dicht miteinander verwandt (Popper et al. 2011). Daher ist es wenig überraschend, dass die Unterschiede, die sich etwa im Rahmen molekularbiologischer Untersuchungen zeigen (Sun et al. 2016), selbst innerhalb der Grünalgen zum Teil ganz wesentlich größer sind als innerhalb der Pflanzen. Dies ist insbesondere bedeutsam, wenn man von Untersuchungen an Höheren Pflanzen oder aber auch nur einer anderen Gruppe von Grünalgen auf eine andere Gruppe von Grünalgen Rückschlüsse ziehen möchte.

---

Auch wenn man bei Algen in der Regel zunächst an aquatische Lebensräume denkt, so haben doch zahlreiche Vertreter verschiedener Gruppen, von den Cyanobakterien wie etwa *Nostoc* (Billi and Potts 2002) bis zu Grünalgen wie *Apatococcus* (Bertsch 1966a) auch das feste Land besiedelt. In diesem Zusammenhang spricht man von aeroterrestrischen Algen. Eine große Anzahl dieser aeroterrestrischen Algen ist austrocknungstolerant und zeigt auch  $q_{des}$  (Potts 1994, 2001; Potts et al. 2005; Raaan et al. 2016).

Einige dieser aeroterrestrischen Cyanobakterien und Grünalgen sind im Verlauf der Evolution eine Symbiose mit verschiedensten Pilzen eingegangen. Diese Symbioseorganismen nennen wir Flechten. Die Algenpartner dieser Symbiose werden Photobionten, die Pilzpartner Mycobionten genannt. Flechten stellen also eher einen bestimmten Lebensstil als eine systematische Gruppe dar (Honegger 1998; Lutzoni und Miadlikowska 2009; Ahmadijian 2012). Die Flechtensymbiose ist mehrfach unabhängig voneinander entstanden und schon die Pilze, an denen sich die Systematik dieser Organismen orientiert, sind paraphyletisch (Gargas et al. 1995; Lutzoni et al. 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde vor allen Dingen mit einer aus einer Flechte stammenden Grünalge, *Trebouxia asymmetrica*, gearbeitet, aber auch eine Reihe weiterer Photobionten untersucht, weswegen der Einfluss, den die Flechtensymbiose, bzw. deren Fehlen unter unseren experimentellen Bedingungen, diskutiert werden muss (Kosugi et al. 2009, 2013). Bis auf einige wenige Ausnahmen (Green et al. 1991) sind die meisten Flechten austrocknungstolerant und zeigen  $q_{des}$ . Bei den isolierten Photobionten sind die

Befunde in der Literatur nicht so eindeutig (Kosugi et al. 2009, 2013).

Auch wenn Moose nicht Gegenstand dieser Arbeit sind, so soll an dieser Stelle doch darauf hingewiesen werden, dass ihnen auf jeden Fall eine sehr basale Position innerhalb der Systematik der Embryophyta zukommt (Ruhfel et al. 2014; Gitzendanner et al. 2018). Zwar sind alle Moose poikilohydre Organismen, damit also der schwankenden Verfügbarkeit von Wasser in ihrer Umgebung ohne sonderlich effektive Möglichkeiten zur Aufrechterhaltung der Homöostase ausgeliefert (Duckett and Pressel 2018), aber im Gegensatz zu der überwiegenden Mehrzahl der Flechten sind viele Moose nicht austrocknungstolerant und somit auf dauerfeuchte Standorte beschränkt (Proctor et al. 2007). Das Phänomen des  $q_{des}$  beschränkt sich auf jene Moose, die auch Austrocknungstoleranz zeigen (Deltoro et al. 1998b; Heber et al. 2006; Wood 2007).

Tatsächlich existieren eine ganze Reihe von Höheren Pflanzen, die im Verlauf der Evolution die Fähigkeit erworben haben, selbst einen sehr hohen Wasserverlust zu tolerieren. *Selaginella lepidophylla* (Pampurova and Van Dijck 2014) oder *Haberlea rhodopensis* (Oliver et al. 2000; Georgieva et al. 2007) seien hier als Beispiele genannt. Wie schon eingangs erwähnt, konnte bei diesen Pflanzen jedoch nie  $q_{des}$  nachgewiesen werden (Strasser et al. 2010; Proctor 2010).

Schon die Verteilung des Auftretens von  $q_{des}$  und Austrocknungstoleranz in der Systematik suggeriert einen Zusammenhang zwischen diesen Phänomenen und der Evolutionsgeschichte von Cyanobakterien, Grünalgen, Flechten und Moosen.

### 1.3 Der Zusammenhang zwischen Austrocknungstoleranz und $q_{des}$

Die Folgen von Austrocknung und wie austrocknungstolerante Lebewesen diesen begegnen

Das Phänomen des  $q_{des}$  tritt bei austrocknungstoleranten Cyanobakterien, freilebenden Grünalgen und Photobionten, sowie bei einigen austrocknungstoleranten Moosen auf, was nahelegt, dass  $q_{des}$  in irgendeiner Weise mit der Fähigkeit Austrocknung zu tolerieren, verbunden ist. Mit dem Verlust an Wasser gehen zahlreiche Probleme einher (Alpert 2005, 2006; Holzinger and Karsten 2013):

Verlieren die Zellen Wasser so kommt es zur Plasmolyse, sofern die Zellwände den Kräften der Oberflächenspannung standhalten und nicht kollabieren. Beides hat erhebliche mechanische Schäden zur Folge. Ohne ausreichend Wasser kommt es zu Schäden an den Membranen, da das Zusammenspiel der hydrophilen und hydrophoben Bereiche der Phospholipide und anderer Membranbestandteile, das die Membran überhaupt zusammenhält, zusammenbricht. Proteine und andere Makromoleküle können ohne Wasser ihre räumliche Struktur nicht aufrechterhalten. Sie denaturieren und / oder aggregieren. Aufgrund von Beeinträchtigungen des Stoffwechsels kommt es zu einem massiven Anstieg an oxidativem Stress, der die Zelle schädigen kann. Überdies kann in Folge dessen oxidiertes Glutathion den Zelltod auslösen. Wassermangel kann zu einer Desintegration des Photosyntheseapparates führen. Während der Austrocknung kann es zu Maillard- und Fenton-Reaktionen kommen, die unter anderem auch die DNA

schädigen können. Im ausgetrockneten Zustand können sich weiterhin DNA-Schäden durch UV-Strahlung akkumulieren, da keine Reparatur mehr stattfinden kann. Ohne ausreichend Wasser kommt es unweigerlich zu einem Zusammenbruch des gesamten Stoffwechsels, da die Biochemie nun einmal vom Wasser unabdingbar abhängig ist. Und nicht zuletzt stellt die Photoinhibition eine nicht zu unterschätzende Gefahr für einen dehydrierten Photosynthese betreibenden Organismus dar. Auf die Schutzwirkung von  $q_{des}$  gerade gegen Photoinhibition wird an späterer Stelle ausführlich eingegangen.

Jede einzelne dieser Herausforderungen kann den Tod für den betroffenen Organismus bedeuten, so dass jede einzelne dieser Herausforderungen bewältigt werden muss. Dabei gibt es verschiedene Strategien, die sich im Laufe der Evolution zu diesem Zweck entwickelt haben.

Viele dieser Strategien beruhen darauf die Austrocknung zu vermeiden. So reduziert die Bildung von Kolonien, Biofilmen, Matten oder Krusten die Austrocknungsrate und zumindest die Algen unter der Oberfläche sind eine Zeitlang vor Wasserverlust (aber auch vor Strahlung) geschützt (Belnap 2003, 2006; de La Torre et al. 2010). Auch hydrophile Schleime und die Akkumulation von Osmolyten können den Wasserverlust der Zellen verlangsamen (Karsten et al. 2014; Colica et al. 2015). Letztlich ist auch die Entwicklung eines Kormophyten bei den Charophyta, der durch Wurzeln, Xylem, Cuticula und Stomata in der Lage ist auch an Land die Homöostase trotz geringerer Wasserverfügbarkeit in weiten Bereichen aufrecht zu erhalten, eine Strategie Austrocknung zu vermeiden (Kerrick and Crane 1997; Sperry 2003).

Andere Strategien beruhen hingegen

---

darauf Austrocknung zu tolerieren. In diesem Zusammenhang ist die Fähigkeit vieler Organismen zur Kryptobiose hervorzuheben (Alpert 2006). Im Zustand der Kryptobiose (Keilin 1959) sind alle Stoffwechselaktivitäten extrem stark reduziert, so dass etwa die Atmung kaum noch messbar ist. Der Metabolismus kommt praktisch zum Stillstand. In diesem Zustand latenten Lebens sind Organismen verblüffend widerstandsfähig gegen eine ganze Reihe von abiotischen Faktoren wie Hitze, Kälte, osmotischem Stress, ionisierender Strahlung und auch Dehydratation (De Vera et al. 2002; De Vera et al. 2004; De Vera 2005; Alekseev et al. 2007; Baranov et al. 2009; de La Torre et al. 2010). Die Bärtierchen (Tardigrada) sind die vielleicht prominentesten Beispiele für Kryptobiose (Wright 2001; Guidetti et al. 2011; Weronika and Łukasz 2017), aber dieses Phänomen ist sehr viel weiter verbreitet, insbesondere bei Bakterien und Protisten aber auch in allen anderen Reichen des Lebens (Neuman 2006; Singh et al. 2015; Cannone et al. 2017). Die genauen Mechanismen dieser bemerkenswerten Fähigkeit sind Gegenstand intensiver Forschung. Beim Übergang in einen kryptobiotischen Zustand müssen alle oben aufgelisteten durch Austrocknung hervorgerufenen Herausforderungen gelöst werden. Dabei spielen verschiedene Zucker, etwa Trehalose, Arabitol oder Sucrose eine bedeutende Rolle: Diese bilden eine glasartige Struktur im Inneren der Zelle und können zudem die Hydrathülle von Makromolekülen ersetzen und diese so stabilisieren (Fernández-Marín et al. 2013; Holzinger und Karsten 2013; Reichert et al. 2017). Jedoch ist es mehr als unwahrscheinlich, dass ausschließlich diese Zucker für die Austrocknungstoleranz verantwortlich sind, da damit nur ein

Teil der oben aufgeführten Probleme gelöst werden (Alpert 2005, 2006; Holzinger und Karsten 2013): So konnte auch eine vermehrte Synthese von Hitzeschockproteinen und IDPs (Intrinsically Disordered Proteins) sowie von Antioxidantien während der Austrocknung nachgewiesen werden.

Eine besondere Rolle bei der Kryptobiose kommt der Photosynthese, vor allem dem PSII zu, da unter Wassermangel die Verwundbarkeit des Organismus gegenüber Photoinhibition eigentlich massiv zunimmt, wie an späterer Stelle ausführlicher dargelegt werden wird. Viele austrocknungstolerante Photosynthese betreibende Organismen umgehen dieses Problem dadurch, dass sie etwa bei der Bildung von Akineten und Sporen zuvor das Chlorophyll abbauen bzw. ihre Blätter abwerfen (Verhoeven et al. 2017a). Eine andere Möglichkeit besteht darin, das PSII herunter zu regulieren und die vom Chlorophyll absorbierte Lichtenergie durch strahlungslose Dissipation in harmlose Wärme umzuwandeln, was mit einem Rückgang der Chlorophyllfluoreszenz einhergeht, also der Ausbildung von  $q_{des}$ . Die Erforschung dieses Phänomens stellt den Schwerpunkt dieser Arbeit dar.

## **Das Problem der Photoinhibition**

### Modelle der Photoinhibition

Für das Überleben von allen photosynthetisch aktiven Organismen ist der Schutz vor Photoinhibition von essenzieller Bedeutung. Licht ist essenziell für die Photosynthese, aber Licht beschädigt auch den Photosynthese-Apparat. Dies geschieht bei allen Lichtstärken, bei UV-Strahlung ebenso wie im sichtbaren Bereich des Spektrums (400-

---

700 nm), wobei UV-Strahlung bei gleicher Leistung pro Fläche deutlich mehr Schäden anrichtet (Takahashi et al. 2010). Davon ist vor allem das PSII betroffen. Ständig wandern beschädigte PSII von den Grana zu den Stroma der Thylakoiden, wo die defekten D1 Proteine des Reaktionszentrums gegen neue Kopien ausgetauscht werden, ehe die PSII wieder ihren Platz in den Grana einnehmen und wieder funktionale PSII Dimere bilden (Sass et al. 1997; Melis 1999; Kato und Sakamoto 2009). Generell verstehen wir unter Photoinhibition, wenn aus irgendeinem Grund die Reparatur dieser kontinuierlich auftretenden Schäden nicht mehr mit deren Entstehung Schritt halten kann, was an einem Abfall der Photosyntheserate zu beobachten ist. Die genauen Mechanismen, die der Photoinhibition zugrunde liegen, sind seit Jahrzehnten Gegenstand der Forschung – und der Debatte. Es gibt derzeit eine ganze Reihe von Hypothesen, wie diese Mechanismen aussehen könnten, die im Folgenden kurz zusammengefasst dargestellt werden sollen:

#### Charge recombination-induced Photoinhibition

Die Charge recombination-induced Photoinhibition –Hypothese setzt an der Akzeptorseite des Special Pairs im PSII an und geht davon aus, dass es durch einen Rückfluss von Elektronen vom primären Elektronenakzeptor Phaeophytin auf den Elektronendonator  $P_{680}$  zur Bildung eines  $P_{680}$  Triplets komme, das mit dem Sauerstoff am wasserspaltenden Komplex reagiere, wobei sich hoch reaktiver  $1O_2$  Singulett-Sauerstoff bilde, der durch Oxidation Schaden am PSII anrichte (Vass et al. 1992; Hideg et al. 1994;

Keren et al. 1995, 1997; Krieger et al. 1998; Adir et al. 2003; Cser und Vass 2007; Vass und Cser 2009).

#### Low Light Photoinhibition

Auch die Low Light Photoinhibition–Hypothese geht davon aus, dass der entscheidende Schritt der Photoinhibition auf der Akzeptorseite liege und versucht insbesondere das Auftreten von Photoinhibition unter Schwachlichtbedingungen zu erklären: Durch extrem kurze Lichtpulse werde nur ein einzelnes Elektron auf  $Q_A$  übertragen und nicht sofort ein weiteres Mal reduziert. Dadurch verlangsamt sich die Reduktion des Wasserspaltenden Komplexes, was die Zeit (und damit auch die Wahrscheinlichkeit) in der sich ein Chlorophyll-Triplett bilden könne, erhöhe. Dieses führe dann in der Folge zur Bildung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff (Keren et al. 1995, 1997, 2000; Krieger et al. 1998; Szilard et al. 2005; Ohad et al. 2011; Vass 2011).

#### Donor-side-photoinhibition

Davon, dass durch einen durch starke Lichteinstrahlung verursachten niedrigen pH-Wert im Thylakoid-Lumen Kalzium- und Chloridionen aus dem Wasserspaltenden Komplex gelöst werden, dieser dadurch funktionsuntüchtig wird und auf diese Weise nicht mehr in der Lage ist, dem PSII Elektronen zur Verfügung zu stellen, geht die Donor-side-photoinhibition-Hypothese aus. Unter diesen Umständen werde die Lebenszeit von  $P_{680}^+$ , einem extrem starken Oxidationsmittel, verlängert, was es wahrscheinlicher mache, dass es die Moleküle in seiner unmittelbaren Umgebung oxidiere und so

---

Photoinhibition auslöse (Krieger and Weis 1993; Jegerschöld and Styring 1996; Keren and Krieger Liszkay 2011; Ohad et al. 2011).

#### Mn-induced donor side photoinhibition

Einen ähnlichen Ansatz verfolgt auch die Mn-induced donor side photoinhibition-Hypothese. Hier besteht der postulierte Mechanismus darin, dass durch direkte Absorption von (kurzwelligem) Licht der  $Mn_4$ -Ca- $Cl_2$  Cluster des Wasserspaltenden Komplexes durch Herauslösung eines Manganatoms zerstört und somit der Elektronenfluss zum  $P_{680}+$  unterbrochen werde (Tyystjärvi et al. 1999; Hakala et al. 2005; Murata et al. 2007, 2012; Tyystjärvi 2008; Hakala Yatkin et al. 2011; Nishiyama et al. 2011)

#### Singulet-Oxygen-Hypothese

Einen von der Akzeptor- bzw. Donorseite unabhängigen Mechanismus der Photoinhibition schlägt die Singulet-Oxygen-Hypothese vor. Diese besagt, dass die Photoinhibition direkt durch Singulett-Sauerstoff verursacht werde, der photochemisch an Schwefel-Eisen-Zentren, Cytochromen (Jung and Kim 1990) oder an nicht an Antennenkomplexe gebundene Chlorophyllmolekülen entstehe (Tyystjärvi et al. 1999; Santabarbara et al. 2001).

Diese Auflistung von vorgeschlagenen Mechanismen für die Photoinhibition erhebt nicht den Anspruch auf Vollständigkeit und natürlich schließen sich die vorgeschlagenen Modelle auch nicht unbedingt gegenseitig aus: Es ist durchaus wahrscheinlich, dass der Photosynthese-Apparat gleichzeitig oder aber unter unterschiedlichen Bedingungen, wie etwa der Wellenlänge des

Lichts oder dessen Stärke, auf verschiedene Weisen geschädigt werden kann.

Unter natürlichen Bedingungen tritt die Photoinhibition vor allem in Erscheinung, wenn der Lichtsättigungspunkt durch die Beleuchtungsstärke deutlich überschritten wird (siehe Charge recombination-induced Photoinhibition). Dann kommt es zu einer Hemmung der Photosynthese, was durch einen Rückgang an  $F_V/F_M$  (durch eine Verringerung der Zahl offener Reaktionszentren) und einen Rückgang der durch Gaswechselformel ermittelbaren Photosyntheserate gekennzeichnet ist.  $F_V/F_M$  wird nach ausreichender Vorverdunklung gemessen, um das photochemische Quenching abzubauen und die tatsächlich mögliche Elektronentransportrate zu messen. Gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg der Grundfluoreszenz  $F_0$ , da sich mehr Chlorophyllmoleküle des PSII gleichzeitig in einem angeregten Zustand befinden.

Bei Wassermangel ist kein Starklicht erforderlich um Photoinhibition auszulösen. Wie oben erläutert, ist das gestörte Gleichgewicht zwischen Licht-Reaktion und Dunkel-Reaktion zu Ungunsten der Dunkel-Reaktion bei den vorgeschlagenen Akzeptor-Seite basierenden Mechanismen der Photoinhibition entscheidend. Wird der Elektronentransport gehemmt, wie etwa durch Wassermangel, reicht weniger absorbierte Lichtenergie aus, um das Photosystem II zu übersättigen und so zur Photoinhibition zu führen, bis schließlich ohne funktionierenden Elektronentransport alles vom Chlorophyll absorbierte Licht als exzessives Licht betrachtet werden kann und Schaden verursachen würde.

Der Zustand der Kryptobiose, insbesondere der der Anhydrobiose, unterbindet den



---

Elektronentransport, der auf das Vorhandensein von flüssigem Wasser angewiesen ist. Daher stellt für einen Photosynthese betreibenden Organismus die Photoinhibition im Zustand latenten Lebens ein schwerwiegendes Problem dar:

Jedwedes vom Chlorophyll absorbiertes Licht wird im stoffwechselinaktiven Zustand zwangsläufig zu potentiell schädigendem exzessivem Licht.

### **NPQ und Xanthophyllzyklus**

Photosynthetisch aktive Organismen wie Algen und Pflanzen sind der Photoinhibition aber nicht schutzlos ausgeliefert. Neben anderen Schutzmaßnahmen wie der Ausbildung von Screening-Pigmenten (Solovchenko und Merzlyak 2008) und / oder antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffen (Gill and Tuteja 2010), zyklischem Elektronentransport (Yamori and Shikanai 2016) und der Photorespiration (Demmig-Adams and Adams III 1992; Wingler et al. 2000) kommt beim Schutz vor Photoinhibition vor allem der strahlungslosen Dissipation der absorbierten Lichtenergie eine wichtige Bedeutung zu (Non-Photochemical-Quenching, kurz NPQ). Durch NPQ wird die absorbierte Lichtenergie auf kontrollierte Weise in Wärme umgewandelt (Leunenberger et al. 2017).

NPQ stellt ein grundlegendes Prinzip als Schutz vor exzessivem Licht bei allen Photosynthese betreibenden Eukaryoten und Cyanobakterien da (Niyogi und Truong 2013; Demmig-Adams et al. 2014). Grundsätzlich beruht es auf Konformationsänderungen der Proteine der Antennenkomplexe, die durch spezifische Proteine, die als Sensoren für den pH-Wert im Thylakoid-Lumen oder als Lichtsensoren fungieren, reguliert wer-

den. Bei Grünalgen, Moosen und Höheren Pflanzen scheinen viele dieser Prozesse mit dem Xanthophyll-Zyklus verbunden zu sein (Demmig-Adams et al. 2012). Wie genau dieser Mechanismus auf molekularer Ebene aussieht ist nach wie vor Gegenstand der Diskussion (Kress and Jahns 2017).

Auch wenn die Rolle des Xanthophyll-Zyklus bei der Entstehung des NPQ noch nicht vollständig mechanistisch verstanden ist, so deutet doch vieles darauf hin, dass dem Vorhandensein von Zeaxanthin und dessen Verhältnis zu den anderen Xanthophyllen des Violaxanthin-Zyklus erhebliche Bedeutung zukommt (Demmig-Adams et al. 2012). Dabei ist die Abhängigkeit des Systems aus Violaxanthindeepoxidase (VDE) und Zeaxanthinepoxidase (ZE) vom pH-Wert besonders hervorzuheben, der von der Aktivität der Licht- und Dunkelreaktionen der Photosynthese und somit von der Lichtsättigung abhängt und als Regelmechanismus des NPQ interpretiert werden kann: Eine hohe Lichtsättigung führt zu einem niedrigen pH-Wert im Thylakoidlumen und dieser wiederum zu einer Umwandlung von Violaxanthin über Antheraxanthin zu Zeaxanthin, während eine niedrige Lichtsättigung zu der Umkehrung dieses Vorgangs führt (Li et al. 2002). Zeaxanthin kommt neben seiner Rolle bei der Bildung des NPQ auch noch eine Schutzfunktion gegen Photoinhibition als Antioxidans in der Thylakoid-Membran zu, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll (Havaux et al. 2007).

Man unterscheidet verschiedene Zustände des NPQ, die sich nach verschieden langer Zeit exzessiven Lichtes bilden und denen verschiedene Mechanismen zugrunde liegen, bei denen aber stets Zeaxanthin beteiligt ist. Nach 10-200 s wird  $qE$  erreicht,

nach 10-30 min  $q_Z$  und nach mehr als 30 min  $q_I$ . Für die sehr rasche Formation von  $q_E$  ist ein niedriger pH-Wert, die Konzentration an Zeaxanthin und, bei Höheren Pflanzen, das Protein PsbS, entscheidend. Fehlt PsbS kommt es zwar dennoch zu  $q_E$ , aber nur wenn der pH-Wert niedrig genug dazu ist (Roach and Krieger-Liszkay 2012), was für eine katalytische Funktion des PsbS-Proteins bei der Bildung von  $q_E$  spricht. Bei Moosen ist neben PsbS auch noch das LHCSR-Protein (Light-Harvesting Complex Stress Related Protein) vorhanden, dem eine ähnliche Funktion zukommt und bei dem gezeigt werden konnte, dass es an Zeaxanthin binden kann (Pinnola et al. 2013). Bei Grünalgen fehlt das PsbS-Protein und es ist nur LHCSR vorhanden (Niyogi and Truong 2013). Für die Bildung des Zustandes  $q_Z$  ist vor allem die Konzentration an Zeaxanthin entscheidend, dem pH-Wert kommt dabei eine untergeordnete Rolle zu. Die Faktoren, die für das Entstehen des langsamsten NPQ-Zustandes  $q_I$  relevant sind, sind derzeit noch unklar, aber es wird vermutet, dass auch hier Zeaxanthin und der pH-Wert eine Rolle spielen. Auch wenn der genaue Mechanismus, durch den Zeaxanthin in der Lage ist, überschüssige Energie vom PSII abzuleiten, nicht bekannt ist, so ist es doch höchst wahrscheinlich, dass die auf das Zeaxanthin-Molekül einmal übertragene Anregungsenergie zu einem Schwingen des Moleküls führt, die diese letztlich in Wärme umwandelt und so unschädlich macht. Alle drei Prozesse zusammen erlauben es dem Photosynthese betreibenden Organismus, die Aktivität des PSII fein reguliert auf die Gegebenheiten von (schwankenden) Lichtintensitäten und der Kapazität der Dunkel-Reaktion anzupassen, um so Photoinhibition in

einem weiten Bereich zu vermeiden (Horton et al. 1996; Niyogi 2000; Müller et al. 2001; Horton und Ruban 2004; Krause und Jahns 2004; Baker 2008; Ruban et al. 2012; Kress and Jahns 2017).

In diesem Zusammenhang ist es wichtig darauf aufmerksam zu machen, dass die oben beschriebenen auf Zeaxanthin beruhenden Prozesse des NPQ zum allergrößten Teil an stoffwechselaktiven Organismen erforscht wurden und vor allem die Anpassung eben solcher an wechselndes und/oder starkes Licht beschreiben. In welchem Umfang diese auch auf poikilohydre, aeroterrestrische Algen und das Phänomen des  $q_{des}$  übertragen werden können ist unter Diskussion und Gegenstand dieser Arbeit.

#### 1.4 Mögliche Entsprechung von $q_{des}$ und NPQ und der Schutz vor Photoinhibition durch $q_{des}$

Bei austrocknungstoleranten Cyanobakterien, Grünalgen, Flechten und Moosen kann bei Austrocknung ein massiver Rückgang der Grundfluoreszenz bei einem gleichzeitigen totalen Verlust der variablen Fluoreszenz beobachtet werden. Dieses Phänomen wird als  $q_{des}$  bezeichnet.

Austrocknung verursacht eine ganze Reihe von schwerwiegenden Problemen für einen Organismus, Austrocknungstoleranz setzt also auch eine ganze Reihe von (überlebensnotwendigen) Anpassungen voraus.

Eines der sich aus der Austrocknung ergebenden Probleme ist die gesteigerte Anfälligkeit für Photoinhibition, da im austrockneten und somit stoffwechselinaktiven Zustand kein Elektronentransport mehr möglich ist. Es sollte also zu einer massiv verstärkten durch Limitation der Akzep-

---

tor-Seite verursachten Photoinhibition (Charge recombination-induced Photoinhibition) kommen.

Dies ist jedoch überraschenderweise nicht der Fall: Tatsächlich sind viele austrocknungstolerante Algen, Flechten und Moose erstaunlich widerstandsfähig gegen exzessives Licht.

NPQ ist ein sehr weit verbreiteter Schutzmechanismus gegen durch exzessives Licht verursachte Photoinhibition. Bei der Entstehung von NPQ spielt Zeaxanthin eine bedeutende Schlüsselrolle. Allerdings wurde NPQ lediglich bei stoffwechselaktiven Organismen beobachtet.

Es wird angenommen, dass auch  $q_{des}$  eine Funktion als Schutzmechanismus gegen Photoinhibition durch exzessives Licht hat und eine Erklärung für die erstaunliche Widerstandsfähigkeit von aeroterrestrischen Algen, Flechten und Moosen sein könnte (Heber et al. 2007a, 2010; Heber 2008; Yamakawa et al. 2012, 2018).

Es wäre plausibel bei diesem Phänomen einen ähnlichen Mechanismus wie beim NPQ im stoffwechselaktiven Zustand zu vermuten, zumal Grünalgen und Moose auch über den Xanthophyll-Zyklus verfügen (Demmig-Adams 1990; Demmig-Adams et al. 1990a, b; Adams et al. 1993; Calatayud et al. 1997; Fernández-Marín et al. 2010a).

Wenn bei der Entstehung von  $q_{des}$  aber die gleichen Mechanismen wirksam wären, die für die Entstehung des NPQ bekannt sind, so müsste auch  $q_{des}$  von der Konzentration von Zeaxanthin in den Chloroplasten abhängen. Diese wiederum wird durch die pH-abhängige Aktivität der VDE geregelt. Der pH-Wert innerhalb der Thylakoide ist von der Effektivität der Photosynthese abhängig und sollte nur bei Licht weit genug

abfallen, um die Synthese von Zeaxanthin auszulösen.

Wenn nun  $q_{des}$  die gleichen Mechanismen zugrunde lägen wie NPQ, so sollte  $q_{des}$  nicht bei einer Austrocknung im Dunkeln stattfinden können. Tatsächlich ist unter diesen Bedingungen  $q_{des}$  bei Flechten schwächer, beträgt aber etwa bei *Cladonia* sp. immer noch rund 50% des  $q_{des}$ , der bei einer Austrocknung im Licht zu beobachten ist (Heber 2008).

Daraus folgt, dass entweder die Synthese von Zeaxanthin auch im Dunkeln möglich ist (Fernández-Marín et al. 2009, 2010a, 2011b, a) oder aber dass der Entstehung des  $q_{des}$  andere Mechanismen zugrunde liegen als der Entstehung des NPQ (Heber et al. 2007a, 2010; Heber 2008; Yamakawa et al. 2012, 2018).

### 1.5 Vergleich zwischen osmotischem Stress und Austrocknung im Hinblick auf $q_{des}$

Sowohl osmotischer Stress als auch Austrocknung an der Luft gehen mit massivem Wasserverlust in der Zelle einher. Beide abiotische Stressfaktoren beeinträchtigen den gesamten Metabolismus und somit auch die Photosynthese und sind für einen Organismus potentiell tödlich. Und in beiden Fällen reagieren an diese Stressfaktoren angepasste Organismen oft durch den Übergang in einen kryptobiotischen Zustand, um diesen Stress zu überdauern (Wright 2001; Billi and Potts 2002). Es ist naheliegend anzunehmen, dass auch bei osmotischem Stress die Photoinhibition ein wesentliches Problem darstellen sollte, wie auch eine Reihe von Arbeiten für verschiedene Organismen zeigen konnten (Kaiser and Heber 1981; Allakhverdiev et al. 2000; Chaves et

al. 2009) und ebenso naheliegend, dass es gegen diese durch osmotischen Stress verursachte Photoinhibition Schutzmechanismen geben könne, die dem  $q_{des}$  bei Austrocknung entsprechen, vielleicht sogar mechanistisch mit diesem identisch sind. Aber es gibt auch erhebliche Unterschiede zwischen osmotischem Stress und Stress durch Austrocknung an der Luft (Zhu 2001; Farooq et al. 2009), so wie es auch Unterschiede zwischen Austrocknung und Stress durch Kälte gibt, auch wenn beide abiotische Stressfaktoren die Verfügbarkeit von für den Metabolismus notwendigen flüssigen Wasser herabsetzen und die Sensitivität gegen Photoinhibition erhöhen (Gururani et al. 2015; Verhoeven et al. 2017b): Gegen Austrocknung tolerante Organismen sind nicht notwendig auch tolerant gegen Kälte und anders herum (Verhoeven et al. 2017b; Fernández Marín et al. 2018).

Inwieweit sich diese Unterschiede zwischen osmotischem Stress und dem Stress durch Austrocknung an der Luft auch auf potentielle Schutzmechanismen gegen Photoinhibition wie  $q_{des}$  auswirken, war unklar, ebenso, ob unter osmotischen Stress und dem damit verbundenen Verlust an Wasser austrocknungstolerante aeroterrestrische Grünalgen auch mit  $q_{des}$  reagieren.

## 2. Fragestellungen

Aus den Beobachtungen an Flechten und freilebenden aeroterrestrischen Algen, die einen Zusammenhang zwischen Austrocknungstoleranz und dem Auftreten von  $q_{des}$  nahelegen und aus dem, was man über die Photoinhibition und die Rolle von NPQ vor allem bei Höheren Pflanzen weiß, ergeben sich nun eine ganze Reihe von Fragen, zu deren Beantwortung mit dieser Arbeit

beitragen werden soll:

### 2.1 Hat $q_{des}$ wirklich eine Schutzwirkung gegen Photoinhibition?

Auch wenn es aufgrund der theoretischen Überlegungen, wie Charge recombination-induced Photoinhibition entsteht und dass der beobachtete  $q_{des}$  bei aeroterrestrischen Algen, Flechten und Moosen nur durch einen raschen Abfluss der Anregungsenergie aus dem PSII erklärbar ist und somit eine Schutzwirkung des  $q_{des}$  vor Photoinhibition nahe liegt, so war es doch auf jeden Fall notwendig, zu überprüfen, inwieweit  $q_{des}$  tatsächlich eine Schutzwirkung gegen Photoinhibition im ausgetrockneten, stoffwechselinaktiven Zustand aeroterrestrischer Algen bietet. Dazu wurden Experimente mit *Coccomyxa* sp (SAG 49.84), *Trebouxia asymmetrica* (SAG 48.88) und, als Referenz, *Chlorella vulgaris* (SAG 211-19) angestellt.

Siehe dazu Kapitel 3.1.

### 2.2 Was beeinflusst $q_{des}$ ?

Die Frage, mit der sich diese Arbeit am intensivsten auseinandergesetzt hat war ohne Zweifel die nach den Faktoren, die  $q_{des}$ , dessen Auftreten und dessen Stärke, beeinflussen. Auch wenn dies auf den ersten Blick eher deskriptiv erscheint (und auch ein gutes Stück weit ist) stellt die Beantwortung dieser Frage doch letztendlich die Voraussetzung dazu dar, weiterführende Fragen etwa zu Funktion und Mechanismus von  $q_{des}$  zu stellen und beantworten zu können. Außerdem muss man zunächst einmal in der Lage sein, das Auftreten des zu untersuchende Phänomens kontrolliert herbeizuführen, um es überhaupt untersuchen zu können. Dies scheint

---

trivial zu sein, wie sich aber im Rahmen dieser Arbeit zeigte, ist das bei  $q_{des}$  ganz und gar nicht der Fall.

Welchen Einfluss hat die Kultur in flüssigem Medium?

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mikroalgen wurden in flüssigen Medien kultiviert, nicht nur während der Experimente, sondern schon zum Teil seit vielen Jahren. Die Algen waren also seit zahllosen Generationen keinem Trockenstress mehr ausgesetzt. Im Fall der isolierten Flechten-Photobionten kam noch hinzu, dass unter diesen Kulturbedingungen auch noch der Einfluss des Symbiosepartners fehlt, dem in der Literatur eine entscheidende Rolle für die Entstehung von  $q_{des}$  zugesprochen wird (Kosugi et al. 2013). Es war daher nicht selbstverständlich, dass die von uns untersuchten aeroterrestrischen Algen überhaupt noch zu Austrocknungstoleranz oder  $q_{des}$  in der Lage sein würden.

*Siehe dazu Kapitel 3.1 und 3.2.*

Wie artspezifisch ist  $q_{des}$ ?

Die Vielfalt innerhalb der Grünalgen ist, wie schon eingangs erläutert, immens. Dies gilt auch für die zahllosen aeroterrestrischen Arten, die eher durch ihre ökologische Nische verbunden sind als durch ihre phylogenetische Abstammung, und selbst innerhalb der Gattung *Trebouxia* sind die genetischen Unterschiede beträchtlich größer als innerhalb einer Gattung der Höheren Pflanzen (Niyogi and Truong 2013; Sun et al. 2016).

Es war unklar, wie verbreitet die Fähigkeit zu  $q_{des}$  bei Grünalgen eigentlich genau ist. Stellt  $q_{des}$  einen Sonderfall bei einigen we-

nigen Arten dar oder aber ist die Fähigkeit dazu unter aeroterrestrischen Algen, oder vielleicht sogar über diese hinaus, weit verbreitet?

Viele der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Algen sind unter natürlichen Bedingungen Teil einer Flechten-Symbiose und zum Teil ist hoch umstritten, ob sie in der Natur jemals außerhalb einer solchen auftreten oder nicht (Tschermak-Woess 1978; Bubrick et al. 1984; Ahmadjian 1988; Mukhtar et al. 1994). Von Flechten ist bekannt, dass die überwiegende Zahl der daraufhin untersuchten Arten eine durch Austrocknung induzierbare Reduktion der Chlorophyll-Grundfluoreszenz zeigen (Lange et al. 1989b; Demmig-Adams et al. 1990a, b; Calatayud et al. 1997; Heber et al. 2007b, 2010; Veerman et al. 2007; Komura et al. 2010; Maksimov et al. 2014). Bei isolierten Photobionten ist dies durchaus umstritten, selbst wenn man die sich durch die Kulturbedingungen ergebenden Faktoren außen vor lässt (s.o.).

Da  $q_{des}$  nur eine von vielen für die Austrocknungstoleranz (überlebens-)notwendigen Anpassungen sein könnte, deren Relevanz zudem weiterhin nicht ganz klar ist, wäre es durchaus zu erwarten, dass es austrocknungstolerante Grünalgen geben könnte, die kein  $q_{des}$  zeigen oder aber auch nicht austrocknungstolerante Arten, die sehr wohl zu  $q_{des}$  in der Lage sind. Insbesondere in Hinblick auf die Möglichkeit, dass der Mechanismus, der  $q_{des}$  verursacht, dem des NPQ entspricht, wäre dies durchaus plausibel.

Um diese Fragen beantworten zu können ist die Untersuchung einer größeren Zahl aeroterrestrischer Grünalgenarten, isolierter Photobionten wie freilebender, aber auch aquatischer Arten im Vergleich notwendig. *Siehe dazu Kapitel 3.2.*

---

Welchen Einfluss haben die Lichtbedingungen während des Wachstums?

Einer der für Mikroalgen, wie auch für alle anderen photoautotrophen Organismen, entscheidende abiotische Faktor ist das Licht. Einerseits stellt es natürlich die dominante Energiequelle für Mikroalgen dar, auch wenn viele Arten durchaus auch mixotroph sind und sich etwa *C. vulgaris* gut mit einem Glucose-haltigem Nährmedium in Dunkelheit kultivieren lässt (Liang et al. 2009). Andererseits stellt es auch einen wesentlichen abiotischen Stressfaktor dar. Dies gilt nicht nur für kurzweilige UV-Strahlung, sondern auch für den sichtbaren Spektralanteil (siehe Modelle der Photoinhibition).

Da postuliert wurde, dass  $q_{des}$  ein Schutzmechanismus gegen Lichtstress sei, ist es naheliegend die Frage zu stellen, inwieweit verschiedene Lichtintensitäten während des Wachstums der Algen einen Einfluss auf die Stärke von  $q_{des}$  haben. Insbesondere die Rolle, die dem Xanthophyll-Zyklus bei der Ausbildung von NPQ zukommt und dessen mögliche Verbindung auch zum Phänomen des  $q_{des}$  bei austrocknungstoleranten Algen machen diese Fragestellung nahezu zwingend.

Darüber hinaus war es von erheblichem Interesse, die maximalen Wachstumsraten verschiedener Algen, *T. asymmetrica* als „typischer“ Flechten-Alge, *C. vulgaris* als aquatischer Frischwasser-Alge und *M. salina*, einer marinen Alge, von der bekannt ist, dass sie hohe Lichtintensitäten in Wachstum umzusetzen vermag, bei verschieden starker Beleuchtung während der Kultur miteinander zu vergleichen und insbesondere Vorstellungen davon zu bekommen, in welchem Ausmaß sich *T. asymmetrica* verschiedenen

Wachstumslichtintensitäten über einen längeren Zeitraum hinweg anzupassen vermag. Dies ist von Bedeutung, um die ökologische Plastizität dieser Alge und damit auch ein Stück weit die Flechtensymbiose besser zu verstehen. Allerdings stehen diese Fragestellungen etwas außerhalb des zentralen Themas dieser Arbeit, der Rolle von  $q_{des}$  als Schutz gegen Lichtstress, und werden daher auch nur am Rande erwähnt.

*Siehe dazu Kapitel 3.4.*

Welchen Einfluss haben Jod und Zink Ionen?

Die zufällige Beobachtung, dass ein bestimmter Flüssigdünger (COMPO Blumen- und Terrassenpflanzen, Compo GmbH, Münster, Deutschland) die Fähigkeit von *T. asymmetrica*  $q_{des}$  zu zeigen deutlich verstärkt und dass sich herausstellte, dass dies letztlich auf das in diesem Dünger enthaltene Jod und Zink marinen Ursprungs zurückzuführen ist, wirft nicht nur Fragen auf, wie die Wirkung von Jod und Zink auf  $q_{des}$  zustande kommt, sondern eröffnet auch zusätzliche experimentelle Möglichkeiten zur Manipulation von  $q_{des}$ .

Um dies tun zu können muss aber zunächst der Effekt von Jod und Zink auf den bei *T. asymmetrica* auftretenden  $q_{des}$  quantifiziert werden, sowohl was dessen Stärke als auch was dessen Kinetik betrifft, um die zufälligen Beobachtungen zu verifizieren und zu zeigen, dass Jod und Zink tatsächlich einen unter kontrollierten Bedingungen reproduzierbaren Effekt auf  $q_{des}$  haben. Die Abhängigkeit dieses Effektes von der Konzentration von Jod- und Zink-Ionen und von der Relation dieser zueinander muss be-

stimmt werden, auch um zu klären, ob eine echte Interaktion dieser beiden Substanzen vorliegt oder aber ob es voneinander unabhängige Wirkungen auf *T. asymmetrica* gibt. Eine nächste, wesentliche auch mit anderen  $q_{des}$  beeinflussenden Faktoren, vor allem der Austrocknungsgeschwindigkeit, zusammenhängende Frage, ist die nach dem möglichen Einfluss von Jod- und Zink-Ionen auf die Kinetik des Prozesses, der zu  $q_{des}$  führt und ob Jod- und Zink-Ionen einen Einfluss auf die Geschwindigkeit oder Dauer der Ausbildung von  $q_{des}$  bei *T. asymmetrica* haben.

*Siehe Kapitel 3.1 und 3.3.*

Welche Rolle spielt die Austrocknungsgeschwindigkeit bei der Entstehung von  $q_{des}$ ?

Die Geschwindigkeit, mit der ein abiotischer Stressfaktor auf einen Organismus einwirkt, hat einen erheblichen Einfluss darauf, inwieweit dieser in der Lage ist, auf diesen zu reagieren. Daher ist es naheliegend, dass die Austrocknungsgeschwindigkeit einen erheblichen Einfluss auf die der Austrocknungstoleranz dienenden physiologischen Prozesse haben sollte, zu denen, der Ausgangshypothese folgend, auch die Ausbildung von  $q_{des}$  zählt. Daraus ergeben sich eine Reihe von Fragestellungen: Wie wirken sich verschiedene Austrocknungsgeschwindigkeiten, die im Rahmen der Experimente durch verschiedenen hohe Luftfeuchtwerte über gesättigten Salzlösungen generiert wurden, auf die Austrocknungstoleranz bezüglich der Fähigkeit, nach erfolgter Austrocknung bei neuerlicher Befeuchtung wieder photosynthetisch aktiv werden zu können und die Stärke des  $q_{des}$  bei *T. asymmetrica* aus?

*Siehe Kapitel 3.2.*

Welche Wirkung haben Arabitol und Trehalose auf  $q_{de}$  und die Austrocknungstoleranz?

Die Akkumulation von Zuckern und anderen auch in hohen Konzentrationen nicht zytotoxischen Verbindungen wurde bei zahlreichen austrocknungstoleranten Lebewesen unter Trockenstress beobachtet, von Bakterien über eukaryotische Einzeller bis hin zu Höheren Pflanzen und auch Tieren (Crowe et al. 1992; Vertucci und Farrant 1995; Tunnacliffe et al. 2001; Zwiazek et al. 2001; Stitt und Hurry 2002; Kikawada 2018). Dies deutet darauf hin, dass diesen Zuckern eine wichtige Funktion bei der Antwort auf Trockenstress und somit der Austrocknungstoleranz zukommt. Bei Pflanzen und Algen handelt es sich bei diesen Zuckern vor allen Dingen um nicht reduzierende Di- und Oligosaccharide, wozu auch der Zucker Trehalose zählt, während Arabitol ein Monosaccharid ist (Zwiazek et al. 2001; Peters et al. 2007; Dauwe et al. 2012; Bartels und Dinakar 2013; Angelcheva et al. 2014; Strimbeck et al. 2015). Die Schutzwirkung dieser Zucker wird größtenteils darauf zurückgeführt, dass diese nicht reduzierenden Zucker das Wasser, das im hydrierten Zustand die Struktur von Membranen und Proteinen durch polare Wechselwirkungen erhält, ersetzen (Crowe et al. 1992; Hoekstra et al. 2001). Zusätzlich zu dieser Schutzwirkung kommt bei sehr niedrigem Wassergehalt im Inneren der Zelle die Bildung einer glasartigen Matrix hinzu, durch die die Diffusionsrate und die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen drastisch reduziert wird, was weiteren Wasserverlust und die Entstehung toxischer Reaktionsprodukte vermindert (Hoekstra et al. 2001; Strimbeck et al. 2015).

Trehalose ist vielleicht der prominenteste Zucker, der diese Funktionen in austrocknungstoleranten Lebewesen erfüllt. So wird bei der austrocknungstoleranten Makroalge *Pyropia orbicularis* unter Trockenstress die Synthese dieses Zuckers um das zwanzigfache hoch reguliert (Fierro et al. 2017). Trehalose kommt in höheren Dosen in der Flechtensymbiose vor (Lindberg et al. 1955; MacFarlane und Kershaw 1985; Armstrong 2017; Kono et al. 2017) und spielt natürlich auch bei der Austrocknungstoleranz von Bärtierchen (Tardigrada) eine wichtige Rolle (Erdmann und Kaczmarek 2017). Auch Arabitol wird in Flechten gefunden (Lindberg et al. 1955; Armstrong and Smith 1994; Armstrong 2017) und es konnte gezeigt werden, dass dieser Zucker einen Einfluss auf die Austrocknungstoleranz von isolierten Flechten-Photobionten und auf die Ausbildung von  $q_{des}$  hat (Kosugi et al. 2013). Hat nun auch Trehalose einen Einfluss auf die Stärke von  $q_{des}$  bei der Austrocknung von *T. asymmetrica*, und können die Ergebnisse von Kosugi (2013) bezüglich Arabitol bestätigt werden?

Siehe Kapitel 3.1 und 3.4.

### 2.3 Welche Rolle spielt der Xanthophyll-Zyklus bei $q_{des}$ ?

Hinter der Frage, welche Faktoren die Bildung von  $q_{des}$  beeinflussen können steht letztendlich die Frage, welcher Mechanismus diesem Phänomen zugrunde liegt. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand gibt es zwei Komponenten, die zu  $q_{des}$  bei Flechten und aeroterrestrischen Algen führen: Es gibt eine sehr schnelle und höchst effektive Komponente, die möglicherweise am äußeren Antennenkomplex des PSII ansetzt, so-

wie eine weitere Komponente, die weniger schnell und auch weniger effektiv ist, die entweder am zentralen Antennenkomplex oder aber am aggregierten äußeren Antennenkomplex des PSII wirksam wird (Komura et al. 2010; Miyake et al. 2011). Im Gegensatz zu der für die meisten Höheren Pflanzen beschriebenen Formen des NPQ soll der dem  $q_{des}$  zugrunde liegende Mechanismus nicht von der Ansäuerung des Thylakoid-Lumens oder der Konzentration von PsbS-Proteinen oder der Bildung von Zeaxanthin anhängig sein (Heber 2008). Die Schlussfolgerung, dass Zeaxanthin nicht an der Bildung von  $q_{des}$  beteiligt sei, wurde gezogen, weil die Behandlung mit DTT, was die zur Synthese von Zeaxanthin notwendigen Enzyme funktionslos machen sollte, keinen Effekt zeigte.

Bei den meisten der Untersuchungen wurde der Gehalt an Xanthophyllen nicht bestimmt (Heber et al. 2007a; Heber 2008; Yamakawa et al. 2012). Andere Arbeiten konnten zeigen, dass es auch bei Flechten durchaus einen Zusammenhang zwischen  $q_{des}$  und dem Gehalt an Zeaxanthin geben könnte. Auch ist die Bildung von Zeaxanthin unter Umständen auch unter Bedingungen möglich, wie etwa in Dunkelheit, die nach dem bisher bestehenden Modell eigentlich unmöglich sein sollte (Fernández-Marín et al. 2009, 2010a, 2011a).

Daraus ergibt sich eine Reihe von Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet wurden. Um festzustellen, ob es wirklich einen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Zeaxanthin und der Stärke des zu beobachtenden  $q_{des}$  gibt, musste unter verschiedenen Bedingungen beides quantifiziert werden, um festzustellen, ob es eine Korrelation zwischen  $q_{des}$  und dem Gehalt an Zeaxanthin bei *T. asymmetrica* gibt



oder nicht. Dabei war es vor allem wichtig zu klären, ob man die Stärke des  $q_{des}$  manipulieren kann, ohne Einfluss auf den Gehalt an Zeaxanthin zu nehmen. Und ebenso wichtig, ob man den Gehalt an Zeaxanthin in *T. asymmetrica* manipulieren kann, ohne dass dies Auswirkungen auf die Stärke des  $q_{des}$  hätte. Wegen des bekannten von VDE und ZE katalysierten und vom pH-Wert abhängigen Regelkreises des Xanthophyllzyklus war anzunehmen, dass den Lichtbedingungen während der Kultur der Algen und während der Austrocknung eine bedeutende Rolle bei einem potentiell (auch) von Zeaxanthin abhängigen  $q_{des}$  zukäme. Diese musste verifiziert und quantifiziert werden.

Der Xanthophyllzyklus lässt sich durch den Einsatz von DTT, einem Inhibitor für VDE, und Nigericin, einen Protonophor, der den Aufbau eines Protonengradienten über die Thylakoidmembran hinweg unterbindet, manipulieren. Eine Abhängigkeit des  $q_{des}$  von der Konzentration an Zeaxanthin vorausgesetzt, sollte dies auch gravierende Auswirkungen auf die Stärke des beobachtbaren  $q_{des}$  haben. Letztendlich: Ist  $q_{des}$  von Zeaxanthin abhängig und somit mit dem von der Funktion her sehr ähnlichen Mechanismus des NPQ bei Höheren Pflanzen vergleichbar oder aber handelt es sich um ein ganz anderes, analoges Phänomen?

*Siehe Kapitel 3.4*

2.4 Reagieren poikilohydre Algen auch auf osmotischen Stress mit einer dem  $q_{des}$  entsprechenden Reduktion von  $F_0$  und  $F_V/F_M$ ?

Wegen der mechanistischen Unterschiede zwischen osmotischem Stress und dem Wasserverlust aufgrund von Austrocknung an der Luft war es trotz aller Ähnlich-

keiten dieser Prozesse unklar, ob aeroterrestische, unter Austrocknung an der Luft zu  $q_{des}$  fähige Algen wie *T. asymmetrica* auch unter osmotischem Stress eine Reduktion von  $F_0$  und einen als Schutzmechanismus gegen Photoinhibition interpretierbaren weitgehenden Verlust von  $F_V/F_M$  zeigen würden.

Um die Wirkung des Wasserverlustes durch osmotischen Stress mit der durch Austrocknung an Luft vergleichen zu können, mussten Experimente mit vergleichbar hohen negativen Wasserpotentialen mit beiden mechanistischen Ansätzen durchgeführt werden. Weiterhin war es wichtig, die Ergebnisse der Experimente mit *T. asymmetrica*, einer zu  $q_{des}$  fähigen und austrocknungstoleranten aeroterrestischen Grünalge, mit den Ergebnissen von unter den gleichen Bedingungen mit *C. vulgaris*, einer nicht zu  $q_{des}$  fähigen, austrocknungssensitiven aquatischen Grünalge durchgeführten Experimenten zu vergleichen, da bei *C. vulgaris* ein durch osmotischen Stress ausgelöste, mechanistisch mit  $q_{des}$  identische Veränderung der Chlorophyllfluoreszenz mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann.

Diese Fragestellungen wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit (Schörle 2017) bearbeitet, deren Daten zum Teil in die hier vorliegende Arbeit mit einfließen.

*Siehe Kapitel 3.5*



*Xanthoria elegans*

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Desiccation-induced non-radiative dissipation in isolated green lichen algae

Paul Christian Wieners · Opayi Mudimu · Wolfgang Bilger

Received: 5 March 2012 / Accepted: 16 July 2012 / Published online: 26 July 2012

Springer Science+Business Media B.V. 2012

##### Abstract

Lichens are able to tolerate almost complete desiccation and can quickly resume metabolic activity after rehydration. In the desiccated state, photosynthesis is completely blocked and absorbed excitation energy cannot be used for electron transport, leading to a potential strong vulnerability for high light damage. Although desiccation and high insolation often occur simultaneously and many lichens colonize exposed habitats, these organisms show surprisingly little photodamage. In the desiccated state, variable chlorophyll fluorescence is lost, indicating a suspension of charge separation in photosystem II.

At the same time, basal fluorescence ( $F_0$ ) is strongly quenched, which has been interpreted as an indication for high photoprotective non-radiative dissipation (NRD) of absorbed excitation energy. In an attempt to provide evidence for a photoprotective function of NRD in the desiccated state, isolated green lichen algae of the species *Coccomyxa* sp. and *Trebouxia asymmetrica* were used as experimental system. In contrast to experiments with intact lichens this system provided high reproducibility of the data without major optical artifacts on desiccation. The presence of 5 mM trehalose during desiccation had no effect but culture of the algae in seawater enhanced  $F_0$  quenching in

*T. asymmetrica* together with a reduced depression of  $F_V/F_M$  after high light treatment. While this effect could not be induced using artificial seawater medium lacking trace elements, the addition of  $ZnCl_2$  and NaI in small amounts to the normal growth medium led to qualitatively and quantitatively identical results as with pure seawater. It is concluded that NRD indicated by  $F_0$  quenching is photoprotective.

The formation of NRD in lichen algae is apparently partially dependent on the presence of specific micronutrients.

##### Keywords

Desiccation, Iodine, Micronutrients, Non-photochemical quenching, Trebouxia, Zinc

##### Introduction

The concept of excessive light (Osmond 1994) has been extremely fruitful in photoinhibition research. It is based on the fact that all quanta absorbed in the photosynthetic apparatus and potentially being able to induce charge separation at the photosystems must either be used for driving electron transport or safely dissipated. In this framework, it can easily be explained that photorespiration protects against photoinhibition (Powles and Osmond 1978). On the other hand, it follows that any stress-induced re-

---

duction of electron transport will increase the sensitivity to excess light. The concept also makes the need for dissipation of unused or excessive light energy apparent. Since the quantum yield of chlorophyll fluorescence is rather small, non-radiative dissipation (NRD) must take the largest part of the burden. Accordingly, stress inhibiting photosynthesis is usually accompanied by a reciprocal increase in NRD which can be quantified using non-photochemical fluorescence quenching (Krause and Jahns 2004).

In recent years, there has been a discussion, if excessive light will directly cause damage to photosystem II by increasing the formation of singlet oxygen or rather indirectly enhance photodamage by inhibiting the repair of PS II via the generation of oxidative stress (e.g., Nishiyama et al. 2006; Vass 2011).

Poikilohydrous plants provide examples for extreme cases of stress-enhanced excessive light. Desiccation not only gradually inhibits photosynthesis but completely blocks any electron transport. In this state, all absorbed radiation is excessive and exposure to light induces a great danger of severe photoinhibitory damage. Lichens are poikilohydrous organisms that grow in extreme and often highly exposed habitats. In full sunshine they dry out quickly (e.g., Lange et al. 2006). In contrast to the expectation of a high sensitivity to excess light in the dry state, lichens show extreme resistance against high light during desiccation as the existence of lichens or cyanobacterial soil crusts in deserts demonstrates (Harel et al. 2004; Lange et al. 2006). In experiments at the ISS Space Station, lichens have even survived outer space conditions in the dry state (de Vera et al. 2008; de la Torre et al. 2010).

The photobionts in the lichen symbiosis, green algae or cyanobacteria, are to some extent protected against sunshine by the cortex of the lichen formed by the fungal partner. This protection increases further in the dry state, since the air spaces formed between the hyphae increase light scattering and more light is reflected instead of being transmitted through the cortex (Dietz et al. 2000). This optical protection can, however, not be sufficient for the photobionts, which have no means to utilize the light energy. Rather, efficient dissipation would be necessary which can be detected by chlorophyll fluorescence measurements (Krause and Jahns 2004).

Chlorophyll fluorescence of lichens displays a particular behavior during desiccation. Both, maximal ( $F_M$ ) and basal ( $F_0$ ) fluorescence decline strongly, leading to a complete loss of photochemical quantum yield of PS II, as indicated by the fluorescence parameter  $F_V/F_M$  (Lange et al. 1989).

The decline of  $F_0$  can partially be explained by the change in the optical properties of the lichen cortex. However, Veerman et al. (2007) have shown for the lichen *Parmelia sulcata* that this part amounted to 25 % of the decline of  $F_0$  and that the majority of it was due to increased NRD. These results have been confirmed by Komura et al. (2010).

The molecular mechanism of the desiccation-induced quenching of  $F_0$  (from now on designated as  $q_{des}$ ) is not yet clear. Its extent can vary between different species and between differently acclimated organisms within the same species (Heber and Shuvalov 2005). It has been reported for cyanobacterial soil crusts (Harel et al. 2004; Ohad et al. 2010), a marine red alga (Öquist and Fork

---

1982), for cyanobacterial and green algal lichens, and poikilohydric mosses (Heber et al. 2007). Higher plants, and even poikilohydric ones, do not show  $q_{des}$  (Heber et al. 2000; W. Bilger, P. Wieners, unpublished).

This distribution indicates that  $q_{des}$  is not related to the type of light harvesting complex. On the other hand, using timeresolved fluorescence spectroscopy, Miyake et al. (2011) assigned a quenching component with an emission peak at 740 nm to the peripheral antenna of PS II of the lichen *Parmotrema tinctorum*.  $q_{des}$  can be inhibited by the application of glutaraldehyde, which cross-links proteins (Heber et al. 2007, 2008). Apparently, a structural change is necessary for the appearance of  $q_{des}$ . This type of quenching can lead to a decrease of  $F_0$  by a factor of 4 and more and has the properties that are a precondition for effective photoprotection. It is assumed that the rate constant for NRD is so much enhanced that it efficiently competes with charge separation, thereby inhibiting variable fluorescence (Heber et al. 2008).

Loss of charge separation prevents the formation of reactive oxygen species, among them  $1O_2$ , which is considered to play a central role in damage of PS II induced in white light (Vass 2011). It has been shown previously that lichens treated with high light suffered much less reduction of  $F_v/F_M$  when treated in the dry state (Demmig-Adams et al. 1990a).

Accordingly, one may suggest that the dissipative processes leading to  $q_{des}$  serve a photoprotective role. Although NRD indicated by  $q_{des}$  meets the prerequisites for photoprotective action, this has not been unambiguously confirmed. Shade grown *Lobaria pulmonaria* displaying reduced  $q_{des}$  showed

a stronger reduction of  $F_v/F_M$  after high light treatment in the dry state than sun-grown *L. pulmonaria* (Heber et al. 2010). However, in these cases, more than  $q_{des}$  may vary between the two groups or treatments and contribute to high light damage. Therefore, it is desirable to find an experimental system where  $q_{des}$  can be easily manipulated in order to provide better evidence for a photoprotective function of  $q_{des}$ .

Trehalose is a sugar which is often involved in protection against desiccation stress (Behm 1997; Johnsson and Persson 2010). One may therefore speculate, whether  $q_{des}$  could be manipulated by the addition of trehalose.

Experiments with intact lichens are not always simple. Lichens grow slowly and cannot be cultivated under controlled conditions. Accordingly, the variability between different thalli is very high since they may have a different history and growth conditions. Lichen physiological properties may vary even when sampled from the same tree trunk (Gauslaa and Solhaug 2000).

Therefore, experiments with isolated lichen algae that can be cultivated under uniform conditions offer an alternative. Such algae are also more accessible to treatments in order to manipulate  $q_{des}$ . However, it has been reported that even algae freshly isolated from a lichen thallus did not show the typical  $q_{des}$  of the intact lichen (Kosugi et al. 2009). We investigated  $q_{des}$  of lichen algae grown in liquid culture in order to find correlations between  $q_{des}$  and photoprotection. We explored for means to manipulate the extent of  $q_{des}$  by growth in different media.

---

## Materials and methods

### Algae

The experiments were conducted with *Trebouxia asymmetrica*, Friedl et Gärtner (Class Trebouxiophyceae, Order Trebouxiiales, Family Trebouxiaceae) and *Coccomyxa* sp. (Class Chlorophyceae, Order Chlorococcales, Family Chlorococcaceae). Both species are lichen photobionts (Friedl and Gärtner 1988; Lang et al. 2011). Algae of the genus *Coccomyxa* also exist as a free living aeroterrestrial algae (Guiry 2012), whereas this is not clear for *T. asymmetrica* (Ahmadjian 1988).

The algal species were identified by Dr. Thomas Friedl, Göttingen, Germany, either visually (*T. asymmetrica*) or by molecular genetic methods (*Coccomyxa* sp.). The algal strains were originally isolated from lichens by Dr. Peter Vaczi, Brno, Czech Republic, and given to us by Dr. Knut Asbjørn Solhaug, Ås, Norway. All experiments were repeated with algal strains from the culture collection at Göttingen (*T. asymmetrica* SAG 48.88, *Coccomyxa* sp. SAG 49.84) with identical results. *Chlorella vulgaris* Beijerinck SAG 211-19 (Class Trebouxiophyceae, Order Chlorellales, Family Chlorellaceae), which is a fresh water species, was used as a reference organism.

### Culture conditions and media

The algae were cultivated in 200 ml cell culture flasks (Grainer-bio-one Cellstar with filter) at 20° C and a PFD of 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  under a 12 h light–dark cycle for 3 weeks before the experiments. The flasks were closed with hydrophobic membrane filters to

allow gas exchange with minimal water loss. The cell density was kept low enough to minimize mutual shading of the algae. The culture was mixed daily to avoid formation of a biofilm at the surface.

The algae were regularly grown in BBM + V medium (Starr and Zeikus 1993; see Table S1), using appropriate chemicals (Merck, Darmstadt, Germany). For some experiments, algae were cultivated in seawater or in artificial seawater medium (ASM30, Starr and Zeikus 1993; Table S2). Seawater was sampled offshore from the North Sea near Helgoland, Germany, ultrafiltered and autoclaved, and supplemented with macronutrients (Table S3).

In some experiments, NaI [Merck; final concentration of 0.06 mg/l (=0.48  $\mu\text{M}$ )] and  $\text{ZnCl}_2$  [Merck; final concentration of  $\text{Zn}^{2+}$  0.05 mg/l (=0.76  $\mu\text{M}$ )] were added to the BBM + V medium. For the investigation of the influence of trehalose, 1 ml trehalose solution (50 mM, Merck) was added to 9 ml algal suspension and the suspension incubated over night prior to the experiments.

### Experiments

For the experiments, the algal suspension was pipetted on filter paper (NM 615, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Since the chlorophyll fluorescence intensity is up to a certain concentration dependent on the chlorophyll concentration, extensive experiments were conducted to determine the appropriate amount of algae on the filter. A concentration was used in a range where the fluorescence signal and the change of  $F_v/F_m$  by the treatment were independent of the applied amount of suspension. The filters with algae were exposed to high light ei-

---

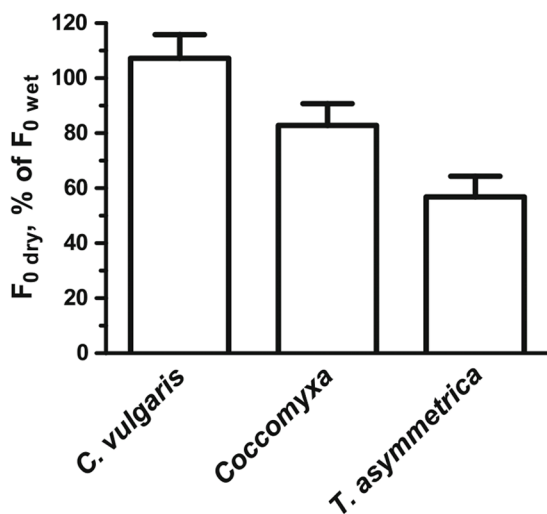
ther in the wet state or after 48 h desiccation over silica gel (Merck) in an exsiccator. Algae were exposed to 1,000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  provided by a mercury vapor lamp (HQL Powerstar Daylight, Osram, München, Germany), for 60 min. The filters were placed on an aluminum plate that was thermostatted at 20° C to keep the filters at room temperature during exposure. When the algae were in the dry state they were rewetted directly after the irradiation and  $F_V/F_M$  determined after 60 min at 20° C in darkness to allow full recovery from desiccation. Similarly, after treatment in the wet state, a recovery period of 1 h in darkness at 20° C was allowed before  $F_V/F_M$  was determined.

The experiments were repeated five times ( $n = 5$ ). One additional experiment ( $n = 5$ ) was conducted with the algae from the

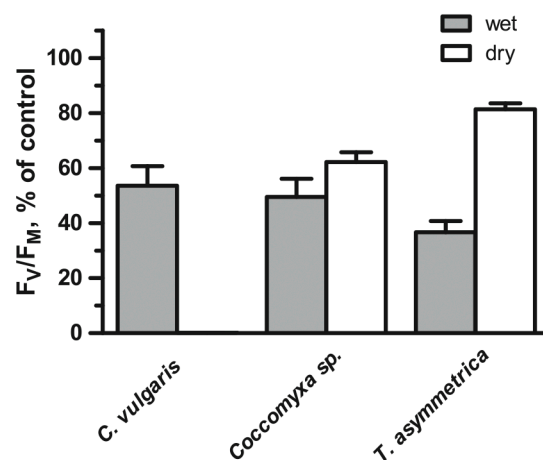
Göttingen culture collection.

Chlorophyll fluorescence was measured using a PAM 2500 chlorophyll fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany). Minimal fluorescence yield,  $F_0$ , was measured in the presence of a weak excitation beam (0.05  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) and maximal fluorescence yield,  $F_M$ , was determined by the application of a saturating light pulse of 2,500  $\mu\text{mol photons m}^{-2}$  of a duration of 0.5 s. For the determination of  $F_V/F_M (= (F_M - F_0)/F_M)$ , the algae were always pre-darkened for 60 min. Photoinhibition was calculated by comparison to a desiccated and rewetted parallel sample.

Statistical tests (ANOVA) were performed using Graph-Pad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).



**Fig. 1** Relative  $F_0$  in the dry state in percent of  $F_0$  in the wet state in BBM + V medium. Means of five different experiments with  $n = 5$  each; the error bars designate standard deviation. All values are significantly different from each other at the 0.1 % level (one-way ANOVA)



**Fig. 2** Relative  $F_v/F_M$  in % of the control after treatment in the wet (gray bars) and dry state (white bars). Means of five different experiments with  $n = 5$  each; the error bars designate standard deviation. As determined by two-way ANOVA and Bonferroni multiple comparison as post hoc test, all means are significantly different from each other at  $p \leq 0.0001$ , except for the comparison between wet *C. vulgaris* and *Coccomyxa sp.*, which was significant at  $p \leq 0.05$

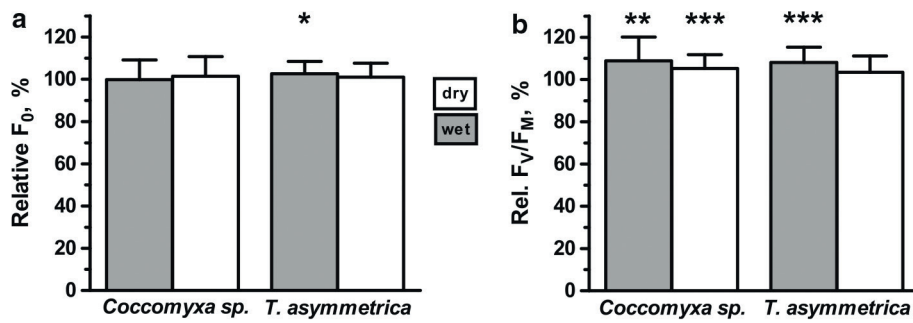
## Results

Desiccation-induced quenching of  $F_0$  ( $q_{des}$ ) in three differentialgal species is shown in Fig. 1. While  $F_0$  decreased in the two aeroterrestrial species isolated from lichens, it even increased slightly in the aquatic alga *C. vulgaris* after desiccation, indicating that a slight reflectance increase in the dried samples could not have caused the decrease of  $F_0$ . *Trebouxia asymmetrica* showed a stronger quenching than *Coccomyxa sp.* The algae showed quenching despite the fact that they were cultured over many generations after their isolation. *Chlorella vulgaris* showed no recovery of the quantum yield of PS II ( $F_v/F_M$ ) after rewetting, where as it returned to values close to the original values in the lichen algae.

The three species were irradiated with  $1,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for 1 h in the wet and the dry state. In Fig. 2,  $F_v/F_M$  in % of the original value is shown. After treatment in the wet state,  $F_v/F_M$  was lowest in *T. asymmetrica*, while the other two species showed values around 50 %.  $F_0$  increased by 7.5 % (SD 10.3 %; *C. vulgaris*), 9.6 % (SD 7.6 %; *T. asymmetrica*), and 12.5 % (SD 5.8 %; *Coccomyxa sp.*). The increase of  $F_0$  was in all species highly significant ( $p \leq 0.001$ ; Wilcoxon matched pairs signed rank test).

After treatment in the dry state, *C. vulgaris* lost all variable fluorescence (Fig. 2). The same result was obtained when this species was dried and rehydrated without further illumination. In contrast, in the two desiccation tolerant species  $F_v/F_M$  after illumination in the dry state was significantly higher than





**Fig. 3** Relative  $F_0$  (a) before high light treatment and relative  $F_v/F_M$  after high light treatment (b) in the presence of 5 mM trehalose in percent of  $F_0$  or  $F_v/F_M$  respectively, in  $BBM + V$  medium. Gray bars designate treatment in the wet state and white bars in the dry state. Means of five independent experiments with  $n = 5$  each. Error bars designate standard deviation. The stars indicate statistically significant differences to 100 %, i.e., the results obtained in  $BBM + V$  medium. All other means were not significantly different from 100 %

after treatment in the wet state, with *Coccomyxa* showing the larger reduction of  $F_v/F_M$ .  $F_0$  was increased in *T. asymmetrica* by 3.8% (SD 2.2 %) and in *Coccomyxa* sp. by 9.6% (SD 3.3 %). Both increases were highly significant ( $p \leq 0.001$ ; Wilcoxon matched pairs signed rank test).

To obtain further data on the relationship between  $q_{des}$  and high light-induced reduction of  $F_v/F_M$  we tried to manipulate fluorescence quenching by the addition of trehalose to the culture medium. Trehalose had no effect on  $q_{des}$  and on  $F_v/F_M$  in the dry state (Fig. 3). However, the decrease of  $F_v/F_M$  was slightly reduced when the algae were treated in the wet state.

Also, the effect of cultivation in seawater was tested. Surprisingly, all three algal species not only survived this treatment but even grew better based on the kinetics of optical density at 750 nm (data not shown).  $F_0$  in the wet state was not affected by this culture condition, but  $q_{des}$  was enhanced in *T. asymmetrica* (Table 1). Reduction of  $F_v/F_M$  by the high light treatment in the wet state was the same in the presence of seawater as in  $BBM + V$  medium.

However, after treatment in the dry state, reduction of  $F_v/F_M$  decreased in the presence of seawater, in *Coccomyxa* sp. by 10 % and in *T. asymmetrica* by 43 % (Table 1).

These effects were not seen when artificial seawater medium (Table S2) was used, which contained the major salts from seawater but lacked the trace elements (data not shown). Growing algae in medium containing commercial fertilizer, which also contains micronutrients, gave the same results as seawater (data not shown). These data indicate that the micronutrients present in these media seem to be responsible for the observed increase in  $q_{des}$  and the reduced depression of  $F_v/F_M$ .

However, seawater contains all micronutrients present on earth (Turekian 1968). Therefore, it would be a formidable task to search exhaustively for the trace elements responsible for the enhanced quenching caused by seawater. Accordingly, we chose the approach to first test selected ions that appeared to be promising because they were either recommended as an addition to culture of algae or other marine organisms. We chose  $Zn^{2+}$  and  $I^-$  in the same concen-

tration as reported in seawater (Turekian 1968), either alone or in combination. It turned out that  $Zn^{2+}$  alone had no effect on  $q_{des}$ , while  $I^-$  was enhancing  $q_{des}$  by about half the amount of that of seawater (Table 1). However, when both ions were added in combination to BBM + V medium, this mimicked the effect of growth in seawater with respect to  $q_{des}$ , both qualitatively and quantitatively in both algal species (Table 1). Reduction of  $F_V/F_M$  after treatment in the wet state was not influenced by the ions, whereas after irradiation in the dry state reduction of  $F_V/F_M$  was affected by the combination of both ions in *T. asymmetrica*.

This effect had exactly the same magnitude as that by addition of seawater in this alga. With *Coccomyxa sp.* there was also a trend in  $F_V/F_M$  in about the same magnitude as with seawater, but this effect was not significant. Again, application of  $I^-$  alone had only a minor effect on changes in  $F_V/F_M$  in *T. asymmetrica*.

## Discussion

The chosen approach to investigate desiccation-induced fluorescence quenching with isolated lichen algae was quite successful. Application of algae cultured in liquid media to filter paper allowed highly reproducible fluorescence measurements. The size of the variation was fairly low within and between experiments (data not shown; see also Fig. 1). It was even possible to reproducibly distinguish species on the basis of their  $F_0$  values. This shows that  $F_0$  was independent of the applied chlorophyll concentration within the range used in these experiments. This experimental system is also lacking the optical effects linked to the increased light

scattering of the lichen cortex.

The only remaining optical artifact was a slight increase of reflectance of the dried algae which may have contributed to lowering of the fluorescence signal. However, this general effect will certainly not have influenced the species-specific responses of fluorescence yield to desiccation in different culture media. It can be concluded that isolated lichen algae growing in appropriate media provide an experimental system extremely well suited to further investigate desiccation-induced photoprotection. Both *Coccomyxa sp.* and *T. asymmetrica* displayed  $q_{des}$ .

In a previous publication, no  $q_{des}$  was seen with algae freshly isolated from a lichen or after culture (Kosugi et al. 2009). This difference compared to our results may potentially be explained either by the use of different species of algae or by the use of different culture media, which can have a major influence on the physiology of the algae (Latala et al. 2010; Millington et al. 1988; Utting 1985).

In *C. vulgaris*, which is not desiccation resistant,  $q_{des}$  was not observed. Rather,  $F_0$  increased slightly in the dry state. Very similar responses can be observed in higher plants (Heber et al. 2000). This shows that  $q_{des}$  is not a purely physical effect of desiccation, e.g., a changed extinction coefficient of chlorophyll in the dry state, but that a specific but so far unknown physiological adaptation in the photosynthetic apparatus of algae is required for appearance of  $q_{des}$ . The same conclusion can be drawn from the species-specific differences in the extent of  $q_{des}$  between *Coccomyxa sp.* and *T. asymmetrica*. It has been shown before that  $q_{des}$  could be inhibited by the application of glutaraldehyde to intact lichens (Heber et al.

**Table 1**  $F_0$  values in the wet and dry state before high light treatment and reduction of  $F_V/F_M$  after treatment in the wet and dry state of the three different algal species in different media

Medium	Alga	$F_0$ wet (%)	SD	$F_0$ dry (%)	SD	Reduction of $F_V/F_M$ wet (%)	SD	Reduction of $F_V/F_M$ dry (%)	SD
Seawater	<i>C. vulgaris</i>	101.7	3.2	98.8	2.9	97.3	5.3	100.0	0.5
Seawater	<i>Coccomyxa</i>	100.0	6.0	97.4	5.8	99.6	8.1	90.4	11.0
Seawater	<i>T. asymmetrica</i>	100.7	6.1	76.2	7.8	94.6	8.7	56.8	6.5
+ $\Gamma$	<i>C. vulgaris</i>	100.6	6.1	101.2	3.6	102.6	13.5	100.0	0.3
+ $\Gamma$	<i>Coccomyxa</i>	97.3	8.9	97.3	7.6	97.2	11.8	96.3	7.0
+ $\Gamma$	<i>T. asymmetrica</i>	97.7	6.5	89.5	8.2	101.7	3.7	90.6	6.4
+Zn <sup>2+</sup>	<i>C. vulgaris</i>	99.0	4.4	99.5	3.2	99.6	10.4	100.0	0.6
+Zn <sup>2+</sup>	<i>Coccomyxa</i>	100.0	7.8	100.5	5.3	97.6	7.7	99.0	3.8
+Zn <sup>2+</sup>	<i>T. asymmetrica</i>	101.8	4.0	103.1	4.3	100.6	3.8	98.9	7.6
+ $\Gamma$ + Zn <sup>2+</sup>	<i>C. vulgaris</i>	100.9	3.9	99.2	4.5	98.2	9.5	100.0	0.4
+ $\Gamma$ + Zn <sup>2+</sup>	<i>Coccomyxa</i>	100.5	6.5	97.7	6.5	99.7	7.6	94.1	5.1
+ $\Gamma$ + Zn <sup>2+</sup>	<i>T. asymmetrica</i>	97.5	3.9	77.9	10.8	97.9	3.5	52.8	4.1

All data are expressed in % of the values determined in BBM + V medium. NaI, ZnCl<sub>2</sub> or a combination of both were added to BBM + V medium to final concentrations of 0.06 mg/l (NaI) or 0.05 mg/l (ZnCl<sub>2</sub>). Values significantly different from 100 % at  $p < 0.05$  are indicated in bold face.  $n = 25$  SD standard deviation

2007, 2008). Apparently, a conformational change is possible in some algae and its extent is variable in a species-specific manner. It is also noteworthy that in *C. vulgaris* the absence of  $q_{des}$  was coupled to a remaining variable fluorescence indicating that charge separation could still take place. The same observation can be made again in higher plant leaves when desiccated in complete darkness (Heber et al. 2000). This remaining electron transport in PS II coincides with a complete blockage of electron transport in the desiccated state, which creates a situation prone to cause damage.

The extent of  $q_{des}$  was not only species specific, but could also be modulated by the presence of certain ions.  $q_{des}$  was enhanced in *T. asymmetrica* when grown in the presence of commercial fertilizer or original seawater. It is interesting that the algae not only tolerated seawater, but even grew better. It is known that some algae cannot be grown

without the addition of certain, often unknown, nutrients. This is achieved by adding soil extracts to the growth medium, which sometimes need to be produced with soil from a specific site (T. Friedl, pers. comm.). For example, the widely used basal medium (Starr and Zeikus 1993) contains soil extract. This indicates that the nutrient requirements for growth may vary among algae and that they are not yet completely known.

Since algae grown in artificial seawater which contains only the major ions from seawater (see Table S2), did not how enhanced  $q_{des}$ , it is clear that micronutrients must be responsible for the effect of seawater. However, seawater contains virtually all elements present on earth (Turekian 1968). Almost all fertilizers contain phosphate collected from seafowl guano. Therefore, fertilizer also presumably contains a high number of the trace elements present in seawater. We chose zinc and iodine as key trace elements for in-

---

investigation for the following reason. The role of halogens in general and iodine especially as micronutrients is not yet clear, but there is strong evidence that they have an important influence in many cases through all domains of life (Venturi and Venturi 1999) and their role in evolution of terrestrial life forms is under discussion (Venturi et al. 2000). There are many examples in which halogens are present in high concentrations in algae and seem to play a role in photoinhibition (Küpper et al. 2008; Nitschke et al. 2011).

Also, zinc is known to be of great importance as a trace element (Hassler et al. 2005) and is part of a large number of enzymes, so it is likely that its higher availability could influence the physiology of an organism. Addition of  $Zn^{2+}$  did not change  $q_{des}$  whereas addition of  $I^-$  alone had an intermediate effect. This does not contradict an interaction of  $Zn^{2+}$  and  $I^-$  being necessary for an effect on  $q_{des}$ , since the normal growth medium already contained a small amount of 0.03 mg/l of  $ZnCl_2$ . The concentrations of Zn and I applied here were similar to those in seawater (0.05 mg/l). It remains to be tested if further increases in the concentrations would enhance  $q_{des}$  even further. It should be noted, however, that the applied concentrations produced  $q_{des}$  at the same level as in the presence of seawater. Since Zn and I were the only elements tested so far, we cannot exclude that other ions or combinations may enhance  $q_{des}$  as well.

This will be checked in ongoing experiments. Also, the mechanism by which Zn and I interact to improve  $q_{des}$  remains unknown. It is even conceivable that one or both ions was/were responsible for the cellular uptake of the other, with the consequence that only one of them would have a direct molecular

effect on the structure of PS II in the desiccated state.

The reaction of the algae to high light treatment was assessed by determination of the quantum yield of PS II,  $F_V/F_M$ . This parameter reflects both, damage to PS II and photoprotective NRD. A common procedure to distinguish between both types of reduction of  $F_V/F_M$  is the resolution into components with different relaxation kinetics with the component relaxing slower than within 30 min being considered as related to damage (Müller et al. 2001; Krause and Jahns 2004). In our experiments, we chose 60 min dark adaptation for assessing  $F_V/F_M$ .

However, there are reports that overwintering evergreen plants developed a zeaxanthin related sustained non-photochemical quenching that resulted in permanently depressed  $F_V/F_M$  values (Adams and Demmig-Adams 1995; Adams et al. 2006). The occurrence of such apparently long lasting zeaxanthin-related quenching can make the distinction in rapidly reversible “dynamic” photoinhibition (Osmond 1994) and slowly reversible, damage related “chronic” photoinhibition difficult.

Hence, one cannot exclude that reductions in  $F_V/F_M$  in our experiments were induced by a longer lasting component of non-photochemical quenching. Since non-photochemical dissipative processes lead also to a reduction of photosynthesis (see Demmig-Adams et al. 1990a, b), such reduction of  $F_V/F_M$  may be called photoinhibition although it would not include a photo-inactivation as defined by Campbell and Tyystjärvi (2012). These considerations apply especially to the experiments where algae were treated in the wet state. Here, we observed that *T. asymmetrica*, which is known

---

to occur in more sun exposed lichens than *Coccomyxa* sp. (T. Darienko, pers. comm.), showed a greater reduction of  $F_V/F_M$  than the other two species (Fig. 2). During light exposure, a stronger or longer lasting non-photochemical quenching may have been induced in *T. asymmetrica*, although the observed increases in  $F_0$  would also support the occurrence of damage at PS II.

On the other hand, when the algae were treated in the dry state, it is highly improbable that during desiccation or high light treatment non-photochemical quenching could have been induced. During desiccation, great care was taken to keep the algae in total darkness. Desiccated algae are metabolically inactive (Cowan et al. 1979), especially electron transport is blocked. Accordingly, they are unable to form light-dependent quenching. Hence, one could assume that the observed reduction of  $F_V/F_M$  after high light treatment in the desiccated state reflected quenching due to photoinactivation of PS II (Krause and Jahns 2004).

This interpretation is supported by the observed increases of  $F_0$ , which were larger in the species with a higher reduction of  $F_V/F_M$ . The extent of the reduction of  $F_V/F_M$  after high light exposure in the dry state increased with decreasing  $q_{des}$  when comparing *T. asymmetrica* with *Coccomyxa* sp. (Fig. 2) and when comparing the different ionic compositions of the suspension media for *T. asymmetrica* (Table 1).

If one interprets the reduction of  $F_V/F_M$  as indicative of photoinactivation of PS II, these data suggest that  $q_{des}$  is photoprotective. While one may argue that other species-specific differences could have confounded the comparison between species, variation of the growth medium affected  $q_{des}$

and high light-induced depression of  $F_V/F_M$  within the same species. Growth in seawater or addition of  $Zn^{2+}$  and  $I^-$  had a strong effect on both,  $q_{des}$  and reduction of  $F_V/F_M$ , while addition of  $I^-$  alone affected both intermediately, presumably because of the presence of only limiting amounts of  $Zn^{2+}$  in the original growth medium. This correlation between quenching and lower reduction of  $F_V/F_M$  supports the hypothesis that NRD, which leads to  $q_{des}$ , provides photoprotection in the desiccated state. Of course, we cannot totally exclude that enhanced  $q_{des}$  and low high light-induced reduction of  $F_V/F_M$  are only two independent results of a hitherto unknown effect induced by Zn and I.

However, in this respect it is important to note that Zn and I do not affect  $F_V/F_M$  after high light treatment in the wet state when quenching is not affected. The observed extent of reduction of  $F_V/F_M$  in the desiccation tolerant algae seems to contradict the concept that photoinhibition is related to excessive light. In the desiccated state when excessive light was considerably increased, these species suffered actually less reduction of  $F_V/F_M$ . However, utilization of the light energy in photosynthesis may be replaced by NRD. In the desiccated algae, this dissipation apparently even overcompensated for the lack of energy consumption in photosynthesis.

It has been demonstrated that in lichens with a larger light-induced NRD the depression of  $F_V/F_M$  after high light treatment was smaller (Demmig-Adams et al. 1990a, b). Here, we show a negative correlation between desiccation-induced NRD and high light-induced reduction of  $F_V/F_M$ . Such a correlation has not been shown unequivocally before, since it was not possible

to manipulate  $q_{des}$  without also changing other parameters influencing high light resistance. For instance, it has been shown that high light grown specimens of *L. pulmonaria* were more resistant than low light grown specimens, the former also showing a stronger  $q_{des}$  (Heber et al. 2010). However, growth at high light most probably induces further acclimatory responses providing protection against photoinhibition, among them cortical screening (Solhaug and Gauslaa 2004).

The potential protection was considerable in *T. asymmetrica* despite the fact that the algae were cultivated at only  $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . After growth in seawater, 1 h of exposure to an irradiance 10 times the growth irradiance caused only a 10 % reduction in  $F_v/F_m$ . This illustrates the considerable potential of the photoprotective mechanisms active in the desiccated alga.

In the intact lichen, the additional screening provided by the fungal cortex will enhance high light resistance even further.

The presence or absence of certain mineral nutrients can strongly affect the growth of lichens (Hauck et al. 2009) and microalgae (Kropat et al. 2011; Merchant et al. 2006). From our results, it can be expected that in high light climates the presence of Zn and I could contribute to the survival and success of a range of lichens containing the investigated *Trebouxia* species as a photobiont.

**Acknowledgments** We thank Prof. Knut Asbjørn Solhaug for the gift of the different algal strains and Prof. Thomas Friedl for the determination of the species. Sandra Pusch is thanked for maintenance of the algal cultures. Fruitful discussions on the role of trace elements with Dr. R. Riehl are gratefully acknowledged.

## References

- Adams WW III, Demmig-Adams B (1995) The xanthophyll cycle and sustained thermal energy dissipation activity in *Vinca minor* and *Euonymus kiautschovicus* in winter. *Plant Cell Environ* 18:117–127
- Adams WW III, Zarter CR, Mueh KE, Amiard V, Demmig-Adams B (2006) Energy dissipation and photoinhibition: a continuum of photoprotection. In: Demmig-Adams B, Adams WW III, Mattoo AK (eds) *Photoprotection, photoinhibition, gene regulation, and environment*. Springer, Dordrecht, pp 49–64
- Ahmadjian V (1988) The lichen alga *Trebouxia*: does it occur freeliving? *Plant Syst Evol* 158:243–247
- Behm C (1997) *The role of trehalose in the physiology of nematodes*. *Int J Parasitol* 27:215–229
- Campbell DA, Tyystjärvi E (2012) Parameterization of photosystem II photoinactivation and repair. *Biochim Biophys Acta* 1817:258–265
- Cowan DA, Green TGA, Wilson AT (1979) Lichen metabolism. 1. The use of tritium labelled water in studies of anhydrobiotic metabolism in *Ramalina celastri* and *Peltigera polydactyla*. *New Phytol* 82:489–503
- de la Torre R, Sancho LG, Horneck G, de los Rios A, Wierzchos J, Olsson-Francis K, Cockell CS, Rettberg P, Berger T, de Vera J-PP, Ott S, Friás JM, Melendi PG, Lucas MM, Reina M, Pintado A, Demets R (2010) Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions—results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus* 208:735–748
- de Vera J-P, Rettberg P, Ott S (2008) Life at the limits: capacities of isolated and cultivated lichen symbionts to resist extreme environmental stress. *Orig Life Evol Biosphere* 38:457–468
- Demmig-Adams B, Máguas C, Adams WW III, Meyer A, Kilian E, Lange OL (1990a) *Effect of high light on the efficiency of photochemical energy conversion in a variety of lichen species with green and blue-green phycobionts*. *Planta* 180:400–409
- Demmig-Adams B, Adams WW III, Czygan F-C, Schreiber U, Lange OL (1990b) Differences in the capacity for radiationless energy dissipation in the photochemical apparatus of green and bluegreen algal lichens associated with differences in carotenoid composition. *Planta* 180:582–589
- Dietz S, Büdel B, Lange OL, Bilger W (2000) Transmit-

- tance of light through the cortex of lichens from contrasting habitats. *Bibl Lichenol* 75:171–182
- Friedl T, Gärtner G (1988) *Trebouxia* (Pleurastrales, Chlorophyta) as phycobiont in the lichen genus *Diploschistes*. *Arch Protistenkd* 135:147–158
- Gauslaa Y, Solhaug KA (2000) High-light-intensity damage to the foliose lichen *Lobaria pulmonaria* within a natural forest: the applicability of chlorophyll fluorescence methods. *Lichenologist* 32:271–289
- Guiry MD (2012) In: Guiry MD, Guiry GM. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>. Accessed 27 June 2012
- Harel Y, Ohad I, Kaplan A (2004) Activation of photosynthesis and resistance to photoinhibition in cyanobacteria within biological desert crust. *Plant Physiol* 136:3070–3079
- Hassler CS, Behra R, Wilkinson KJ (2005) Impact of zinc acclimation on bioaccumulation and homeostasis in *Chlorella kesslerii*. *Aquat Toxicol* 74:139–149
- Hauck M, Jürgens S-R, Willenbruch K, Huneck S, Leuschner C (2009) Dissociation of metal-binding characteristics of yellow lichen substance suggest a relationship with site preferences of lichens. *Ann Bot* 103:13–22
- Heber U (2008) Photoprotection of green plants: a mechanism of ultra-fast thermal energy dissipation in desiccated lichens. *Planta* 228:641–650
- Heber U, Shuvalov VA (2005) Photochemical reaction of chlorophyll in dehydrated photosystem II: two chlorophyll forms (680 and 700 nm). *Photosynth Res* 84:85–91
- Heber U, Bilger W, Bligny R, Lange OL (2000) Phototolerance of lichens, mosses and higher plants in an alpine environment: analysis of photoreaction. *Planta* 211:770–780
- Heber U, Azarkovich M, Shuvalov VA (2007) Activation of mechanisms of photoprotection by desiccation and by light: poikilohydric photoautotrophs. *J Exp Bot* 58:2745–2759
- Heber U, Bilger W, Türk R, Lange OL (2010) Photoprotection of reaction centers in photosynthetic organisms: mechanisms of thermal energy dissipation in desiccated thalli of the lichen *Lobaria pulmonaria*. *New Phytol* 185:459–470
- Jönsson KI, Persson O (2010) Trehalose in three species of desiccation tolerant tardigrades. *Open Zool J* 3:1–5
- Komura M, Yamagishi A, Shibata Y, Iwasaki I, Itoh S (2010) Mechanism of strong quenching of photosystem II chlorophyll fluorescence under drought stress in a lichen, *Physciella melanchla*, studied by subpicosecond fluorescence spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1797:331–338
- Kosugi M, Arita M, Shizuma R, Moriyama Y, Kashino Y, Koike H, Satoh K (2009) Responses to desiccation stress in lichens are different from those in their photobionts. *Plant Cell Physiol* 50:879–888
- Krause GH, Jahns P (2004) Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds) *Chlorophyll a fluorescence. A signature of photosynthesis*. Advances in photosynthesis and respiration, vol 19. Springer, Dordrecht, pp 463–495
- Kropat J, Hong-Hermesdorf A, Casero D, Ent P, Castruita M, Pellegrini M, Merchant SS, Malasarn D (2011) A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 66:770–780
- Küpper FC, Carpenter LJ, McFiggans GB, Palmer CJ, Wait TJ, Boneberg E-M, Woitsch S, Weiller M, Abela R, Grolimund D, Potin P, Butler A, Luther GW III, Kroneck PMH, Meyer-Klaucke W, Feiters MC (2008) Iodine accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:6954–6958
- Lange OL, Bilger W, Rimke S, Schreiber U (1989) Chlorophyll fluorescence of lichens containing green and blue-green algae during hydration by water vapor uptake and by addition of liquid water. *Bot Acta* 102:306–313
- Lang I, Hodac L, Friedl T, Feussner I (2011) Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biol* 11:124
- Lange OL, Green TGA, Melzer B, Meyer A, Zellner H (2006) Water relations and CO<sub>2</sub> exchange of the terrestrial lichen *Teloschistes capensis* in the Namib fog desert: measurements during two seasons in the field and under controlled conditions. *Flora* 201:268–280
- Latala A, Nedzi M, Stepnowski P (2010) Toxicity of imidazolium ionic liquids towards algae. Influence of salinity variations. *Green Chem* 12:60–64
- Merchant SS, Allen MD, Kropat J, Moseley JL, Long JC, Tottey S, Terauchi AM (2006) Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Biochim Biophys Acta* 1763:578–594
- Millington LA, Goulding KH, Adams N (1988) The influence of growth medium composition on the toxicity of chemicals to algae. *Water Res* 22:1593–1597
- Miyake H, Komura M, Itoh S, Kosugi M, Kashino Y, Satoh K, Shibata Y (2011) Multiple dissipation components of excess light energy in dry lichen revealed by ultrafast fluorescence study at 5K.

- 
- Photosynth Res 110:39–48
- Müller P, Li X-P, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125: 1558–1566
- Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1757:742–749
- Nitschke U, Ruth AA, Dixneuf S, Stengel DB (2011) Molecular iodine emission rates and photosynthetic performance of different thallus parts of *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) during emersion. *Planta* 233:737–748
- Ohad I, Raanan H, Keren N, Tchernov D, Kaplan A (2010) Light-induced changes within photosystem II protects *Microcoleus* sp in biological desert sand crusts against excess light. *PLoS One* 5(6):e11000
- Öquist G, Fork DC (1982) Effects of desiccation on the excitation energy distribution from phycoerythrin to the two photosystems in the red alga *Porphyra perforata*. *Physiol Plant* 56:56–62
- Osmond CB (1994) What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: Baker NR, Bowyer JR (eds) *Photoinhibition of photosynthesis. From molecular mechanisms to the field*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp 1–24
- Powles SB, Osmond CB (1978) Inhibition of the capacity and efficiency of photosynthesis in bean leaflets illuminated in a CO<sub>2</sub>-free atmosphere at low oxygen: a possible role for photorespiration. *Aust J Plant Physiol* 5:619–629
- Solhaug KA, Gauslaa Y (2004) Photosynthates stimulate the UV-B induced fungal anthraquinone synthesis in the foliose lichen *Xanthoria parietina*. *Plant Cell Environ* 27:167–176
- Starr RC, Zeikus JA (1993) UTEX—the culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures. *J Phycol* 29:1–106
- Turekian KK (1968) *Oceans*. Prentice Hall, Engelwood Cliffs
- Utting SD (1985) Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacult Eng* 4:175–190
- Vass I (2011) Role of charge recombination processes in photodamage and photoprotection of the photosystem II complex. *Physiol Plant* 142:6–16
- Veerman J, Vasil'ev S, Paton GD, Ramanauskas J, Bruce D (2007) Photoprotection in the lichen *Parmelia sulcata*: the origins of desiccation-induced fluorescence quenching. *Plant Physiol* 145:997–1005
- Venturi S, Venturi M (1999) Iodide, thyroid and stomach carcinogenesis: evolutionary story of a primitive antioxidant? *Eur J Endocrinol* 140:371–372
- Venturi S, Donati FM, Venturi A, Venturi M (2000) Environmental iodine deficiency: a challenge to the evolution of terrestrial life? *Thyroid* 10:727–729





*Xanthoria parietina*

### 3.2. Survey of the occurrence of desiccation-induced quenching of basal fluorescence in 28 species of green microalgae

Paul Christian Wieners<sup>1</sup> · Opayi Mudimu<sup>1</sup> · Wolfgang Bilger<sup>1</sup>

Received: 19 December 2017 / Accepted: 22 May 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

#### Abstract

#### Main conclusion

Desiccation-induced chlorophyll fluorescence quenching seems to be an indispensable part of desiccation resistance in the surveyed 28 green microalgal species.

Lichens are desiccation tolerant meta-organisms. In the desiccated state photosynthesis is inhibited rendering the photobionts potentially sensitive to photoinhibition. As a photoprotective mechanism, strong non-radiative dissipation of absorbed light leading to quenching of chlorophyll fluorescence has been proposed. Desiccation-induced quenching affects not only variable fluorescence, but also the so-called basal fluorescence,  $F_0$ . This phenomenon is well-known for intact lichens and some free living aero-terrestrial algae, but it was often absent in isolated lichen algae.

Therefore, a thorough screening for the appearance of desiccation-induced quenching was undertaken with 13 different aero-terrestrial microalgal species and lichen photobionts. They were compared with 15 aquatic green microalgal species, among them also three marine species.

We asked the following questions: Do isolated lichen algae show desiccation-induced quenching? Are aero-terrestrial al-

gae different in this respect to aquatic algae and is the potential for desiccation-induced quenching coupled to desiccation tolerance? How variable is desiccation-induced quenching among species? Most of the aero-terrestrial algae, including all lichen photobionts, showed desiccation-induced quenching, although highly variable in extent, whereas most of the aquatic algae did not. All algae displaying quenching were also desiccation tolerant, whereas all algae unable to perform desiccation-induced quenching were desiccation intolerant. Desiccation-induced fluorescence quenching seems to be an indispensable part of desiccation resistance in the investigated species.

#### Keywords

Aero-terrestrial algae · Desiccation tolerance · Lichens · Photobionts · Photoprotection

#### Abbreviations

$q_{des}$	Desiccation-induced chlorophyll fluorescence quenching
r.h.	Relative air humidity
SAG	Culture Collection of Algae at the University of Göttingen, Catalogue Number

---

## Introduction

Lichens and aero-terrestrial algae can be found in nearly all habitats on land and in some of these they are substantial primary producers (Sancho et al. 2016). In contrast to higher plants, lichens (Kranner et al. 2008), mosses (Proctor et al. 2007) and algae (Holzinger and Karsten 2013) lack the ability for transport of water and nutrients over longer distances via roots or are unable to control the evaporative loss of water. Because of these reasons lichens and aero-terrestrial algae are exposed to the fluctuations of availability of water in their environment and have to cope with periods of total desiccation.

Desiccation tolerance has been defined as the ability to withstand water loss of 90%, which is usually reached at equilibrium with about 50% air humidity (Alpert 2005). In our study, we define desiccation tolerance as the survival of equilibration with 85% air humidity. This may be justified as there are probably only few plants which survive drying at 80% air humidity but not at 50% (Alpert 2005). Desiccation tolerance is well-documented for aero-terrestrial algae and lichens (Lange et al. 1989; Potts 1994, 2001; Potts et al. 2005; Kranner et al. 2003, 2008). In mosses desiccation tolerance is less wide spread (Alpert 2006; Wood 2007). These organisms have developed the ability to enter into the state of cryptobiosis, in which all metabolic activities are interrupted and the cells are able to desiccate completely. In many cases it was reported that microalga can survive very long periods of time in the state of cryptobiosis (Trainor and Gladych 1995).

Desiccation brings with it a lot of serious challenges an organism has to cope with,

starting at the biochemical and molecular level, like the massive increase of oxidative stress (Scheibe and Beck 2011), the absence of hydrating water for macromolecules and membranes, which is not only important for their function but also for their structural integrity (Hoekstra et al. 2001), up to damage at the level of the structure and ultrastructure of the cell (Holzinger et al. 2010, 2011; Karsten and Holzinger 2012; Gasulla et al. 2013). Each of these challenges has to be solved to avoid the death of the organism.

In the desiccated state CO<sub>2</sub> fixation and electron transport are not possible, but chlorophyll is still absorbing light. If the absorbed energy cannot be used or dissipated as heat in a safe way, photoinhibition is the inevitable result (Osmond 1994), which will damage or destroy the photosynthetic apparatus. Therefore, desiccated lichens and aero-terrestrial algae, which do not disassemble their photosynthetic apparatus while desiccated, should be extremely sensitive to light. In contrast to this expectation, those organisms are surprisingly resistant against light stress in the desiccated state (even in combination with further stress factors) (Heber et al. 2000; Green and Proctor 2016). There are several lines of defence in an intact lichen thallus to prevent photodamage, from screening pigments (Gauslaa and Solhaug 2004; Solhaug et al. 2010) and shading by upper layers of the cortex (Dietz et al. 2000; Wu et al. 2014) to changes in the optical properties of the thallus (Veerman et al. 2007) or even the optical properties of the hyphae (Maksimov et al. 2014) during the process of dehydration. While all these mechanisms are reducing light absorbed by chlorophyll, they will not prevent that light can still reach the photobionts (Veerman et al. 2007). In the

absence of electron transport, every photon absorbed by the light harvesting complex will be excessive light and could cause harm (Heber et al. 2001, 2010; Nishiyama et al. 2011; Vass 2011).

One explanation for the observed resistance against photoinhibition in the dry state may lie in non-radiative dissipation (NRD), which channels the absorbed energy from chlorophyll to heat in a harmless way and helps to avoid damage (Heber et al. 2001, 2010; Wieners et al. 2012; Bilger 2014). NRD can be quantified by chlorophyll fluorescence measurements (Krause and Jahns 2004). It has been observed in lichens, mosses and aero-terrestrial green algae and cyanobacteria that a strong reduction of chlorophyll fluorescence emission occurred upon desiccation (Lange et al. 1989; Heber et al. 2000, 2010; Karsten et al. 2014; Bilger 2014; Maksimov et al. 2014; Raanan et al. 2016).

This reduction in fluorescence emission has been verified to result largely from true quenching by Veerman et al. (2007), which was confirmed by other authors (Komura et al. 2010; Miyake et al. 2011). This quenching not only affected maximal fluorescence yield ( $F_M$ ) but also the fluorescence of open reaction centres ( $F_0$ ) in a manner much stronger than maximally observed in higher plants. Therefore, the quenching was considered to be sufficient to compete with charge separation at the reaction centre (Heber et al. 2001). Accordingly, desiccation-induced fluorescence quenching has been interpreted as a photoprotective mechanism (Heber et al. 2001, 2010). In the following, for the sake of simplicity, we refer to the process of desiccation-induced chlorophyll fluorescence quenching with the abbreviation

$q_{des}$ . It should, however, be noted that  $q_{des}$  is not defined here as a quenching coefficient quantifying the extent of quenching.

The photoprotective function of  $q_{des}$  was supported by a strong negative correlation between photoinhibition in the desiccated state and the extent of  $q_{des}$  (Gauslaa and Solhaug 04; Wieners et al. 2012). On one hand, understanding of the mechanism of  $q_{des}$  may serve to explain how photoprotection is accomplished in poikilohydric cryptogams. On the other hand, the extent of  $q_{des}$  may serve as a marker for differences in photoprotective capacity between different species (Deltoro et al. 1998; Barták et al. 2000). The extent of  $q_{des}$  can vary widely between the investigated species and it has been shown in numerous studies with lichens and mosses that desiccation tolerance was highly linked to the presence of  $q_{des}$  (Heber et al. 2001, 2007, 2010).

$q_{des}$  is probably not an essential prerequisite for desiccation tolerance. With other words, there might exist desiccation tolerant algae, which are unable to show  $q_{des}$ . For example, it has been reported that  $q_{des}$  could be observed in freshly isolated lichen algae only in the presence of a fungal metabolite (Kosugi et al. 2013). Therefore, we investigated if we can observe  $q_{des}$  in algae isolated from a lichen and kept in liquid culture for a long time in the absence of the fungal partner. Furthermore, we wanted to know if there is a general correlation between survival of desiccation and  $q_{des}$ . Do algae exist, which display desiccation-induced quenching while being sensitive to desiccation, and even more important, do desiccation resistant species exist which are lacking  $q_{des}$ ? Aero-terrestrial species are probably much more prone to desiccation than aquatic spe-

---

cies. However, aquatic habitats may also occasionally desiccate and there are environments found with a continuously very high air humidity harbouring desiccation sensitive lichens (Green et al. 1991). Therefore, we asked if there is a correlation between the occurrence of  $q_{des}$  and the aero-terrestrial lifestyle.

The variability of desiccation tolerance among lichens is high possibly due to their high phylogenetic diversity. Considering the photobionts, the situation is similar (DePriest 2004). In general it is important to remember that algae display a much higher genetic variability than higher plants do (Sun et al. 2016). Therefore, we asked if there was a strong diversity in  $q_{des}$  between different taxa, not only between the functional groups of aero-terrestrial and aquatic algae, but also within these groups among species belonging to different higher systematic units.

To answer these questions we followed chlorophyll fluorescence kinetics of a wide variety of green microalgae over the full time period of desiccation and over a period of rehydration in air of 100% humidity. 13 aero-terrestrial (usually lichenised or free living) microalgae species and 15 aquatic species, among them also two obligate marine species, were investigated.

## Materials and methods

### Algae strains

The species of algae used in the experiments were obtained from SAG Culture Collection of Algae (Göttingen, Germany) and are listed in Table 1. All of them belong to the division Chlorophyta except *Euglena gracilis*, which belongs to Euglenophyta.

Following information provided by the SAG Culture Collection of Algae (SAG database 2017), the species were sorted into four different groups related to their habitat. 13 species were aero-terrestrial, among them 9 species isolated from lichen symbioses. 3 of the aquatic species were of marine origin. Time courses of chlorophyll fluorescence during desiccation were analysed in more detail under different humidity regimes using only *Trebouxia asymmetrica* Friedl et Gärtner (SAG 48.88). *Chlorella vulgaris* Beijerinck (SAG 211-21b), a fresh water species with no known ability to resist desiccation, was used as a reference organism for these experiments.

### Culture media and culture conditions

The algae were cultivated in 200 ml cell culture flasks (Grainer-bio-one Cellstar with filter, Grainer GmbH, Kremsmünster, Austria) at 20° C and a PFD of 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  under a 16 h light 8 h dark cycle for three weeks before the experiments. The flasks were closed with hydrophobic membrane filters to allow gas exchange with minimal water loss. The cell density was kept low to minimize mutual shading of the algae. The culture was shaken once a day to avoid formation of a biofilm at the bottom of the flask.

The algae were grown in Bold's Basal Medium with vitamins (BBM + V, Starr and Zeikus 1993). Marine algae were cultivated in Artificial Seawater Medium (ASM 30, Starr and Zeikus 1993). All necessary chemicals were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

**Table 1** Used strains of algae

Strain number	Species	Class	General habit
SAG 213-1b	<i>Asterochloris irregularis</i>	Trebouxiophyceae	Photobiont of <i>Physcia parietina</i>
SAG 32.85	<i>Asterochloris erici</i>	Trebouxiophyceae	Photobiont of <i>Cladonia cristatella</i>
SAG 100.80	<i>Asterochloris glomerata</i>	Trebouxiophyceae	Photobiont of <i>Cladonia spec.</i>
SAG 216-5	<i>Coccomyxa peltigerae</i>	Trebouxiophyceae	Photobiont of <i>Peltigera aphthosa</i>
SAG 65.87	<i>Pseudochlorella pringsheimii</i>	Trebouxiophyceae	Photobiont of <i>Woessia fusarioides</i>
SAG 219-1d	<i>Trebouxia aggregata</i>	Trebouxiophyceae	Photobiont of <i>Xanthoria parietina</i>
SAG 48:88	<i>Trebouxia asymmetrica</i>	Trebouxiophyceae	Photobiont of <i>Diploschistes albescens</i>
SAG 2103	<i>Trebouxia jamesii</i>	Trebouxiophyceae	Photobiont of <i>Schaereria tenebrosa</i>
SAG 2009	<i>Trebouxia showmanii</i>	Trebouxiophyceae	Photobiont of <i>Lecanora hageni</i>
SAG 247-1b	<i>Actinochloris terrestris</i>	Chlorophyceae	Soil
SAG 2037	<i>Apatococcus lobatus</i>	Trebouxiophyceae	Subaerial
SAG 11-32aM	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlorophyceae	Soil
SAG 48.86	<i>Diplosphaera mucosa</i>	Trebouxiophyceae	Subaerial
SAG 211-8 k	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Trebouxiophyceae	Freshwater
SAG 211-11b	<i>Chlorella vulgaris</i>	Trebouxiophyceae	Freshwater
SAG 251-2	<i>Choricystis spec.</i>	Trebouxiophyceae	Freshwater
SAG 276-4e	<i>Desmodesmus armatus</i>	Chlorophyceae	Freshwater
SAG 276-4e	<i>Desmodesmus communis</i>	Chlorophyceae	Freshwater
SAG 1224-5/25	<i>Euglena gracilis</i>	Euglenophyceae	Freshwater
SAG 57.9	<i>Geminella spec.</i>	Chlorophyceae	Freshwater
SAG 192.80	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Chlorophyceae	Freshwater
SAG 211-3	<i>Heterochlorella luteoviridis</i>	Trebouxiophyceae	Freshwater
SAG 38.81	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Chlorophyceae	Freshwater
SAG 5.95	<i>Scenedesmus rubescens</i>	Chlorophyceae	Freshwater
SAG 379-4	<i>Stichococcus fragilis</i>	Trebouxiophyceae	Freshwater
SAG 9.86	<i>Chlorella stigmatophora</i>	Trebouxiophyceae	Marine
SAG 184.80	<i>Dunaliella salina</i>	Chlorophyceae	Marine
SAG 1.99	<i>Oocystis heteromucosa</i>	Trebouxiophyceae	Freshwater/marine

Classification and habitat information were obtained from SAG

## Desiccation treatment

After removal from the culture flasks, the algae were concentrated by centrifugation at moderate speed (190g, 15 min) and their concentration subsequently adjusted to an optical density of 1.0 at 750 nm as determined in a spectrophotometer (Uvikon 922, Kontron, Milano, Italy). Prior to the further steps, the algal suspension was darkened for 60 min. A transparent Perspex plate (10 cm × 15 cm) with 45 holes of a diameter of 8 mm in 5 rows with a distance of ca. 7 mm between the holes was firmly placed on top of 2 pieces of filter paper (about 5 × 8 cm) (NM 615, Macherey–Nagel, Düren, Germany). Below the filter papers, several layers of lab paper towels were placed. Two times 1

ml of the algal suspension was pipetted in 10 holes of the plate. After the medium was taken up by the lab paper homogeneous algal samples with similar number of cells per area remained. To avoid too dense spacing of the samples only 10 holes of the plate were used in a single experiment. To obtain homogeneous humidity conditions for all samples additional medium was added to the samples until the whole filter paper was evenly soaked with medium also between the holes. The amount of algae used was sufficient to saturate the fluorescence signal such that further addition of algae did not increase fluorescence intensity.

On each filter paper 5 samples of one species were placed. In each experiment 2 filter papers, i.e., 2 different species were

---

used. After application of the algae the filter papers were placed in an air tight polypropylene chamber (Emsa, Emsdetten, Germany) on a grid (Lock & Lock, Seoul, South Korea) which was about 3 cm above a concentrated salt solution in the bottom of the chamber.

The previously used Perspex plate was fixed using rubber bands on top of the lid of the chamber and the paper filters were arranged such that each of the algae patches corresponded again exactly to a hole in the plate. The humidity of air over such a salt solution is constant at a given temperature (Winston and Bates 1960). A small fan (Arctic F8 Rev 2, Arctic GmbH, Braunschweig, Germany; 6 cm diameter) was installed in the chamber for mixing the air to avoid the formation of a humidity gradient.

The stream of air circulated around the filter paper through the gaps between the filters and the walls of the box. A sensor for humidity and temperature (TFA 30.5040.01, TFA Dorstmann GmbH & Co KG, Wertheim, Germany) was arranged under the grid near the samples. Time courses of relative air humidity (r.h.) as determined by this sensor are shown in Fig. 3. It can be seen that full equilibration of the air with the salt solution occurred within about 1 h. The fibre optics of a PAM 2000 fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) fitted exactly in the holes of the Perspex plate above the lid of the chamber so that chlorophyll fluorescence could be measured without opening the chamber.

Minimal fluorescence yield,  $F_0$ , was measured using a weak excitation beam ( $0.05 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and maximal fluorescence yield,  $F_M$ , was determined by the application of a saturating light pulse of an irradiance of  $2000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$

and a duration of 0.5 s. Measurements started as soon as possible after closure of the chamber. During the time course of desiccation and rehydration, measurements of  $F_0$  and  $F_M$  were taken every 15 min. During the first 8 h and from 22 to 30 h, from 46 to 54 h and at 61 h, the fibre optics was moved to all 10 samples in the chamber in a defined pattern. In the remaining time only a single sample was measured automatically. That

means short before and during the times of relatively rapid fluorescence changes upon shifts in the humidity averages of 5 samples of the same species could be calculated. For each species, 3 independent experiments were run. First, averages for the single experiments were calculated and subsequently the means and standard deviations shown in Table 2 were calculated from the 3 averages.

Because of the construction of the experimental chamber, the distance between the fibre optics and the samples stayed constant for the duration of the whole experiment. This way  $F_0$  and  $F_M$  could be compared directly between different measurements and even between different experiments. Desiccation always took place in total darkness and except for the weak measuring light and saturating light pulses the samples were not exposed to light. Every 15 min the fibre optics was moved to each sample in a specific pattern and saturation pulses were applied for determination of the photosynthetic efficiency in the dark adapted state ( $F_v/F_M$ ). For the first desiccation phase, saturated  $\text{NaNO}_3$  (Merck) solution including precipitated  $\text{NaNO}_3$  was used.

This solution generated a stable air humidity of 92% at 25 °C (Winston and Bates 1960; Bowler et al. 2017). The fan was ne-

**Table 2**

Results of the chlorophyll fluorescence measurements of the used strains during the standard desiccation and rehydration cycle (Fig. 4)

Species	$F_V/F_M$ start	SD	$F_V/F_M$ 24 h	SD	$F_V/F_M$ 48 h	SD	$F_V/F_M$ rewet	SD	$F_{Odry}/F_{Owet}$	SD
<i>A. erici</i>	0.407	0.109	0.013	0.004	0.619	0.166	0.371	0.141	0.627	0.023
<i>A. glomerata</i>	0.453	0.118	0.018	0.006	0.610	0.158	0.444	0.116	0.608	0.025
<i>A. irregularis</i>	0.418	0.112	0.017	0.005	0.607	0.163	0.413	0.111	0.503	0.025
<i>C. peltigerae</i>	0.419	0.109	0.014	0.005	0.598	0.155	0.405	0.105	0.740	0.026
<i>P. pringsheimii</i>	0.413	0.107	0.014	0.004	0.586	0.152	0.383	0.099	0.693	0.027
<i>T. aggregata</i>	0.427	0.111	0.013	0.004	0.598	0.155	0.413	0.107	0.516	0.027
<i>T. asymmetrica</i>	0.408	0.106	0.015	0.005	0.616	0.160	0.393	0.102	0.536	0.023
<i>T. jamesii</i>	0.407	0.106	0.016	0.005	0.614	0.160	0.397	0.103	0.540	0.024
<i>T. showmanii</i>	0.435	0.113	0.014	0.004	0.612	0.159	0.423	0.110	0.559	0.022
<i>A. terrestris</i>	0.485	0.126	0.017	0.006	0.574	0.149	0.479	0.124	0.302	0.014
<i>A. lobatus</i>	0.390	0.101	0.014	0.004	0.605	0.157	0.374	0.097	0.225	0.012
<i>C. reinhardtii</i>	0.505	0.130	0.125	0.032	0.109	0.028	0.020	0.005	1.070	0.014
<i>D. mucosa</i>	0.425	0.111	0.016	0.005	0.593	0.154	0.411	0.107	0.478	0.022
<i>C. sorokiniana</i>	0.602	0.155	0.145	0.037	0.122	0.032	0.060	0.016	1.071	0.013
<i>C. vulgaris</i>	0.599	0.155	0.115	0.030	0.104	0.027	0.016	0.004	1.095	0.007
<i>Choricystis spec</i>	0.511	0.132	0.129	0.033	0.114	0.030	0.013	0.003	1.118	0.017
<i>D. armatus</i>	0.647	0.167	0.133	0.034	0.128	0.033	0.000	0.005	1.234	0.013
<i>D. communis</i>	0.473	0.123	0.033	0.009	0.292	0.076	0.445	0.116	0.492	0.021
<i>E. gracilis</i>	0.568	0.147	0.136	0.035	0.118	0.031	0.034	0.009	1.099	0.008
<i>Geminella spec</i>	0.476	0.123	0.129	0.034	0.119	0.031	0.039	0.010	1.136	0.013
<i>H. pluvialis</i>	0.604	0.156	0.115	0.030	0.097	0.025	0.000	0.004	1.085	0.010
<i>H. luteoviridis</i>	0.466	0.120	0.108	0.028	0.100	0.026	0.052	0.013	1.201	0.011
<i>S. acuminatus</i>	0.629	0.163	0.108	0.028	0.096	0.025	0.061	0.016	1.154	0.012
<i>S. rubescens</i>	0.573	0.148	0.137	0.036	0.123	0.032	0.049	0.013	1.164	0.010
<i>S. fragilis</i>	0.593	0.153	0.110	0.029	0.101	0.026	0.027	0.007	1.054	0.008
<i>C. stigmatophora</i>	0.529	0.137	0.120	0.031	0.112	0.029	0.023	0.006	1.118	0.012
<i>D. salina</i>	0.501	0.129	0.158	0.041	0.139	0.036	0.036	0.009	1.138	0.011
<i>O. heteromucosa</i>	0.562	0.146	0.028	0.008	0.260	0.068	0.486	0.127	0.700	0.039

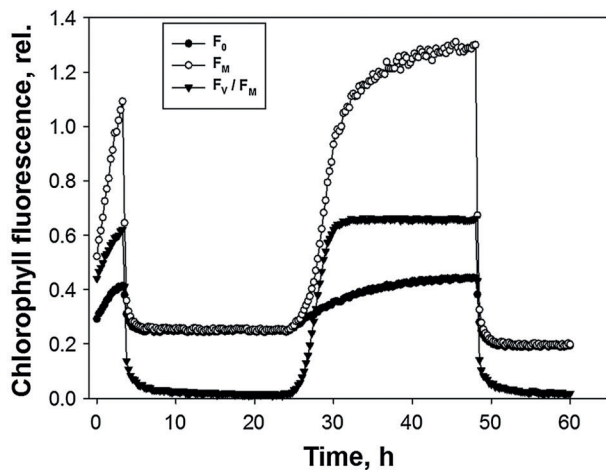
$F_V/F_M$  was determined at the beginning of the desiccation cycle, after 24 h desiccation at 92% r.h., at 48 h at the end of 24 h rehydration at 100% r.h. and after rewetting the algae with liquid water for 1 h in darkness.  $F_{Odry}$  was determined after additional 12 h desiccation at 85%,  $F_{Owet}$  refers to  $F_0$  determined after saturation of the algae at 100% r.h.  $n = 5$ , SD standard deviation

cessary to accelerate the process of equilibration. Humidity was increased to 100% after 24 h by moving lid and grid to a new bottom part filled with distilled water. After 24 h at 100% r.h. the distilled water was changed to a saturated solution of KCl (Merck) using the same procedure, which resulted in an equilibrium of 85% r.h. at 25 °C under the given conditions, starting a second phase of desiccation. During the whole treatment it was taken care that temperature conditions were kept constant. After 12 h at 85% r.h., the samples were hydrated by addition of culture medium onto the filter. After incubation for 1 h  $F_V/F_M$  was measured again. From this value the total damage caused by

desiccation was calculated. In one experiment, saturated NaCl (Merck) was used to create 75% r.h. The experimental setup was optimized using *T. asymmetrica*, an alga from which its ability to show  $q_{des}$  was known from preceding experiments, and *C. vulgaris*, which had reproducibly never shown desiccation tolerance. In the next step, this protocol was used to survey a larger number of different algae strains. All graphs were created with SigmaPlot 13 (Systat Software Inc. Chicago, Illinois).

## Results



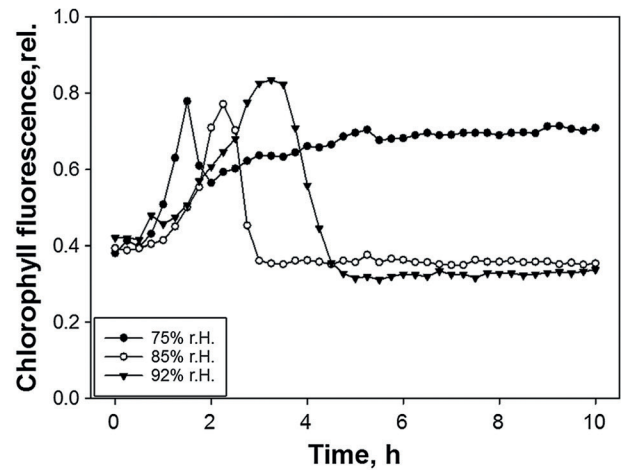


**Fig. 1** Time courses of  $F_0$  (filled circles),  $F_M$  (open circles) and  $F_V/F_M$  (filled triangles) of a single sample of *T. asymmetrica* over the duration of 60 h. Relative humidity started at 92% and was set to 100 and 85% at 24 and 48 h, respectively, using saturated solutions of different salts or distilled water

The treatment of the algae consisted of a 24 h lasting desiccation by exposure to a humidity of 92%, followed by rehydration at 100% for 24 h and a second desiccation at 85%. Figure 1 shows a typical result of the kinetics of chlorophyll fluorescence displayed by *T. asymmetrica* during a full treatment cycle.

At the beginning r.h. was set to 92% by equilibration with a saturated solution of  $\text{NaNO}_3$ . While the liquid water evaporated gradually,  $F_0$  and, even stronger,  $F_M$  increased. This led also to an increase in  $F_V/F_M$ . An initial increase of  $F_0$  under desiccation is well-known from lichens (Heber et al. 2007, 2010). After about 3 h,  $F_0$  and  $F_M$  decreased rapidly to reach a steady state at a low level. Variable chlorophyll fluorescence was very low at this point, causing a very low  $F_V/F_M$ .

When relative humidity was raised to 100%, fluorescence recovered again in a sigmoidal kinetics. After 8 h,  $F_V/F_M$  stayed on a stable level.  $F_0$  and  $F_M$  increased further and reached almost a stable level after 24 h

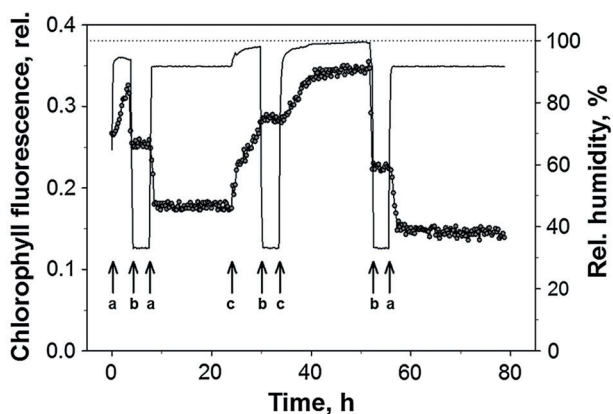


**Fig. 2** Time course of  $F_0$  of different samples of *T. asymmetrica* in air equilibrated with different saturated salt solutions resulting in r.h. of 75% (filled circles), 85% (open circles) and 92% (filled triangles). Typical time courses are shown using a single sample for each experiment

at 100% r.h. The levels of  $F_0$ ,  $F_M$  and  $F_V/F_M$  are comparable to or even higher than at the maximum during the first desiccation.

Lowering the relative humidity to 85% by changing the distilled water to a saturated KCl solution, the second desiccation started without delay with a massive decrease of  $F_0$  and  $F_M$ .  $F_V/F_M$  was not measurable after 10 h. Now  $F_0$  dropped even below the minimum of the first desiccation phase. This may be explained by a greater water loss, since the first desiccation was at 92% r.h., and the second at 85% r.h. However, the same phenomenon was apparent when the same humidity of 92% was used in the first and second desiccation (see also Fig. 3). Hence, one cannot exclude that during the first 48 h of treatment the algae acclimated to desiccation stress.

The fluorescence kinetics during the initial desiccation were strongly dependent on the relative humidity applied and, hence, the rate of desiccation (Fig. 2). The lower the humidity, i.e., the faster the rate of desiccation,



**Fig. 3** The time courses of  $F_0$  (grey circles) of a sample of *T. asymmetrica* and of the relative humidity (continuous line) as measured by a sensor over 80 h. Arrows denote the points of time when relative humidity was changed to the indicated values: a 92% (saturated  $\text{NaNO}_3$ ), b 33% (saturated  $\text{MgCl}_2$ ), c 100% (distilled water). In the beginning the measured r.h. was slightly above the expected equilibrium due to evaporation from the samples. Chlorophyll fluorescence was determined every 15 min without application of saturating light pulses

the faster  $F_0$  rose to the maximal level before it dropped again. However, at the lowest humidity  $F_0$  declined only partially and even slightly rose again with time. Also,  $F_0$  at the intermediate humidity of 85% did not reach the same low level as when desiccation was slowest at 92%. The data strongly suggest that the rate of desiccation has an influence on the final level of  $F_0$ . Since the fluorescence values were not normalized, the similarity of the initial  $F_0$  values indicates the high rise to the maximal level before it dropped again. However, at the lowest humidity  $F_0$  declined only partially and even slightly rose again with time.

Also,  $F_0$  at the intermediate humidity of 85% did not reach the same low level as when desiccation was slowest at 92%. The data strongly suggest that the rate of desiccation has an influence on the final level of  $F_0$ . Since the fluorescence values were not normalized, the similarity of the initial  $F_0$  values indicates the high reproducibility of the measurements, when algae from the same batch and age were used.

From Fig. 2, one may conclude that a certain amount of water in the alga is necessary for the formation of quenching during desiccation and that attainment of the quenching state is a relatively slow process (He-

ber et al. 2006a; Gasulla et al. 2009). These hypotheses are further supported by the experiment shown in Fig. 3. Here, the standard time course was interrupted three times by changing the r.h. to 33% for 3 h 45 min.

Every time when the algae equilibrated to 33% r.h. the change of  $F_0$  was stopped, irrespective of the direction of the change.  $F_0$  stabilized at its current level during the decline caused by equilibration at 92% r.h. and during the rise in response to 100% r.h.. Rapid drying at 33% r.h. apparently removed the water content necessary to allow the quenching process to occur. Upon return to 100% r.h., the rise of  $F_0$  may have been dependent on the rate of water uptake by the algae. However, returning to 92% from 33% caused a decline of  $F_0$  which must have coincided with water uptake. The water content of the algae was probably lowest short after switching to the high humidity, when the rate of quenching formation was fastest. Hence, the rate of the decline of  $F_0$  was obviously not governed by the rate of water loss but by the rate of water uptake and the intrinsic rate of the formation of the quenching mechanism.

After establishment of a rigorous experimental protocol for desiccation and rehydration, also a desiccation sensitive alga, *Chlo-*

*rella vulgaris*, was examined in parallel to *T. asymmetrica* (Fig. 4). As observed before, *C. vulgaris* did not show any  $q_{des}$  but  $F_0$  rather increased upon desiccation (Fig. 4a). Rehydration induced a slow reversal of this increase and a second desiccation failed to reproduce it. PS II quantum yield of *C. vulgaris* did not fall to close to 0 as in *T. asymmetrica* but remained at about 0.12 in the first desiccation (Fig. 4b). There was only a transient recovery from this value upon rehydration before  $F_V/F_M$  fell irreversibly to 0. Interestingly, *C. vulgaris* did not show the increase of  $F_0$  and  $F_V/F_M$  during the first 2 h. Rather,  $F_V/F_M$  of *C. vulgaris* was about as high from the beginning as  $F_V/F_M$  reached by *T. asymmetrica* during rehydration in 100% r.h. Even a rehydration with liquid culture medium at the end of the experiments did not induce any sign of recovery in *C. vulgaris* even after 24 h. This confirms that *C. vulgaris* is not desiccation tolerant.

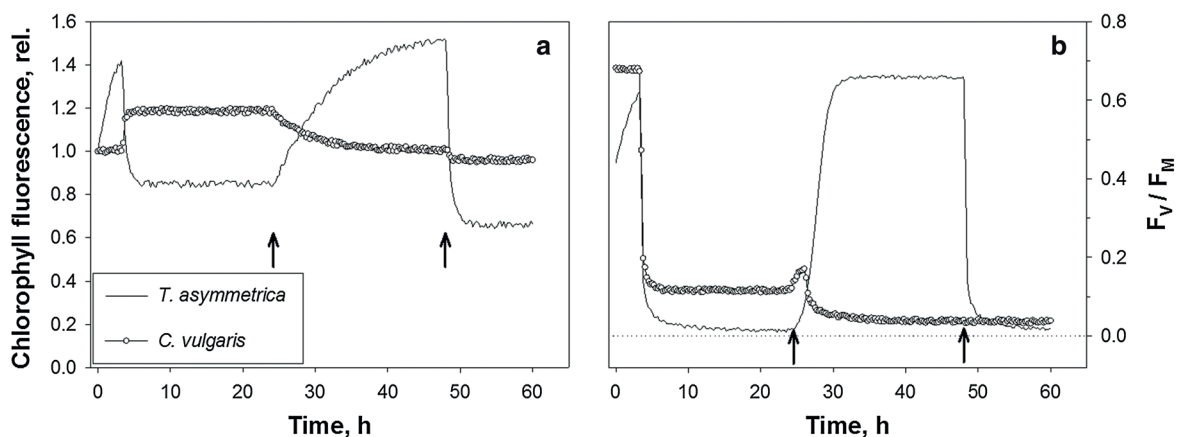
We used this protocol to make a screening of  $q_{des}$  in different strains of algae, comparing aero-terrestrial species, some known for living in lichen symbioses and some free

living, with freshwater species and some marine species.

In Table 2 the results are summarized. Here, the algae are arranged in the same order as in Table 1, beginning with lichen photobionts, followed by free living aero-terrestrial species, freshwater species and marine species. A clear pattern emerged with three notable exceptions. Aero-terrestrial species displayed  $q_{des}$ , had an  $F_V/F_M$  close to zero in the desiccated state but a high  $F_V/F_M$  in the rehydrated state.

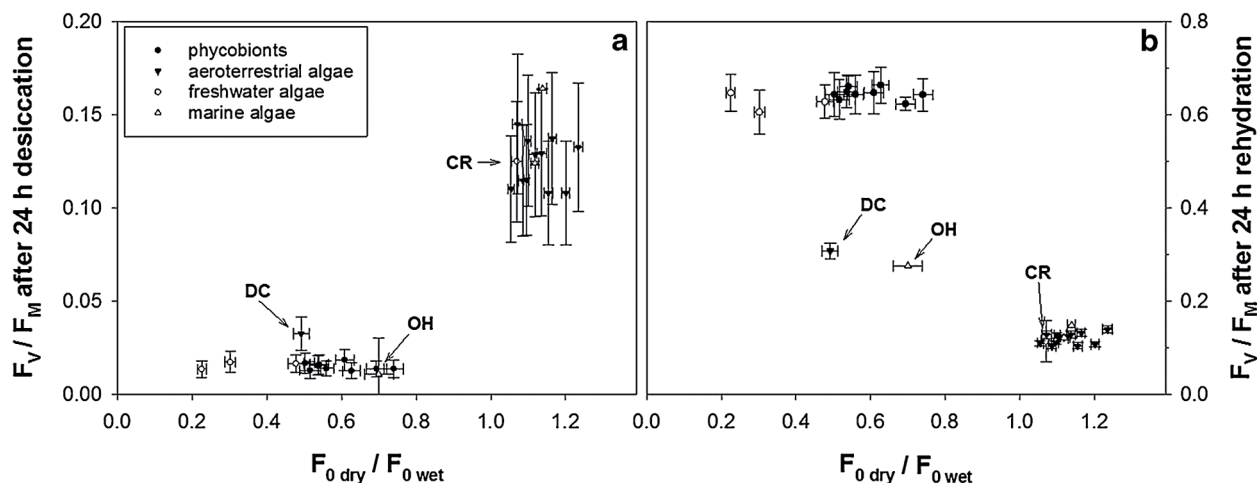
On the other hand, aquatic algae were lacking  $q_{des}$ , did not fully reduce PS II quantum yield in the desiccated state and lost PS II function more or less completely after rehydration. This corresponds to the pattern already displayed by *T. asymmetrica* and *C. vulgaris* in Fig. 4. The three exceptions were *Chlamydomonas reinhardtii* among the aero-terrestrial species, which was desiccation sensitive, and *Desmodesmus communis* as well as *Oocystis heteromucosa* among the aquatic species, which were desiccation tolerant.

Species showing  $q_{des}$  displayed an almost complete loss of PS II quantum yield in



**Fig. 4** Time courses of  $F_0$  (a) and  $F_V/F_M$  (b) of *T. asymmetrica* (line) and *C. vulgaris* (open circles) during desiccation and rehydration treated in parallel in the same experiment. The data for *T. asymmetrica* are shown for comparison and are identical to those

shown in Fig. 2.  $F_0$  of *C. vulgaris* and *T. asymmetrica* were normalized to an initial value of  $F_0$  of 1.0. The relative humidity started at 92% and was changed to 100 and 85% at 24 and 48 h, respectively (arrows)



**Fig. 5** Relationship of  $F_V/F_M$  after 24 h desiccation (a) and of  $F_V/F_M$  after additional 24 h rehydration with water vapour at 100% r.h. (b) to  $F_{0 \text{ dry}}/F_{0 \text{ wet}}$  of photobionts (filled circles), free living aero-terrestrial algae (open circles), freshwater algae (filled triangles) and marine algae (open triangles). For each species 3 independent experiments were conducted with each 5

replicates. Means were calculated over the mean values of each experiment. Error bars denote standard deviations ( $n = 3$ ). 3 species with behaviour deviating from the other species from the same habitat are denoted with letters: CR *Chlamydomonas reinhardtii*, DC *Desmodesmus communis*, OH *Oocystis heteromucosa*

the desiccated state, whereas all species unable to quench  $F_0$  in the dry state were also not able to fully reduce  $F_V/F_M$  (Fig. 5a). When a species survived desiccation, as indicated by a high  $F_V/F_M$  during rehydration, it always showed  $q_{\text{des}}$  (Fig. 5b). Almost all algae with  $F_{0 \text{ dry}}$  below  $F_{0 \text{ wet}}$  had  $F_V/F_M$  values of higher than 0.6 in air of 100% humidity. Only the two aquatic species surviving desiccation at 85% humidity were not able to fully recover at this high humidity and showed  $F_V/F_M$  values of only about 0.3. As aquatic algae they may not have sufficiently low osmotic potentials to take up sufficient water to restore  $F_V/F_M$ . However, these two species regained a PS II quantum yield of about 0.45 after the final rehydration with liquid water.

The overall pattern of the response of PS II to the experimental treatment was highly consistent according to the life style of the algae. Aquatic algae started the cycle with constantly high  $F_0$  and  $F_V/F_M$ , whereas aero-terrestrial algae always showed a more or less expressed transient increase of both

parameters (Table 2).

## Discussion

The time courses of the chlorophyll fluorescence parameters revealed clear differences between the ecological groups of algae, but their features were highly reproducible within the given groups. This is reflected in the data shown in Table 2 where the most important fluorescence parameters at the cardinal time points at the different humidity conditions are summarized. All lichen photobionts and, with the exception of *C. reinhardtii*, all aero-terrestrial free living algae survived not only desiccation at 85% r.h., but also displayed strong  $F_0$  quenching ( $q_{\text{des}}$ ) in the desiccated state coupled with an almost complete loss of PS II quantum yield and recovered fully when exposed to air of 100% humidity. In many publications, Lange and coworkers have shown that green aero-terrestrial algae and lichens containing green algae are able to take up sufficient wa-

---

ter from high humidity to restore photosynthesis (Lange and Kilian 1985; Lange et al. 1989).

If one also includes the two aquatic algae which survived desiccation, it is possible to state that all algae showing  $q_{des}$  also survived desiccation. The reverse statement is also true; all algae showing  $q_{des}$  survived desiccation. This probably does not yet mean that the formation of  $q_{des}$  is a necessary mechanistic requirement for desiccation tolerance itself. But, if mechanisms are present which allow surviving desiccation,  $q_{des}$  seems to be necessary as well. Presumably, there is no natural situation when desiccated algae are not exposed to sunlight.  $q_{des}$  will help to safely dissipate light absorbed by the photosynthetic apparatus of these algae, which otherwise cannot be used for photosynthesis. Previous research has shown that  $q_{des}$  has a protective role against photoinhibition in the dry state (Heber et al. 2001, 2007, 2010; Gasulla et al. 2009; Wieners et al. 2012; Bilger 2014).

Desiccation survival and the presence of  $q_{des}$  followed broadly the lifestyles of the investigated algae: Aero-terrestrial algae were competent for  $q_{des}$  and survived desiccation, while the aquatic algae did not show both features. However, there were three exceptions. *C. reinhardtii* was indicated by SAG as a soil alga, but did not survive desiccation. Presumably, this flagellae bearing species is restricted to rather humid soils. In contrast, the aquatic species *D. communis* and *O. heteromucosa* showed  $q_{des}$  of a reasonable extent and survived desiccation, albeit with only about 50% recovery of the initial value of  $F_v/F_m$  after rehydration in air as well as with liquid water (Fig. 5b and Table 2). It is probable that these two species may

not survive a stronger desiccation than that experienced here. *D. communis* is known as freshwater species, indicating low dissolved inorganic nitrogen and high total soluble solids (Wu et al. 2011). *O. heteromucosa* is indicated by SAG as a potentially marine species. It was originally isolated from a lake in Peru. This information is too little to infer a potential ecological advantage of a reduced desiccation sensitivity.

The different algal strains showed a wide variety in the extent of  $q_{des}$ , ranging from a relative  $F_0$  in the dry state of 0.74–0.22 (Table 2, Fig. 5). This difference had no consequence for survival under our experimental conditions, but might strongly affect photoinhibition under natural conditions. It may be significant that the largest  $q_{des}$  values were observed in free living algae, whereas lichen photobionts, which profit from additional photoprotection by the fungal partner, showed quenching of an extent of not more than 50%. Of the two aquatic species, *O. heteromucosa*, which was designated as being able to live in freshwater and saline water, showed also only 30% quenching.

In the group of the green algae, which were tolerant to the desiccation treatment, fluorescence kinetics was presumably dominated by the induction and release of the process causing strong non-photochemical quenching. The only exception was the initial rise of  $F_0$  and  $F_m$  to a transient maximum. This rise could be observed in all aero-terrestrial algae with the exception of *C. reinhardtii* and was absent in all aquatic species, including the two desiccation tolerant species (Table 2 and data not shown). The rise itself was dependent on the rate of desiccation (Fig. 2) which indicates that it was caused by loss of water from the algal sample, may it be exter-

---

nal medium or cellular water. However, the reasons for the low values of  $F_0$  and  $F_M$  in the culture medium are unclear. It may be that aero-terrestrial algae are not adapted to grow in liquid media.

Many hypotheses exist to explain the mechanism leading to  $q_{des}$  (Heber et al. 2007, 2010; Heber 2008; Yamakawa et al. 2012, 2018; Slavov et al. 2013; Bilger 2014). A mechanistic interpretation of the fluorescence kinetics is out of the scope of this paper. However, the sensitivity of the fluorescence response to the rate of desiccation supports previous hypotheses that a conformational change is necessary for the formation of the quenching state. The formation of this state is apparently a slow process which must take place when still a certain amount of water is remaining in the algae. The fact that it is stopped when water content fell below a certain critical value indicates that quenching is not simply physically dependent on the water content of the algae. It has been shown previously that the rate of desiccation is important for the survival of pre-akinetes of *Zygnema* sp. (Pichrtová et al. 2014).

In the desiccation sensitive algae, the rise of  $F_0$  in the dry state may be interpreted as being caused by a loss of photochemical quenching, or with other words, by the reduction of the primary acceptor of PS II,  $Q_A$ . This could be explained by the continuing function of PS II, as indicated by positive values of  $F_V/F_M$ , and a presumed loss of carbon fixation and electron transport in the dry state. Upon transfer to 100% humidity  $F_V/F_M$  started to rise again whereas  $F_0$  declined, presumably due to an increase in photochemical quenching. However, the increase in  $F_V/F_M$  was only transient, probably caused by a loss in cellular integrity.

Isolated lichen photobionts have been investigated before for  $q_{des}$ , however, with contradictory results (Gasulla et al. 2009; del Hoyo et al. 2010; Kosugi et al. 2013; Carniel et al. 2015). Quite often, no or only little  $q_{des}$  was observed (Kranter et al. 2005; Kosugi et al. 2009, 2013). Our data clearly show that the ability to show  $q_{des}$  is no special feature of lichen symbioses, but isolated photobionts are capable of  $q_{des}$ , if the experimental conditions are suitable. This has also been shown by other authors (Gasulla et al. 2009, 2013; del Hoyo et al. 2010; Carniel et al. 2015). Therefore, it can be excluded with high probability that any metabolite produced from the mycobiont is required for desiccation resistance or  $q_{des}$  in general, but it may be possible, that those substances have an amplifying and/or accelerating effect on  $q_{des}$  (Kosugi et al. 2013).

One reason for the heterogeneity of results concerning the presence of  $q_{des}$  in other publications may lie in the methodology.  $q_{des}$  has to be calculated by comparison of  $F_0$  in the desiccated state to a reference value in the hydrated state. Our results show that neither the starting point after the preparation of the samples nor the transient maximum of  $F_0$  during the first desiccation are very good points of reference for the measurement of  $q_{des}$ . At the beginning of desiccation no true steady state of  $F_0$  was achieved. Instead, it was slowly, but continuously increasing (Fig. 1). The (first) maximum during desiccation, which was used in the past as a reference point for experiments with intact lichen thalli (Heber et al. 2007) can be very variable, too, and was highly influenced by the rate of desiccation (Fig. 2). This is especially important if measurements are not extended over several hours. In our experiments with de-

---

siccation tolerant algae the extended stable phase after rehydration with water saturated air was a much more reliable point of reference. In this phase  $F_V/F_M$  had its maximum, so the time course of  $F_V/F_M$  may be a good indicator for choosing a useful point of reference. For the desiccation sensitive algae, we can choose similar criteria. *C. vulgaris* showed its maximum  $F_V/F_M$  at the start of the desiccation process. At this time point not only  $F_V/F_M$  but also  $F_0$  were constant. As a general rule it may be useful to take that  $F_0$  value as a point of reference, when  $F_V/F_M$  has reached a maximum. This “rule” worked in both cases, with algae, which have more Trebouxia-like and algae, which have more Chlorella-like properties.

The application of stable humidity conditions was highly important for the reproducibility of the rate of desiccation. It has been reported before that the rate of desiccation can affect the extent of fluorescence quenching (Heber et al. 2006a, 2006b, 2007; Heber 2008; Gasulla et al. 2009). Gasulla et al. (2009) manipulated the extent of quenching by variation in the rate of desiccation to demonstrate a correlation between quenching and photoprotection. In Fig. 3, it is shown that desiccation at the comparatively high relative humidity of 75% was too fast to produce fluorescence quenching.

The time from maximal to minimal fluorescence, indicating the minimal period of water loss from the algal cells, was insufficient when it was in the order of 30 min, but allowed almost maximal quenching when it was more than 45 min. However, it is unclear if the time before the fluorescence peak was reached was also important for attaining the state in which quenching was possible. The fact that the same alga species can show

very different  $q_{des}$ , depending on the rate of desiccation, may explain some of the variability of results in different publications concerning the extent and presence of quenching (del Hoyo et al. 2010; Kosugi et al. 2013; Carniel et al. 2015). When intact lichens are desiccated, the lichen thallus itself could play the role of a buffer, so that the real rate of desiccation for the algae inside the thallus would be much lower than for isolated algae under the same external conditions of relative air humidity and temperature. This conclusion is supported by the observation that the rate of desiccation was dependent on the size of the lichen thallus (Gauslaa et al. 2017). Even for free living aero-terrestrial green algae the size and the structure of the colonies may be of great importance as a protective mechanism against (too fast) desiccation as was suggested by Karsten et al. (2014). Therefore, if investigated under identical humidity, algae in intact lichens may be able to show quenching whereas the isolated alga may do this no longer.

To conclude, we could show that the ability for formation of  $q_{des}$  is very common among lichen photobionts and aero-terrestrial algae and seems to be a critical adaptation to the quick and frequent changes of the availability of water encountered by these organisms in their natural situation as part of a lichen symbiosis or a biological soil crust (Kranmer et al. 2008; Holzinger and Karsten 2013; Green and Proctor 2016). The survival of desiccation and desiccation-induced fluorescence quenching were tightly coupled in the 28 algal species investigated, indicating that the latter function may be indispensable for desiccation tolerance.

**Author contribution statement** PCW and WB conceived and designed the research.

The algae were cultivated by PCW and OM. PCW conducted the experiments and analysed the data. PCW wrote the manuscript and PCW and WB edited the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

## References

- Alpert P (2005) The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integr Comp Biol* 45:685–695
- Alpert P (2006) Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *J Exp Biol* 209:1575–1584. <https://doi.org/10.1242/jeb.02179>
- Barták M, Hájek J, Gloser J (2000) Heterogeneity of chlorophyll fluorescence over thalli of several foliose macrolichens exposed to adverse environmental factors: interspecific differences as related to thallus hydration and high irradiance. *Photosynthetica* 38:531–537. [https://doi.org/10.1023/A:10124\\_05306\\_648](https://doi.org/10.1023/A:10124_05306_648)
- Bilger W (2014) Desiccation-induced quenching of chlorophyll fluorescence in cryptogams. In: Demmig-Adams B, Garab G, Adams WA III, Govindjee (eds) Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 409–420
- Bowler MG, Bowler DR, Bowler MW (2017) Raoult's law revisited: accurately predicting equilibrium relative humidity points for humidity control experiments. *J Appl Crystallogr* 50:631–638
- Carniel F, Zanelli D, Bertuzzi S, Tretiach M (2015) Desiccation tolerance and lichenization: a case study with the aeroterrestrial microalga *Trebouxia* sp. (Chlorophyta). *Planta* 242:493–505. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2319-z>
- del Hoyo A, Álvarez R, del Campo EM, Gasulla F, Barreno E, Casano LM (2010) Oxidative stress induces distinct physiological responses in the two *Trebouxia* phycobionts of the lichen *Ramalina farinacea*. *Ann Bot* 107:109–118. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq206> [print version in *Ann Bot* 2011; epub 2010 provided by doi]
- Deltoro VI, Calatayud A, Gimeno C, Barreno E (1998) Water relations, chlorophyll fluorescence, and membrane permeability during desiccation in bryophytes from xeric, mesic, and hydric environments. *Can J Bot* 76:1923–1929. <https://doi.org/10.1139/b98-167>
- DePriest PT (2004) Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986–2001. *Annu Rev Microbiol* 58:273–301. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123730>
- Dietz S, Büdel B, Lange O, Bilger W (2000) Transmittance of light through the cortex of lichens from contrasting habitats. In: Schroeter B, Schlenzorg M, Green TGA (eds) New aspects in cryptogamic research: contribution in honour of Ludger Kappen. *Bibliotheca Lichenologica* 75:171–182
- Gasulla F, de Nova PG, Esteban-Carrasco A, Zapata JM, Barreno E, Guera A (2009) Dehydration rate and time of desiccation affect recovery of the lichenic algae *Trebouxia erici*: alternative and classical protective mechanisms. *Planta* 231:195–208. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1019-y>
- Gasulla F, Jain R, Barreno E et al (2013) The response of *Asterochloris erici* (Ahmadjian) Skaloud et Peksa to desiccation: a proteomic approach. *Plant, Cell Environ* 36:1363–1378
- Gauslaa Y, Solhaug KA (2004) Photoinhibition in lichens depends on cortical characteristics and hydration. *Lichenol* 36:133–143. [https://doi.org/10.1017/S0024\\_28290\\_40140\\_45](https://doi.org/10.1017/S0024_28290_40140_45)
- Gauslaa Y, Solhaug KA, Longinotti S (2017) Functional traits prolonging photosynthetically active periods in epiphytic cephalolichens during desiccation. *Environ Exp Bot* 141:83–91. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.07.005>
- Green TGA, Proctor MCF (2016) Physiology of photosynthetic organisms within biological soil crusts: their adaptation, flexibility, and plasticity. In: Weber B, Büdel B, Belnap J (eds) Biological soil crusts: an organizing principle in drylands. Springer International Publishing, Berlin, pp 347–381
- Green TGA, Kilian E, Lange OL (1991) *Pseudocyphellaria dissimilis*: a desiccation-sensitive, highly shade-adapted lichen from New Zealand. *Oecologia* 85:498–503. [https://doi.org/10.1007/BF003\\_23761](https://doi.org/10.1007/BF003_23761)
- Heber U (2008) Photoprotection of green plants: a mechanism of ultra-fast thermal energy dissipation in desiccated lichens. *Planta* 228:641–650. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0766-5>
- Heber U, Bilger W, Bligny R, Lange OL (2000) Phototolerance of lichens, mosses and higher plants in an alpine environment: analysis of photo-reactions. *Planta* 211:770–780. <https://doi.org/10.1007/s004250000356>
- Heber U, Bukhov NG, Shuvalov VA, Kobayashi Y, Lange OL (2001) Protection of the photosynthetic apparatus against damage by excessive illumination in homoiohydric leaves and poikilohydric mosses and lichens. *J Exp Bot* 52:1999–2006
- Heber U, Bilger W, Shuvalov VA (2006a) Thermal



- energy dissipation in reaction centres and in the antenna of photosystem II protects desiccated poikilohydric mosses against photo-oxidation. *J Exp Bot* 57:2993–3006
- Heber U, Lange OL, Shuvalov VA (2006b) Conservation and dissipation of light energy as complementary processes: homoiohydric and poikilohydric autotrophs. *J Exp Bot* 57:1211–1223
- Heber U, Azarkovich M, Shuvalov V (2007) Activation of mechanisms of photoprotection by desiccation and by light: poikilohydric photoautotrophs. *J Exp Bot* 58:2745–2759
- Heber U, Bilger W, Türk R, Lange OL (2010) Photoprotection of reaction centres in photosynthetic organisms: mechanisms of thermal energy dissipation in desiccated thalli of the lichen *Lobaria pulmonaria*. *New Phytol* 185:459–470. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03064.x>
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci* 6:431–438
- Holzinger A, Karsten U (2013) Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms. *Front Plant Sci*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00327>
- Holzinger A, Tschakner A, Remias D (2010) Cytoarchitecture of the desiccation-tolerant green alga *Zygonium ericetorum*. *Protoplasma* 243:15–24. <https://doi.org/10.1007/s00709-009-0048-5>
- Holzinger A, Lütz C, Karsten U (2011) Desiccation stress causes structural and ultrastructural alterations in the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) isolated from an alpine soil crust. *J Phycol* 47:591–602
- Karsten U, Holzinger A (2012) Light, temperature, and desiccation effects on photosynthetic activity, and drought-induced ultrastructural changes in the green alga *Klebsormidium dissectum* (Streptophyta) from a high alpine soil crust. *Microb Ecol* 63:51–63
- Karsten U, Herburger K, Holzinger A (2014) Dehydration, temperature and light tolerance in members of the aeroterrestrial green algal genus *Interfilum* (Streptophyta) from biogeographically different temperate soils. *J Phycol* 50:804–816
- Komura M, Yamagishi A, Shibata Y et al (2010) Mechanism of strong quenching of photosystem II chlorophyll fluorescence under drought stress in a lichen, *Physciella melanchla*, studied by subpicosecond fluorescence spectroscopy. *Biochim Biophys Acta BBA Bioenerg* 1797:331–338. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.11.007>
- Kosugi M, Arita M, Shizuma R, Moriyama Y, Kashino Y, Satoh K (2009) Responses to desiccation stress in lichens are different from those in their photobionts. *Plant Cell Physiol* 50:879–888
- Kosugi M, Miyake H, Yamakawa H, Shibata Y, Miazawa A, Sugimura T, Satoh K, Itoh S, Kashino Y (2013) Arabinol provided by lichenous fungi enhances ability to dissipate excess light energy in a symbiotic green alga under desiccation. *Plant Cell Physiol* 54:1316–1325
- Kranner I, Zorn M, Turk B, Wornik S, Beckett RP, Batic F (2003) Biochemical traits of lichens differing in relative desiccation tolerance. *New Phytol* 160:167–176. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00852.x>
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3141–3146
- Kranner I, Beckett R, Hochman A, Nash TH (2008) Desiccation tolerance in lichens: a review. *Bryol* 111:576–593. <https://doi.org/10.1639/0007-2745-111.4.576>
- Krause GH, Jahns P (2004) Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds) *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 463–495
- Lange O, Kilian E (1985) Reaktivierung der Photosynthese trockener Flechten durch Wasserdampfaufnahme aus dem Luftraum: Art spezifisches unterschiedliches Verhalten. *Flora* 176:7–23
- Lange OL, Bilger W, Rimke S, Schreiber U (1989) Chlorophyll fluorescence of lichens containing green and blue-green algae during hydration by water vapor uptake and by addition of liquid water. *Bot Acta* 102:306–313. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1989.tb00110.x>
- Maksimov E, Schmitt F-J, Tsoraev G et al (2014) Fluorescence quenching in the lichen *Peltigera apt-hosa* due to desiccation. *Plant Physiol Biochem* 81:67–73
- Miyake H, Komura M, Itoh S, Kosugi M, Kashino Y, Satoh K, Shibata Y (2011) Multiple dissipation components of excess light energy in dry lichen revealed by ultrafast fluorescence study at 5 K. *Photosynth Res* 110:39–48. <https://doi.org/10.1007/s11120-011-9691-8>
- Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N (2011) Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiol Plant* 142:35–46. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01457.x>
- Osmond C (1994) What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: Baker NR, Bowyer JR (eds) *Photo-*

- inhibition of photosynthesis from molecular mechanisms to the field. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp 1–24
- Pichrtová M, Kulichova J, Holzinger A (2014) Nitrogen limitation and slow drying induce desiccation tolerance in conjugating green algae (Zygnemataphyceae, Streptophyta) from polar habitats. PLoS One. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111313>
- Potts M (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. Microbiol Rev 58:755–805
- Potts M (2001) Desiccation tolerance: a simple process? Trends Microbiol 9:553–559. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02231-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02231-4)
- Potts M, Slaughter SM, Hunneke F-U, Garst JF, Helm RF (2005) Desiccation tolerance of prokaryotes: application of principles to human cells. Integr Comp Biol 45:800–809
- Proctor MCF, Oliver MJ, Wood AJ, Alpert P, Stark LR, Cleavitt NL, Mishler BD (2007) Desiccation-tolerance in bryophytes: a review. Bryol 110:595–621. doi:10.1639/0007-2745(2007)110[595:dibarr]2.0.co;2
- Raanan H, Oren N, Treves H et al (2016) Towards clarifying what distinguishes cyanobacteria able to resurrect after desiccation from those that cannot: the photosynthetic aspect. Biochim Biophys Acta BBA Bioenerg 1857:715–722
- SAG Database (2017) <http://sagdb.uni-goettingen.de/index.php>. Accessed 24 Aug 2017
- Sancho LG, Belnap J, Colesie C, Raggio J, Weber B (2016) Carbon budgets of biological soil crusts at micro-, meso-, and global scales. In: Weber B, Büdel B, Belnap J (eds) Biological soil crusts: an organizing principle in drylands. Springer International Publishing, Berlin, pp 287–304
- Scheibe R, Beck E (2011) Drought, desiccation, and oxidative stress. In: Lüttge U, Beck E, Bartels D (eds) Plant desiccation tolerance. Springer, Berlin, pp 209–231
- Slavov C, Reus M, Holzwarth AR (2013) Two different mechanisms cooperate in the desiccation-induced excited state quenching in *Parmelia* lichen. J Phys Chem B 117:11326–11336. <https://doi.org/10.1021/jp402881f>
- Solhaug KA, Larsson P, Gauslaa Y (2010) Light screening in lichen cortices can be quantified by chlorophyll fluorescence techniques for both reflecting and absorbing pigments. Planta 231:1003–1011. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1103-3>
- Starr RC, Zeikus JA (1993) UTEX—the culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures. J Phycol 29:1–106
- Sun L, Fang L, Zhang Z, Chang X, Penny D, Zhong B (2016) Chloroplast phylogenomic inference of green algae relationships. Sci Rep 6:20528. <https://doi.org/10.1038/srep20528>
- Trainor FR, Gladych R (1995) Survival of algae in a desiccated soil: a 35-year study. Phycologia 34:191–192. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-34-3-191.1>
- Vass I (2011) Role of charge recombination processes in photodamage and photoprotection of the photosystem II complex. Physiol Plant 142:6–16. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2011.01454.x>
- Veerman J, Vasil'ev S, Paton GD, Ramanauskas J, Bruce D (2007) Photoprotection in the lichen *Parmelia sulcata*: the origins of desiccation-induced fluorescence quenching. Plant Physiol 145:997. <https://doi.org/10.1104/pp.107.106872>
- Wieners PC, Mudimu O, Bilger W (2012) Desiccation-induced nonradiative dissipation in isolated green lichen algae. Photosynth Res 113:239–247. <https://doi.org/10.1007/s11120-012-9771-4>
- Winston PW, Bates DH (1960) Saturated solutions for the control of humidity in biological research. Ecology 41:232–237. <https://doi.org/10.2307/1931961>
- Wood AJ (2007) The nature and distribution of vegetative desiccation tolerance in hornworts, liverworts and mosses. Bryol 110:163–177. doi:10.1639/0007-2745(2007)110[163:ienfib]2.0.co;2
- Wu NC, Schmalz B, Fohrer N (2011) Distribution of phytoplankton in a German lowland river in relation to environmental factors. J Plankton Res 33:807–820
- Wu L, Zhang G, Lan S, Zhang D, Hu C (2014) Longitudinal photosynthetic gradient in crust lichens' thalli. Microb Ecol 67:888–896. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0366-9>
- Yamakawa H, Fukushima Y, Itoh S, Heber U (2012) Three different mechanisms of energy dissipation of a desiccation-tolerant moss serve one common purpose: to protect reaction centres against photo-oxidation. J Exp Bot 63:3765–3775
- Yamakawa H, van Stokkum IHM, Heber U, Itoh S (2018) Mechanisms of drought-induced dissipation of excitation energy in sun- and shade-adapted drought-tolerant mosses studied by fluorescence yield change and global and target analysis of fluorescence decay kinetics. Photosynth Res 135:285–298. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0465-9>



*Xanthoria parietina* & *Lecanora muralis*

### 3.3. The influence of Zn and I on growth and desiccation-induced chlorophyll fluorescence quenching of *Trebouxia asymmetrica*

Paul Christian Wieners<sup>a</sup> · Lena Göthlich<sup>a,b</sup> · Wolfgang Bilger<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Botanical Institute Christian-Albrechts University Kiel,  
Olshausenstraße 40, DE 24098 Kiel, Germany

<sup>b</sup> Biogeochemical Modelling, GEOMAR, Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung Kiel,  
Düsternbrooker Weg 20, 24105 Kiel, Germany

corresponding author: Paul Christian Wieners, e-mail: pwieners@bot.uni-kiel.de

#### Contributions of authors

PCW and WB designed the research, PCW conducted the experiments, PCW and LG analyzed the data, PCW wrote the manuscript, WB, PCW and LG edited the manuscript

#### Abstract

The composition of the growth medium has a major influence on the physiological properties of microalgae. We have previously shown that addition of the trace elements Zn and I enhances desiccation-induced fluorescence quenching ( $q_{des}$ ) in the lichen phycobiont *Trebouxia asymmetrica*.  $q_{des}$  is likely to be an important factor of the tolerance against drought, as it has a protective function against photoinhibition in the dehydrated state of this poikilohydric organism. The influence of the presence of iodine and/or zinc ions in culture media on growth of *T. asymmetrica* and its ability to show  $q_{des}$  were investigated. *T. asymmetrica* was able to grow in seawater and showed enhanced  $q_{des}$  as compared to when grown in the usual Bold's basal growth medium. While artificial sea water had no effect, addition of Zn and

I in the concentrations present in seawater enhanced  $q_{des}$  to almost the same level as observed in natural seawater. The presence of Zn and I also increased growth by the factor of almost 2, thus approximating the growth rate reached in natural sea water. Both effects, enhancement of  $q_{des}$  and of the growth rate were dependent on the simultaneous presence of both elements. Adding only one element at any concentration resulted in no or very little effect on either growth rate or  $q_{des}$ . The mechanism of the action of both elements is unknown. It is possible that the simultaneous presence of I and Zn has a profound effect on the fitness of lichens containing *T. asymmetrica* in nature.

Keywords:

Trace elements, lichen photobiont, photo-protection, chlorophyll fluorescence quenching, desiccation tolerance, growth rate

## 1 Introduction

Lichens and, from an ecological viewpoint, closely related biological soil crusts (Honegger 1991; Chapman and Margulis 1998; Honegger 1998) are capable to withstand long periods of desiccation. To do so, poikilohydric photoautotrophs have to solve a number of problems connected with desiccation, from preventing denaturation of membranes and proteins to protection from oxidative stress (Alpert 2005, 2006; Holzinger and Karsten 2013). One of these aspects is a very effective protection from photoinhibition, because without functional electron transport every light absorbed by chlorophyll is excessive light and its energy has to be dissipated in a safe way as heat to avoid damage to the photosynthetic apparatus (Demmig-Adams and Adams III 1992; Osmond 1994; Ivanov et al. 2008; Ohad et al. 2011).

In lichens, in free living aero terrestrial

algae and in some bryophytes, it was observed that upon desiccation the basal fluorescence of chlorophyll ( $F_0$ ) declined and the variable chlorophyll fluorescence ( $F_V/F_M$ ) nearly disappeared (Lange et al. 1989, Heber et al. 2001). The underlying massive non radiative dissipation (NRD) is supposed to have an important role in photoprotection (Heber et al. 2001, 2010; Veerman et al. 2007; Wieners et al. 2012; Bilger 2014).

Desiccation-induced chlorophyll fluorescence quenching is a common feature of photobionts, many aero terrestrial green algae (Heber et al. 2006b, a; Kranner et al. 2008; Holzinger and Karsten 2013) and cyanobacteria (Bar-Eyal et al. 2015) and has been termed  $q_{des}$  (Wieners et al. 2012; Bilger 2014). In a recent survey of a large number of desiccation sensitive and tolerant algae it has been shown that all investigated algae that were able to survive desiccation at 85% relative humidity showed strong  $q_{des}$  whereas all sensitive algae were completely lacking

## Abbreviations

<b>ASM30</b>	artificial seawater medium, 30 g/l total salt content
<b>BBM+V</b>	Bold's basal medium with additional vitamins
<b><math>F_0</math></b>	fluorescence of open reaction centres
<b><math>F_M</math></b>	maximum fluorescence yield
<b><math>F_V/F_M</math></b>	photosynthetic efficiency in the dark adapted state
<b>NPQ</b>	non photochemical chlorophyll fluorescence quenching
<b>NRD</b>	non radiative dissipation
<b>PFD</b>	photosynthetically active photon flux density (400-700 nm)
<b><math>q_{des}</math></b>	desiccation induced chlorophyll fluorescence quenching
<b>r.h.</b>	relative air humidity
<b><math>r_{max}</math></b>	maximum growth rate
<b>SAG</b>	Culture Collection of Algae at the University of Göttingen (followed by catalogue number)

$q_{des}$  (Wieners et al. 2018).

For further research on the phenomenon of  $q_{des}$ , it is desirable to manipulate its intensity. It was observed that seawater, iodine and zinc ions caused an enhancement of  $q_{des}$  in *Trebouxia asymmetrica*, the photobiont of the lichen *Diploschistes albescens* (Wieners et al. 2012). However the mechanism of the effect of these ions is still unclear.

Only few publications exist on the influence of (trace) metals on the growth of free living algae and lichens. The distribution of some lichen species has been explained by the functions of Cu, Zn, and other trace elements as micronutrients or as potential toxins (Hauck and Huneck 2007; Hauck et al. 2008; Hauck 2008). The influence of metals, especially Zn, on the metabolism of aquatic algae has been reported (Li et al. 2006; Saha et al. 2013; Volland et al. 2014). A deficit of Zn leads to a decrease of growth, chlorophyll content and oxidative stress and to an increase of the carotenoid content (Saha et al. 2013). However, supraoptimal concentrations have major effects on the morphology and physiology of an alga, including a decrease of growth and an increase of lipid peroxidation, leading to destabilization of the chloroplast membrane (Volland et al. 2014). Also an increased production of free radicals was observed (Li et al. 2006).

Also halogens, especially iodine and bromine, play an important role in many marine algae (Küpper et al. 2014, 2018; Küpper 2015). Accumulated iodide has the function as an inorganic antioxidant and is very effective in the detoxification of reactive oxygen species what makes iodine to the simplest antioxidant in a living system (Küpper et al. 2008) analogous to the hypothesis, that iodine had this role in the evolution of the

animal kingdom (Venturi et al. 2000). In the presence of vanadium peroxidase, iodine is able to deplete  $H_2O_2$  very effectively without any organic coenzyme. High concentrations of iodine are also an effective scavenger for ozone.

Phaeophyta and Rhodophyta are well known to contain very high amounts of halogens (Kyllin 1930; Küpper 2015), but their accumulation can also be found in Chlorophyta (Blunt et al. 2009; Cabrita et al. 2010). The role of halogens for lichens is investigated much less, but it is known that lichens accumulate iodine, so that they can be used monitoring  $^{129}I$  emissions (Dailant et al. 2009).

Wieners et al. (2012) showed that growth of algae in the presence of a combination of iodine and zinc increased  $q_{des}$ . However, the concentrations and relative proportions of the two ions required to maximize that effect remained largely unclear. Preliminary observations had indicated that both ions might have also a positive effect on growth. Therefore, growth rates of algae with iodine and zinc as a supplement for the culture medium were determined. Furthermore, we compared the effect of those elements on  $q_{des}$  with that of arabitol, a carbohydrate known for its ability to enhance  $q_{des}$  in isolated lichen algae (Kosugi et al. 2013).

## 2. Material and Methods

### 2.1 Culture media and culture conditions

*Trebouxia asymmetrica* Friedl et Gärtner (Class Trebouxiophyceae, Order Trebouxiales, Family Trebouiaceae) (SAG 48.88) was cultivated in 200 ml cell culture flasks (Grainer-bio-one Cellstar with filter, Grainer GmbH, Kremsmünster, Austria) at 21°C and a PFD of 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  under a 16 h

light 8 h dark cycle. Lamps were warm white fluorescent tubes (Lumilux 58 W Osram AG, München, Germany). The flasks were closed with hydrophobic membrane filters to allow gas exchange with minimal water loss. The culture was shaken once a day in order to avoid formation of a biofilm at the bottom of the flask. The algae were grown in BBM+V medium (Starr and Zeikus 1993). All necessary chemicals were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). In some experiments, algae were cultivated in artificial seawater medium (ASM 30, (Starr and Zeikus 1993)) or in natural sterile filtrated seawater from Helgoland, Germany. ASM30 and seawater were enriched with the following macronutrients in the same concentra-

tions as in BBM+V: N 2.941 mmol/l; P 1.615 mmol/l; K 1.943 mmol/l; S 0.304 mmol/l; Mg 0.304 mmol/l; Ca 0.170 mmol/l. We assumed that these nutrients were present in the original seawater in negligible amounts. To evaluate the effect of varying zinc and iodine concentrations, ZnCl<sub>2</sub> and NaI (both from Merck) were added to the growth medium in order to obtain concentrations in multiples (up to 4) of those of seawater (0.367 and 0.400 μM, respectively (Fuge and Johnson 1986; Nowicki et al. 1994; Fuge and Johnson 2015)). For the treatment with arabinol, algae grown in BBM+V were suspended for 1 h in a 500 mM arabinol solution, before they were washed again in BBM+V to avoid the formation of crystals during desiccation.

**Tab. 1: Concentrations of Zn<sup>2+</sup> and I<sup>-</sup> in the different growth media employed**

<b>Zinc</b>		
<b>relative to seawater</b>	<b>concentration ZnNa<sub>2</sub>, mg/l</b>	<b>concentration Zn<sup>2+</sup>, μmol/l</b>
<b>BBM</b>	0.03	0.22
<b>0.25</b>	0.043	0.312
<b>0.5</b>	0.055	0.404
<b>1</b>	0.08	0.587
<b>2</b>	0.13	0.954
<b>4</b>	0.23	1.688

<b>Iodine</b>		
<b>relative to seawater</b>	<b>concentration NaI, mg/l</b>	<b>concentration I<sup>-</sup>, μmol/l</b>
<b>BBM</b>	0	0
<b>0.25</b>	0.015	0.1
<b>0.5</b>	0.03	0.2
<b>1</b>	0.06	0.4
<b>2</b>	0.12	0.801
<b>4</b>	0.24	1.601

Therefore, only the arabitol taken up by the algae was effective.

## 2.2 Measurement of optical density (OD)

Growth of *T. asymmetrica* in cell culture flasks was determined at an irradiance of  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in a climate chamber at 21°C.

Growth was followed by measuring the optical density of the culture at 720 nm using a custom built apparatus which allowed to measure in situ without opening the flasks. This technique results in a drastically reduced risk of contamination compared with the standard measuring technique for optical density, which commonly comprises opening the flasks to draw a sample. An empty toolbox from a hardware store was used as a dark housing in which the flasks were enclosed for measurements. A halogen light source (Osram Decostar 51s, Osram, Munich, Germany) provided the measuring beam through a hole (diameter 10 mm) in a dark-grey PUR sheath, a long pass red plastic filter (50% transmission at 636nm) and an optical fibre (Avantes FC-UV050-2, Avantes, Oude, Netherlands). Behind the holder for the culture flask the fibre optics covered with a cosine corrector (CC2, Ocean Optics, Largo, United States) was placed, which was connected to a diode array spectroradiometer (D2000, Ocean Optics). The signal determined at 720 nm was compared to the signal obtained with a culture flask with plain medium to calculate optical density.

## 2.3 Growth model

Growth was modelled according to the widely used law of population growth (Verhulst 1838), i.e. the logistic function that de-

scribes the population size  $P$  as a function of time  $t$ :

$$P(t) = \frac{K P_0 e^{r t}}{K + P_0 (e^{r t} - 1)}$$

where

$$\lim_{t \rightarrow \infty} P(t) = K$$

with population size  $P(t)$  being determined by the maximum growth rate  $r_{\text{max}}$ , the carrying capacity  $K$  and the initial population size  $P_0$ .

The data used to fit the model were averages of three replicate growth curves, measured as optical density over time. This resulted in one curve per treatment and hence a total of 37 (36 for the treatments and one for the cultivation in enriched sea water) curves. To fit the model to the data, the measured initial population size  $P_0$  and time  $t$  were used as input. The initial estimate for the carrying capacity  $K$  was the optical density reached one week after the end of the measurement series in the respective treatment. The values for  $r$  and  $K$  were obtained using the Solver analysis tool integrated in MS Excel (Microsoft, Redmond, United States). The GRG (Generalized Reduced Gradient) nonlinear method was used to minimise the difference between the data and the model (calculated as least sum of squares). For the final result, a maximal remaining sum of squares of 0.0005 was accepted.  $P(t)$  represents population size at a given time  $t$ .  $P(0)$  is the population size at the start and  $K$  is the



---

carrying capacity. The constant  $r$  defines the growth rate.

#### 2.4 Chlorophyll fluorescence measurements during desiccation

Chlorophyll fluorescence during desiccation was measured in the same way as described by Wieners et al. 2018 with the following exceptions. For arabitol treatment the growth suspension was centrifuged (700 g, 20°C, 5min) and the algae in the pellet were resuspended in arabitol solution (500 mM, Merck). After one hour the suspension was again centrifuged as above and the arabitol medium replaced by fresh growth medium. The desiccation, rehydration with water vapour and second desiccation as well as the measurement of chlorophyll fluorescence was carried out according to Wieners et al. (2018).

### 3. Results

3.1 Effects of iodine and zinc on the growth of *T. asymmetrica* Addition of iodine and zinc in fractions and multiples of their content in seawater had a strong effect on the growth rate of *T. asymmetrica*. Fig. 1 shows a selection of growth curves for 4 different compositions of the growth medium. The highest growth rate was observed in seawater. A combination of an addition of both zinc and iodine to a final concentration of twice the concentration reported for seawater caused an enhancement of growth that came close to the rate observed in seawater. Addition of iodine alone, even in a concentration equalling 4 times that of seawater, could not enhance growth rate to a level observed when both elements were added.

Maximal cell density was not affected as the fit of all curves showed. No statistically significant differences between all extrapolated or observed maximal ODs were found. The mean of  $K$  was 0.1625 with a standard deviation of 0.0053. This means, the addition of small amounts of zinc and iodine had a strong effect on growth rate  $r$  but not on the carrying capacity  $K$ .

The interaction of iodine and zinc is further illustrated in Fig. 2. Iodine and zinc were added in various combinations to the growth medium. Addition of one species alone resulted only in marginal effects. Since the growth medium contained already 60% of the zinc concentration of seawater (0.22  $\mu$ M), addition of iodine alone showed a slightly larger effect than the addition of zinc alone (Fig. 2). However, when both were added together, the growth rate was considerably enhanced. The presence of both elements in about seawater concentration gave already almost maximal growth. An optimum was reached when both elements were added in a concentration equivalent to the double of that present in seawater. The data show clearly that both elements interacted strongly.

#### 3.2 Effects of iodine, zinc and arabitol on $q_{des}$

In Fig. 3 average time courses of the basal fluorescence  $F_0$  during desiccation over saturated  $\text{NaNO}_3$  solution (94% r.h.), during rehydration at 100 % r.h. with water vapour above distilled water and during a second desiccation at 85% r.h. above a saturated solution of KCl are shown. After an initial increase,  $F_0$  decreased rapidly during desiccation. The treatment with 100% r.h. caused again a rise of  $F_0$ . At the same time, also  $F_v$

$F_M$  increased after the variable chlorophyll fluorescence was nearly completely lost during desiccation (data not shown, see Wieners et al. (2018)). After 24 h of rehydration,  $F_0$  reached a stable state, which was higher than the transient maximum obtained during the first desiccation. Because of its stability and reproducibility this state was chosen as a point of reference for calculation of desiccation-induced quenching of  $F_0$  ( $q_{des}$ ). The decrease of  $F_0$  during the second desiccation at 85% r.h. was stronger than that during the first desiccation. This could have been due to a stronger desiccation at the lower humidity or to an acclimation response of the algae.

Growth of the algae in enriched seawater or medium fortified with zinc and/or iodine or pretreatment of the algae with arabitol did not change the principal time course of fluorescence but decreased the level of  $F_0$  attained in the desiccated state (Fig. 3). As observed with the growth rates, addition of zinc or iodine alone to the growth medium had a much smaller effect than when both were added at the same time. Again, addition of both elements in concentrations of twice that of seawater led to a similar size of the effect as when grown in enriched seawater. Arabitol pretreatment showed an enhancement of  $q_{des}$  comparable to that observed with seawater-grown algae and the combined iodine and zinc treatment in the first desiccation, but not in the second.

Data on the final levels of  $F_0$  attained in both desiccation treatments are summarized in Fig. 4. Means of 3 different experiments with 5 samples each are shown. The low coefficient of variation indicates the high reproducibility of the experiments.

Results of  $q_{des}$  in the second desicca-

tion from experiments in which algae were desiccated which were grown in varying combinations of iodine and/or zinc additions to the growth medium are shown in Fig. 5. A combination of both elements in a concentration twice the concentration found in seawater reduced  $F_0$  maximally. Raising the concentration of one of these elements alone caused again only minor effects.

When comparing Figs. 2 and 5 it becomes apparent that growth and  $q_{des}$  were in a similar way dependent on the concentrations of both ions. Between both variables,  $F_{0des} / F_{0wet}$  and relative growth rate, a tight correlation existed with a correlation coefficient of -0.89 (Fig. 6).

The enhancement of  $q_{des}$  by growth in enriched seawater could have been caused by an osmotic effect due to the high salinity in seawater or by the presence of certain micronutrients. Therefore, the effect of growth in artificial seawater medium (ASM 30), which contains the major ions but no iodine (Starr and Zeikus 1993) was tested. It turned out that  $q_{des}$  was as low as observed when algae were grown in BBM+V (Fig. 7). The addition of zinc and iodine to ASM 30 had the same effect as when the elements were added to the normal growth medium. In contrast, their addition increased  $q_{des}$  in seawater grown algae only slightly.

## 4. Discussion

### 4.1 Enhanced growth rate in presence of $Zn^{2+}$ and $I^-$

Surprisingly, the terrestrial lichen alga *T. asymmetrica* was growing twice as rapid in enriched seawater as in BBM+V, the medium which is normally used to cultivate such algae. While the principal possibility to grow

---

terrestrial algae in salt water has been described before (Klochkova et al. 2006), we observed an even improved growth in seawater. Furthermore, it is shown here for the first time that the positive effect of seawater could be almost mimicked by adding only iodine and zinc in concentrations about twice as that present in seawater (Fig. 1). It has to be stressed that very low absolute concentrations of both elements were sufficient. Concentrations multiple to that known for oceanic seawater were used, i.e., for I<sup>-</sup> 0.40 µmol/L and for Zn<sup>2+</sup> 0.376 µmol/L (Millero et al. 2008).

Zinc is known to be a micronutrient essential for many algae species and is a common ingredient in almost all regular growth-media (Starr and Zeikus 1993; Chadd et al. 1996; Saha et al. 2013). However, the strong influence of iodine on the growth of green algae was not known so far. Halogens are of high biological importance for many marine algae, especial phaeophytes (Küpper et al. 2014; Küpper 2015) but also for chlorophytes (Blunt et al. 2009; Cabrita et al. 2010). The high concentrations of iodine reached in marine algae are well known (Blunt et al. 2009; Cabrita et al. 2010), but the function of iodine in these organisms is still under investigation.

For Phaeophyceae it is known that iodine, its ions and compounds that contain this element are of high importance for various biological processes (Leblanc et al. 2006; Küpper 2015). The oxidative metabolism of Laminariales depends on its presence (Küpper et al. 1998, 2008, 2013) and it was found that iodine is a major inorganic antioxidant in *Laminaria digitata* (Küpper et al. 2008, 2013). Besides, iodine may be important for acclimatisation to hyperosmotic

stress in this kelp alga and may even play an important role in non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching (Nitschke and Stengel 2014). But even the comparably well investigated physiological and likely multifunctional role of iodine in Phaeophyceae remains largely not understood (Küpper et al. 1998; Küpper 2015). Green algae are very distantly related to the Phaeophyceae and therefore any conclusions from *L. digitata* to green algae are, at least, courageous. For green algae in general and lichen photobionts specifically, the role of iodine is mostly unknown, but it has to be mentioned that some lichen species accumulate iodine, as studies about the distribution of iodine isotopes have shown (Daillant et al. 2009). In the present study, both elements influenced only the growth rate and not the carrying capacity. Even when their role in the metabolism of these algae is not clear at the moment, it is not likely that iodine is essential, but it helps these algae to grow faster. We can only speculate on the underlying mechanisms and it is hard to say if this phenomenon may play any role under the conditions of a natural environment.

#### 4.2 Enhanced desiccation-induced fluorescence quenching in the presence of Zn<sup>2+</sup> and I<sup>-</sup>

The positive influence of iodine and zinc on desiccation induced fluorescence quenching was shown previously (Wieners et al. 2012). Here, using an improved experimental setup, we could confirm the results of the earlier experiments with *T. asymmetrica* and characterise the effect of the two elements further. Notably similar to the effect of the addition of Zn<sup>2+</sup> and I<sup>-</sup> on the growth rate, the

largest effect on desiccation induced quenching was also obtained when both ions were present in about equimolar ratios (Figs. 2 and 5). Addition of either ion in the absence or in the presence of minimal concentrations of the other ion had little effect. Doubling the concentration of one ion without a change of the second one had a considerably smaller effect than when the second one was also raised. The positive effect of both ions saturated at about twice the concentration present in seawater.

So far it is unclear by which mechanism the two ions interact in enhancement of  $q_{des}$  and we can only speculate on this issue. Potentially, Zn and/or I have a direct effect on the structure of PS II enabling additional routes of non-radiative dissipation. It is known from experiments in vitro that iodine has the ability to quench fluorescence in presence of zinc (Lebold et al. 2004). In the experiments of these authors, zinc meso tetrakis (4-sulfonatphenyl) porphyrin was imbedded in the “membranes“ of micelles formed of surfactants, constructing an analogue situation as in the thylakoid membranes in chloroplasts. When halide salt solutions were added to this system, the fluorescence emitted by the porphyrin decreased dramatically. Among the added ions, iodine ions showed the strongest effect on the fluorescence (Lebold et al. 2004). The similarities between the structure of the used compound zinc meso tetrakis (4-sulfonatphenyl) porphyrin and chlorophyll are noticeable. Indeed substances like these are used for the development of artificial chemical systems analogous to the biological photosynthesis (Robert 2016).

#### 4.3 Correlation between accelerated growth and enhanced $q_{des}$

The toxic effects of zinc ions to higher plants have been described many times and included often a decrease of  $F_v/F_M$  (Nagajyoti et al. 2010; Vassilev et al. 2011; Kaznina and Titov 2017). However, for these experiments ion concentrations were used about a thousand times higher than in our experiments. Therefore, a toxic effect on *T. asymmetrica* can be excluded, especially in in face of the enhanced growth in the presence of additional zinc in the medium.

The similarity of the effects of  $Zn^{2+}$  and  $I^-$  on both, growth and desiccation-induced quenching, is surprising. It is quite interesting that the enhanced stress resistance in the presence of  $Zn^{2+}$  and  $I^-$  is going hand in hand with an improved growth. This is in contrast to the usual situation where a trade-off is found between stress resistance and growth (Herms and Mattson 1992). There was even a strong correlation between growth and  $q_{des}$  (Fig. 6). At first sight, both processes are not related to each other. Rather, growth ceases when the algae are desiccated and, on the other hand, this form of quenching does not exist in well humidified algae. However, there are numerous observations in lichens which draw a connection between age, growth, vitality and the resistance against desiccation stress. It is long known that the rate of photosynthesis in intact lichen thalli is correlated to their rate of growth and their age. Fast growing and/or young parts of a thallus show higher photosynthetic activity and a higher  $F_v/F_M$  than older and/or not growing parts of a lichen (Moser and Nash 1978; Lechowicz 1983; Barták et al. 2000). In older parts of the thallus the algae do not divide anymore

---

and have a lower vitality (Hill 1989; Armstrong and Smith 1998; Warren and Adams 2001). With aging the resistance against biotic and abiotic stress decreases (Coleman 1986; Stark et al. 2004; Ohe et al. 2005) and the recovery after desiccation is less effective and takes longer (Gasulla Vidal 2009; Phinney et al. 2018). The effect of aging has been observed in cell-cultures and the culture of isolated algae, too (Winokur 1949; Peters et al. 2000; Gasulla Vidal 2009). Therefore, improvement by iodine and zinc of the vitality and growth may lead to enhanced desiccation resistance involving  $q_{des}$  as a protective mechanism.

Growth and  $q_{des}$  were optimal in seawater. The data in Fig. 7 show clearly that the positive effect of seawater on  $q_{des}$  was not due to the macroelements present in seawater, since artificial seawater could not enhance quenching. Addition of  $Zn^{2+}$  and  $I^-$  to BBM medium in the same concentration as in seawater could not cause exactly the same effect as seawater. This indicates that there are other ions present in seawater which may be effective in a similar way. Since at twice the seawater concentration of  $Zn^{2+}$  and  $I^-$  the results obtained in seawater could be almost reached, these unknown ions can apparently be largely replaced by  $Zn^{2+}$  and  $I^-$ .

#### 4.4 Importance of iodine and zinc under natural conditions

A question concerning the results of the experiments with iodine and zinc is obvious: Are the observed reactions of the algae only occurring under experimental conditions or do iodine and zinc play a role under environmental conditions in the field? Our experiments have shown that only very small

amounts of iodine and zinc are necessary to show major effects to  $q_{des}$ . Therefore, under the most environmental conditions it is very likely, that iodine is present (Fuge and Johnson 1986; Shetaya et al. 2012; Fuge and Johnson 2015), especially in maritime habitats (Leblanc et al. 2006).

Zinc, already long known as important micronutrient (Wood and Sibly 1952; Randall and Bouma 1973), is even more omnipresent in natural habitats (Prasad 2008).

Even if iodine was an important abiotic factor for a specific lichen species, natural conditions are so complex that it would be impossible to ascribe the absence of a lichen at a given place to the fact that iodine is lacking at this place. Furthermore, there exist vectors for marine nutrients like seabirds with their droppings, which could transport nutrients from the sea to places far inland (Anderson and Polis 1999; Moss 2017). In addition, the competence of the fungal partner for accumulation and exploitation of nutrients under harsh conditions should not be forgotten. Even if iodine or zinc are not present in solved form or only in very low concentrations in a given habitat, they may be accessible for the mycobiont due to its capacity to accumulate nutrients from the substrate as it is documented for other nutrients (Gadd 2007).

So far, the large majority of microalgae could not be cultivated successfully. Of the estimated 1.2 million algae species living on earth today, there are about 72 000 algae species known to science (Guiry 2012), but only a small fraction of 5 to 10% are possible to cultivate (Dr. Maike Lorenz, personal communication). Most of these cultures are not axenic. A possible explanation for difficulties concerning the cultivation of microal-

---

gae could be that something critical for the development of a given alga strain was missing in the medium. Many of the recipes of common media, used for the cultivation of microalgae, contain compounds of not quite precisely known chemical composition, for example blood-plasma, meat extract and soil-extracts which could be a source for a hidden micronutrient, such as, iodine. Hence, addition of low concentrations of iodine might improve the culture of hitherto uncultivable algal strains.

### **Acknowledgements:**

Regina Wieners-Naumann is thanked for help with the calculation of the growth rates and the interaction analyses. Frank-Pe-

ter Rapp and Hartmut Kaiser helped in the construction of the apparatus for the determination of optical density. We are grateful to Jakob Bilger for helpful discussions.

### **Fundings:**

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## References:

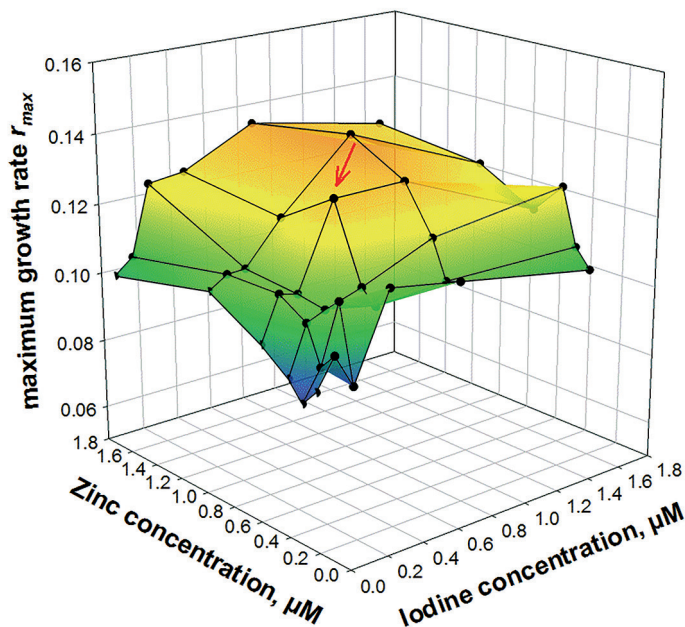
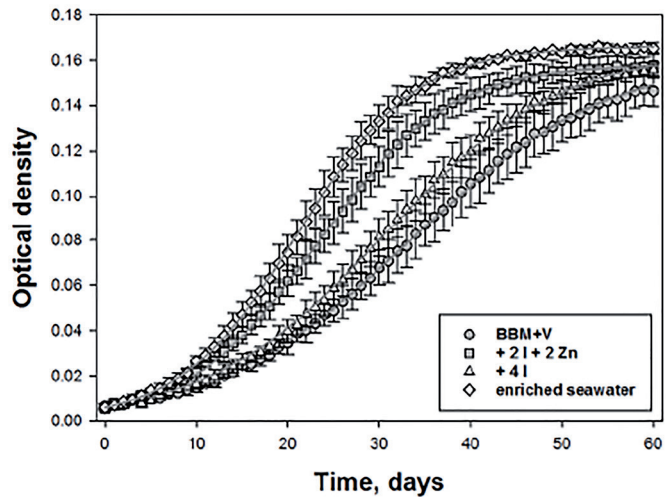
- Alpert P (2005) The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integr Comp Biol* 45:685–695
- Alpert P (2006) Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *J Exp Biol* 209:1575. doi: 10.1242/jeb.02179
- Anderson WB, Polis GA (1999) Nutrient fluxes from water to land: seabirds affect plant nutrient status on Gulf of California islands. *Oecologia* 118:324–332. doi: 10.1007/s004420050733
- Armstrong RA, Smith S (1998) Does radial growth of the lichen *Parmelia conspersa* depend exclusively on growth processes at the lobe tip? *Environ Exp Bot* 39:263–269
- Bar-Eyal L, Eisenberg I, Faust A, Raanan H, Neva R, Rappaport F, Krieger-Liszky A, Setif P, Thurotte A, Reich Z, Kaplan A, Ohad I, Paltiel Y, Keren N (2015) An easily reversible structural change underlies mechanisms enabling desert crust cyanobacteria to survive desiccation. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* 1847:1267–1273. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.07.008
- Barták M, Hájek J, Gloser J (2000) Heterogeneity of chlorophyll fluorescence over thalli of several foliose macrolichens exposed to adverse environmental factors: interspecific differences as related to thallus hydration and high irradiance. *Photosynthetica* 38:531–537
- Bilger W (2014) Desiccation-induced quenching of chlorophyll fluorescence in cryptogams. In: Demmig-Adams B, Garab G, III WA, Govindjee (eds) *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*. Springer Netherlands, Dordrecht, The Netherlands, pp 409–420
- Blunt JW, Copp BR, Hu W-P (2009) Marine natural products. *Nat Prod Rep* 26:170–244
- Cabrita MT, Vale C, Rauter AP (2010) Halogenated compounds from marine algae. *Mar Drugs* 8:2301–2317
- Chadd HE, Newman J, Mann NH, Carr NG (1996) Identification of iron Superoxide dismutase and a copper/zinc Superoxide dismutase enzyme activity within the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH 7803. *FEMS Microbiol Lett* 138:161–165. doi: 10.1016/0378-1097(96)00096-1
- Chapman MJ, Margulis L (1998) Morphogenesis by symbiogenesis. *Int Microbiol* 1:319–326
- Coleman JS (1986) Leaf development and leaf stress: increased susceptibility associated with sink-source transition. *Tree Physiol* 2:289–299
- Dailant OR, Bernollin A, Josset M, Fifield KL (2009) Potential of lichens for monitoring iodine-129 and chlorine-36. *J Radioanal Nucl Chem* 281:241–245. doi: 10.1007/s10967-009-0110-y
- Demmig-Adams B, Adams III W (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Biol* 43:599–626
- Fuge R, Johnson CC (2015) Iodine and human health, the role of environmental geochemistry and diet, a review. *Appl Geochem* 63:282–302
- Fuge R, Johnson CC (1986) The geochemistry of iodine — a review. *Environ Geochem Health* 8:31–54. doi: 10.1007/BF02311063
- Gadd GM (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res* 111:3–49. doi: 10.1016/j.mycres.2006.12.001
- Gasulla Vidal F (2009) Insights on desiccation tolerance of the lichen photobiont *trebouxia* sp. pl. in both thalline and isolated ones. Dissertation, Universitat de València
- Guiry MD (2012) How many species of algae are there? *J Phycol* 48:1057–1063
- Hauck M (2008) Metal homeostasis in *Hypogymnia physodes* is controlled by lichen substances. *Environ Pollut* 153:304–308. doi: 10.1016/j.envpol.2007.08.023
- Hauck M, Huneck S (2007) Lichen Substances Affect Metal Adsorption in *Hypogymnia physodes*. *J Chem Ecol* 33:219–223. doi: 10.1007/s10886-006-9225-6
- Hauck M, Jürgens S-R, Willenbruch K, Huneck S, Leuschner C (2008) Dissociation and metal-binding characteristics of yellow lichen substances suggest a relationship with site preferences of lichens. *Ann Bot* 103:13–22
- Heber U, Bilger W, Shuvalov VA (2006a) Thermal energy dissipation in reaction centres and in the antenna of photosystem II protects desiccated poikilohydric mosses against photo-oxidation. *J Exp Bot* 57:2993–3006
- Heber U, Bilger W, Türk R, Lange OL (2010) Photoprotection of reaction centres in photosynthetic organisms: mechanisms of thermal energy dissipation in desiccated thalli of the lichen *Lobaria pulmonaria*. *New Phytol* 185:459–470. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03064.x
- Heber U, Bukhov NG, Shuvalov VA, Kobayashi Y, Lange OL (2001) Protection of the photosynthetic apparatus against damage by excessive illumination in homoiohydric leaves and poikilohydric mosses and lichens. *J Exp Bot* 52:1999–2006
- Heber U, Lange OL, Shuvalov VA (2006b) Conservation and dissipation of light energy as complementary processes: homoiohydric and poikilohydric autotrophs. *J Exp Bot* 57:1211–1223
- Hermes DA, Mattson WJ (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Q Rev Biol* 67:283–335
- Hill D (1989) The control of the cell cycle in microbial

- symbionts. *New Phytol* 112:175–184
- Holzinger A, Karsten U (2013) Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms. *Front Plant Sci* 4: 327. doi: 10.3389/fpls.2013.00327
- Honegger R (1991) Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annu Rev Plant Biol* 42:553–578
- Honegger R (1998) The lichen symbiosis—what is so spectacular about it? *The Lichenologist* 30:193–212. doi: 10.1006/lich.1998.0140
- Ivanov AG, Sane PV, Hurry V, Öquist G, Huner NPA (2008) Photosystem II reaction centre quenching: mechanisms and physiological role. *Photosynth Res* 98:565. doi: 10.1007/s11120-008-9365-3
- Kaznina N, Titov A (2017) Effect of Zinc Deficiency and Excess on the Growth and Photosynthesis of Winter Wheat. *J Stress Physiol Biochem* 13: 1–10
- Klochkova TA, Kang S-H, Cho GY, Poeschel CM, West JA, Kim GH (2006) Biology of a terrestrial green alga, *Chlorococcum* sp. (Chlorococcales, Chlorophyta), collected from the Miruksazi stupa in Korea. *Phycologia* 45:349–358. doi: 10.2216/04-58.1
- Kosugi M, Miyake H, Yamakawa H, Shibata Y, Miyazawa A, Sugimura T, Satoh K, Itoh S, Kashino Y (2013) Arabitol provided by lichenous fungi enhances ability to dissipate excess light energy in a symbiotic green alga under desiccation. *Plant Cell Physiol* 54:1316–1325
- Kranner I, Beckett R, Hochman A, Nash TH (2008) Desiccation-tolerance in lichens: a review. *The Bryologist* 111:576–593. doi: 10.1639/0007-2745-111.4.576
- Küpper FC (2015) Iodine in Seaweeds—Two centuries of research. In: Kim S-K (ed) *Springer Handbook of Marine Biotechnology*. Springer, Berlin, pp 591–596
- Küpper FC, Carpenter LJ, Leblanc C, Toyama C, Uchida Y, Maskery BH, Robinson J, Verhaeghe EF, Malin G, Luther GW, Kroneck PMH, Kloareg B, Meyer-Klaucke W, Muramatsu Y, Megson IL, Potin P, Feiters MC (2013) In vivo speciation studies and antioxidant properties of bromine in *Laminaria digitata* reinforce the significance of iodine accumulation for kelps. *J Exp Bot* 64:2653–2664
- Küpper FC, Carpenter LJ, McFiggans GB, Palmer CJ, Waite TJ, Boneberg EM, Woitsch S, Weiler M, Abela R, Grolimund D, Potin P, Butler A, Luther GW, Kroneck PMH, Meyer-Klaucke W, Feiters MC (2008) Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *Proc Natl Acad Sci* 105:6954–6958
- Küpper FC, Leblanc C, Meyer-Klaucke W, Potin P, Feiters MC (2014) Different speciation for bromine in brown and red algae, revealed by in vivo X-ray absorption spectroscopic studies. *J Phycol* 50:652–664. doi: 10.1111/jpy.12199
- Küpper FC, Schweigert N, Ar Gall E, Legendre JM, Vilter H, Kloareg B (1998) Iodine uptake in *Laminariales* involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta* 207:163–171. doi: 10.1007/s004250050469
- Kylin H (1930) Über das Vorkommen von Jodiden, Bromiden und Jodidoxidasen bei den Meeresalgen. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 186:50–84
- Lange OL, Bilger W, Rimke S, Schreiber U (1989) Chlorophyll fluorescence of lichens containing green and blue-green algae during hydration by water vapor uptake and by addition of liquid water. *Bot Acta* 102:306–313. doi: 10.1111/j.1438-8677.1989.tb00110.x
- Leblanc C, Colin C, Cosse A, Delage L, La Barre S, Morin P, Fievet B, Voiseux C, Ambroise Y, Verhaeghe E, Amouroux D, Donard O, Tessier E, Potin P (2006) Iodine transfers in the coastal marine environment: the key role of brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases. *Facets Environ Nucl Toxicol* 88:1773–1785. doi: 10.1016/j.biochi.2006.09.001
- Lebold TP, Yeow EK, Steer RP (2004) Fluorescence quenching of the S 1 and S 2 states of zinc meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin by halide ions. *Photochem Photobiol Sci* 3:160–166
- Lechowicz MJ (1983) Age dependence of photosynthesis in the caribou lichen *Cladina stellaris*. *Plant Physiol* 71:893–895
- Li M, Hu C, Zhu Q, Chen L, Kong Z, Liu Z (2006) Copper and zinc induction of lipid peroxidation and 465 effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere* 62:565–572. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.06.029
- Millero FJ, Feistel R, Wright DG, McDougall TJ (2008) The composition of Standard Seawater and the definition of the reference-composition salinity scale. *Deep Sea Res Part Oceanogr Res Pap* 55:50–72. doi: 10.1016/j.dsr.2007.10.001
- Moser TJ, Nash TH (1978) Photosynthetic patterns of *Cetraria cucullata* (Bell.) Ach. at Anaktuvuk Pass, Alaska. *Oecologia* 34:37–43
- Moss B (2017) Marine reptiles, birds and mammals and nutrient transfers among the seas and the land: An appraisal of current knowledge. *Ecol Responses Environ Change Mar Syst* 492:63–80. doi: 10.1016/j.jembe.2017.01.018
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a 476 review. *Environ Chem Lett* 8:199–216. doi: 10.1007/s10311-010-0297-8 477



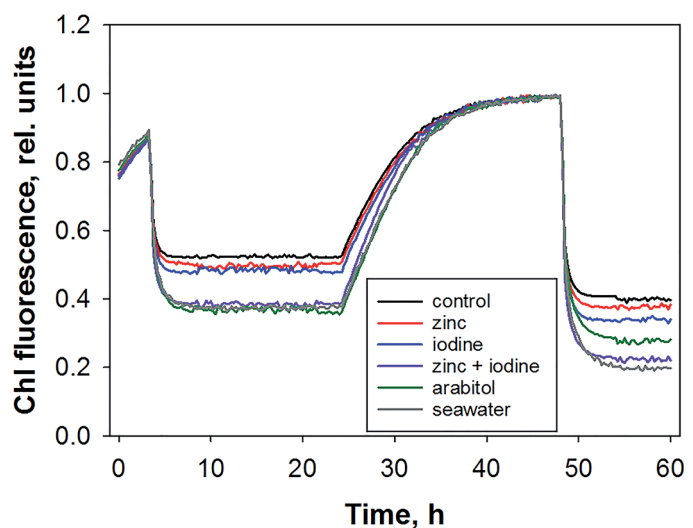
- Nitschke U, Stengel DB (2014) Iodine contributes to osmotic acclimatisation in the kelp *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Planta* 239:521–530. doi: 10.1007/s00425-013-1992-z
- Nowicki JL, Johnson KS, Coale KH, Elrod VA, Lieberman SH (1994) Determination of zinc in seawater using flow injection analysis with fluorometric detection. *Anal Chem* 66:2732–2738
- Ohad I, Berg A, Berkowicz SM, Kaplan A, Keren N (2011) Photoinactivation of photosystem II: is there more than one way to skin a cat? *Physiol Plant* 142:79–86. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01466.x
- Ohe M, Rapolu M, Mieda T, Miyagawa Y, Yabuta Y, Yoshimura K, Shigeoka S (2005) Decline in leaf photooxidative-stress tolerance with age in tobacco. *Plant Sci* 168:1487–1493
- Osmond C (1994) What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: Baker NR, Bowyer JR (eds) *Photoinhibition of Photosynthesis*. Bios Scientific Publishers, Oxford UK, pp 1-24
- Peters W, Ritter J, Tiller H, Tiller H, Valdes O, Renner U, Fountain M, Beck E (2000) Growth, ageing and death of a photoautotrophic plant cell culture. *Planta* 210:478–487
- Phinney NH, Solhaug KA, Gauslaa Y (2018) Rapid resurrection of chlorolichens in humid air: specific thallus mass drives rehydration and reactivation kinetics. *Environ Exp Bot* 148:184–191. doi: 10.1016/j.envexpbot.2018.01.009
- Prasad MNV (2008) *Trace elements as contaminants and nutrients: consequences in ecosystems and human health*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA
- Randall PJ, Bouma D (1973) Zinc deficiency, carbonic anhydrase, and photosynthesis in leaves of spinach. *Plant Physiol* 52:229. doi: 10.1104/pp.52.3.229
- Robert B (2016) *Artificial Photosynthesis*. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands
- Saha SK, Moane S, Murray P (2013) Effect of macro- and micro-nutrient limitation on superoxide dismutase activities and carotenoid levels in microalga *Dunaliella salina* CCAP 19/18. *Bioreour Technol* 147:23–28. doi: 10.1016/j.biortech.2013.08.022
- Shetaya W, Young S, Watts M, Ader EL, Bailey EH (2012) Iodine dynamics in soils. *Geochim Cosmochim Acta* 77:457–473
- Stark LR, Nichols L, McLetchie DN, Smith SD, Zundel C (2004) Age and sex specific rates of leaf regeneration in the Mojave Desert moss *Syntrichia caninervis*. *Am J Bot* 91:1–9
- Starr RC, Zeikus JA (1993) UTEX—the culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures. *J Phycol* 29:1–106
- Vassilev A, Nikolova A, Koleva L, Lidon F (2011) Effects of excess Zn on growth and photosynthetic performance of young bean plants. *J Phytol* 3:
- Veerman J, Vasil'ev S, Paton GD, Ramanauskas J, Bruce D (2007) Photoprotection in the lichen *Parmelia sulcata*: The origins of desiccation-induced fluorescence quenching. *Plant Physiol* 145: 997-1005. doi:10.1104/pp.107.106872
- Venturi S, Donati FM, Venturi A, Venturi M (2000) Environmental iodine deficiency: A challenge to the evolution of terrestrial life? *Thyroid* 10:727–729
- Verhulst P-F (1838) Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement. *Corresp Math Phys* 10:113–121
- Volland S, Bayer E, Baumgartner V, Andosch A, Lütz C, Sima E, Lütz-Meindl U (2014) Rescue of heavy metal effects on cell physiology of the algal model system *Micrasterias* by divalent ions. *J Plant Physiol* 171:154–163. doi: 10.1016/j.jplph.2013.10.002
- Warren C, Adams M (2001) Distribution of N, Rubisco and photosynthesis in *Pinus pinaster* and acclimation to light. *Plant Cell Environ* 24:597–609
- Wieners PC, Mudimu O, Bilger W (2012) Desiccation-induced non-radiative dissipation in isolated green lichen algae. *Photosynth Res* 113:239–247. doi: 10.1007/s11120-012-9771-4
- Wieners PC, Mudimu O, Bilger W (2018) Survey of the occurrence of desiccation-induced quenching of basal fluorescence in 28 species of green microalgae. *Planta* 248: 601-612. doi: 10.1007/s00425-018-2925-7
- Winokur M (1949) Aging effects in *Chlorella* cultures. *Am J Bot* 36:287–291
- Wood J, Sibly P (1952) Carbonic anhydrase activity in plants in relation to zinc content. *Aust J Biol Sci* 5:244–255

**Fig. 1** Time courses of the optical density of cultures of *T. asymmetrica* growing in different media: Bold's Basal Medium with vitamins (BBM+V), BBM+V with additional iodine and zinc, both in twice the concentration found in seawater, BBM+V with additional iodine four times the concentration found in seawater, and in natural seawater. The modelled growth rates are shown as lines. Data points show means of 3 independent samples. Error bars denote standard deviation.

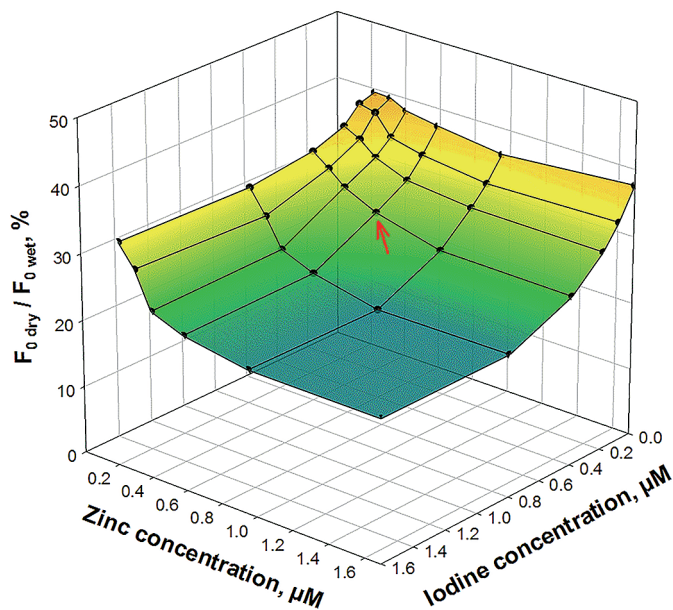
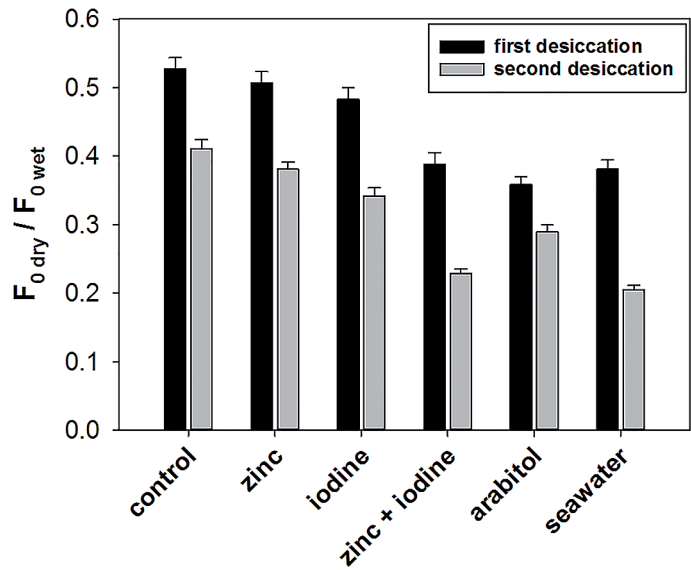


**Fig. 2** The growth rate  $r$  of *T. asymmetrica* as a function of the concentrations of zinc and iodine ions in BBM+V growth medium. Each point denotes the mean of 3 independent experiments with 5 samples each. The red arrow denotes the point with concentrations equal to those found in seawater.

**Fig. 3** Time courses of  $F_0$  of *T. asymmetrica* during desiccation and rehydration.  $F_0$  was normalized to a maximum value of 1.0. Relative humidity started at 92% and was changed to 100% and 85% at 24 and 48 h. The samples were treated with zinc, iodine, zinc and iodine concentrations twice as high as found in seawater. As medium BBM+V was used, except for the culture in enriched seawater. Arabitol was added in a concentration of 500 mM for a time span of 60 min before they were washed with growth medium and the desiccation treatment started. Means of 3 different experiments with 5 samples each are shown.

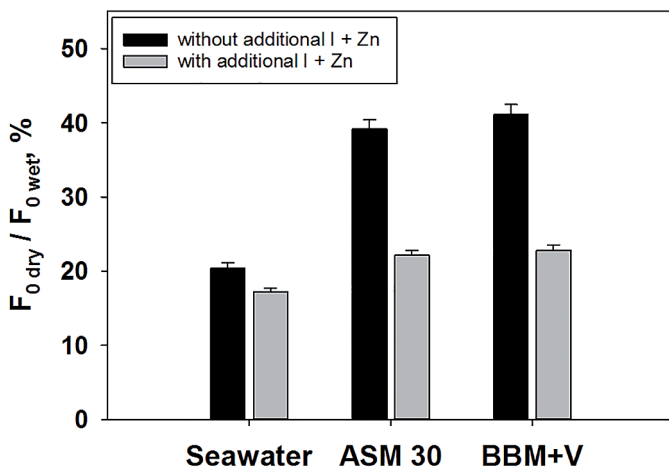
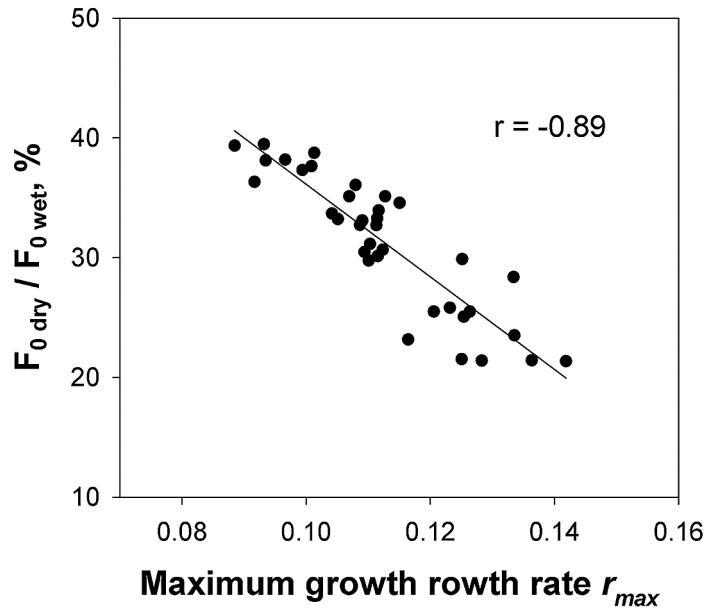


**Fig. 4** Comparison of desiccation-induced fluorescence quenching during the first and the second desiccation treatment at 92% and 85% r.h., respectively, of samples of *T. asymmetrica*. The samples were treated with zinc, iodine, zinc and iodine concentrations twice as high as found in seawater. The algae were grown in BBM+V medium in the presence of Zn and I, where applicable, or in enriched seawater. Control refers to growth in BBM+V without further additions. Arabitol was added in a concentration of 500mM for a time span of 60 min before the algal suspension was washed with growth medium and the desiccation treatment started. Means of 3 different experiments with 5 samples each are shown. Error bars denote standard deviation.



**Fig. 5** Desiccation-induced fluorescence quenching in *T. asymmetrica* as a function of the concentrations of iodine and zinc ions in the growth medium. Each point denotes the mean of 3 independent experiments with 5 samples each. The red arrow denotes the concentrations present in natural seawater.

**Fig. 6** Relationship between desiccation induced fluorescence quenching and the growth rates in culture media with varying concentrations of iodine and zinc ions. The line is drawn by linear regression. Each point denotes the mean of 3 independent experiments.



**Fig. 7** Influence of the addition of iodine and zinc ions to different media on qdes of *T. asymmetrica*. To seawater, artificial seawater (ASM30) and Bold's basal medium enriched with vitamins (BBM+V) (black bars), iodine and zinc ions were added in a concentration twice as high as found in natural seawater (grey bars). The bars show means of 3 samples, error bars denote standard deviation.



*Xanthoria elegans*

---

### 3.4 The role of zeaxanthin in desiccation-induced quenching of chlorophyll fluorescence in the lichen photobiont *Trebouxia asymmetrica*

(liegt als Manuskript vor)

Paul Christian Wieners<sup>a</sup>, Wolfgang Bilger<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Botanical Institute Christian-Albrechts University Kiel,  
Olshausenstraße 40, DE 24098 Kiel, Germany

#### Abstract

Desiccation induced quenching of chlorophyll fluorescence quenching ( $q_{des}$ ) is known from lichens and has been ascribed a protective function against photoinhibition in the dehydrated state. Zeaxanthin is involved in light-induced non-photochemical quenching (NPQ) and may also have a role in  $q_{des}$ . To assess correlations between  $q_{des}$  and zeaxanthin content in the isolated lichen algae *Trebouxia asymmetrica*, zeaxanthin content was manipulated by growth irradiance and inhibitors of NPQ such as the uncoupler nigericin and the inhibitor of the violaxanthin de-epoxidase, dithiothreitol (DTT). *T. asymmetrica* could grow even under comparatively high photon irradiance ( $380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).  $q_{des}$  increased strongly with irradiance as did the zeaxanthin content, leading to a good correlation between both parameters. Irradiation of the algae during desiccation enhanced  $q_{des}$ , which was partially reverted by nigericin. DTT slightly inhibited  $q_{des}$  in darkness and in the light, whereas it had a surprisingly small effect on zeaxanthin formation. The presence of Zn, I or arabitol in the medium enhanced  $q_{des}$  independently of the presence of zeaxanthin. It is concluded

that zeaxanthin dependent NPQ affects  $q_{des}$ , but that also other factors modulate  $q_{des}$  in a zeaxanthin-independent manner.

#### Introduction

Lichens and aero terrestrial algae found in soil crusts are among the most resilient organisms known. These organisms are even able to survive the harsh environment of outer space as many experiments had shown in the past (De Vera et al. 2002; de Vera et al. 2004; Raggio et al. 2011; Sadowsky and Ott 2016). Mosses (Alpert 2005; Wood 2007), lichens and many aero terrestrial algae (Lange et al. 1989; Potts 1994, 2001; Kranner et al. 2003, 2008; Potts et al. 2005) are tolerant against desiccation or freezing in a metabolically inactive state called cryptobiosis and are able to survive in this state for extended time spans (Trainor and Gladych 1995; Cannon et al. 2017).

These poikilohydric organisms often grow in habitats exposed to high irradiation (Kappen 1973; Ahmadijian 2012; Armstrong 2017). Hence, the danger of photoinhibition becomes even more severe to them when in the state of cryptobiosis without an active metabolism and in the absence of water

---

(Alpert 2005, 2006) the electron transport at Photosystem II is no longer possible. Under these circumstances every irradiance becomes excessive and may harm the organism (Osmond 1994; Heber et al. 2001, 2010; Nishiyama et al. 2011; Vass 2011). But in the case of poikilohydric photosynthetic organisms, the task to prevent photoinhibition in the desiccated state is more challenging than to do the same in the metabolically active cells of a higher plant. As mentioned, electron transport is no longer possible due to the lack of water, so the organism should be very sensitive to acceptor side photoinhibition (Heber et al. 2001, 2010; Nishiyama et al. 2011; Vass 2011)

A first line of defense against high light stress in lichens are adaptations, which screen the photobionts from high irradiance. Incident light must pass the cortex of lichens where it may be scattered at the hyphae or absorbed by pigments (Gauslaa and Solhaug 2004; Solhaug et al. 2010, Dietz et al. 2000; Wu et al. 2014). Desiccation has been shown to enhance scattering by the cortex (Dietz et al. 2000, Veerman et al. 2007).

But despite these protective mechanisms a large fraction of the light still reaches the symbiotic algae below the surface (Veerman et al. 2007). Furthermore, the synthesis of screening pigments is comparatively slow (Gauslaa and McEvoy 2005) and cannot follow the strong changes in protection needed desiccation and rehydration (Mafole et al. 2017).

In many poikilohydric lichens, mosses and algae a phenomenon is observable, which seems to be highly related with the protection against photoinhibition in the desiccated state: During desiccation the variable chlorophyll fluorescence ( $F_v/F_m$ ) is lost,

showing that no electron transport takes place anymore. At the same time the basal chlorophyll fluorescence ( $F_0$ ) is strongly reduced which indicates that non photochemical chlorophyll fluorescence quenching (NPQ) is highly enhanced (Lange et al. 1989; Heber et al. 2000, 2010; Karsten et al. 2014). This quenching of  $F_0$  during desiccation has been called  $q_{des}$  (Wieners et al. 2012)  $q_{des}$  has been verified to result largely from true quenching (Veerman et al. 2007; Komura et al. 2010; Miyake et al. 2011) and has been interpreted as a photoprotective mechanism (Heber et al. 2001, 2010). This has been supported by a strong negative correlation between photoinhibition in the desiccated state and the extent of  $q_{des}$  (Gauslaa and Solhaug 2004; Wieners et al. 2012).

High light-induced non-photochemical quenching (NPQ) in higher plants and also in green algal lichens is mediated by zeaxanthin, which can be formed rapidly in the violaxanthin cycle (Bilger and Björkman 1990; Demmig-Adams and Adams III 1992; Demmig-Adams and Adams 1996; Horton et al. 1996; Gilmore 1997; Jahns and Holzwarth 2012). The mechanism of non-photochemical quenching and the role of zeaxanthin in its formation is not fully understood on a molecular scale (Kress and Jahns 2017). On the other hand, the effect of NPQ as a protective mechanism is well documented in literature (Müller et al. 2001; Krause and Jahns 2004; Murata et al. 2012; Ruban and Murchie 2012; Ware et al. 2015; Ruban 2016). NPQ is present also in green algae (Niyogi et al. 1997) and the green photobionts of lichens (Demmig-Adams et al. 1990a; Calatayud et al. 1997; Štepigová et al. 2007) and has a protective role against excessive light in these organisms as well (Niyogi et al. 1997; Vráblí-

---

ková et al. 2005).

But while the role of zeaxanthin in the formation of NPQ is widely accepted, its role in the formation of desiccation induced quenching in poikilohydric organisms like aeroterrestrial algae and lichens is under discussion (Heber et al. 2006, 2010; Štepičová et al. 2007; Heber 2008; Yamakawa et al. 2012, 2018; Bilger 2014). Some publications show a correlation of zeaxanthin formation and  $q_{des}$  (Fernández-Marín et al. 2009, 2010, 2011; García-Plazaola et al. 2012). However, these authors used intact lichens for their experiments. Intact lichen thalli may differ in their physiological properties from the isolated photobionts as was shown for example by (Kosugi et al. 2013) due to interactions between algae and fungi.

Therefore, we aimed to manipulate zeaxanthin contents in order to establish a correlation between zeaxanthin contents in the isolated photobiont *Trebouxia asymmetrica*. To this end, we used the uncoupler nigericin and the violaxanthin de-epoxidase inhibitor DTT to manipulate zeaxanthin contents during desiccation. Furthermore, we grew *T. asymmetrica* at different irradiance. It has been observed that growth at high light enhances the contents of the V cycle carotenoids. The effects of these treatments on  $q_{des}$  were compared to those observed upon growth of *T. asymmetrica* at different concentration of iodine and zinc in the growth medium (Wieners et al. submitted).

## Material und Methods

### Algal species

The experiments were conducted with the following algae strains:

*Trebouxia asymmetrica* Friedl et Gärtner (Class Trebouxiophyceae, Order Trebouxiales, Family Trebouxiaceae) (SAG 48.88), a lichen photobiont which was originally isolated from the lichen *Diploschistes albescens* (Friedl and Gärtner 1988).

*Chlorella vulgaris* Beijerinck (Class Trebouxiophyceae, order Chlorellales, Family Chlorellaceae) (SAG 211-19) (Beijerinck 1890), a fresh water species with no known ability to resist drought.

*Microchloropsis salina* (D.J.Hibbard) M.W.Fawley (formally known as *Nannochloropsis salina*) (Class Eustigmatophyceae, Order Eustigmatales, Family Monodopsidaceae) (SAG 40.85), (Fawley et al. 2015) a marine species with no desiccation resistance.

### Culture-Media, Culture conditions

*Trebouxia asymmetrica* Friedl et Gärtner (Class Trebouxiophyceae, Order Trebouxiales, Family Trebouxiaceae) (SAG 48.88) were cultivated in 200 ml cell culture flasks (Grainer-bio-one Cellstar with filter, Grainer GmbH, Kremsmünster, Austria) at 21°C and under a 16 h light 8 h dark cycle. Lamps were warm white fluorescent tubes (Lumilux 58 W Osram AG, München, Germany). The intensity of the growth light varied depending from the particular experimental setup.

*T. asymmetrica* used for the experiments concerning the influence of iodine, zinc and arabitol were cultivated at  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



---

*T. asymmetrica*, *C. vulgaris* and *M. salina* were grown under different light regimes from 3  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  to 380  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR. The *T. asymmetrica* algae cultivated under low light conditions grew at 5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , those treated with high light at 210  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . In all cases the algae were cultivated under a 16h light 8h dark cycle.

The flasks were closed with hydrophobic membrane filters to allow gas exchange with minimal water loss. The culture was shaken once a day in order to avoid formation of a biofilm at the bottom of the flask.

The algae were grown in BBM+V medium (Starr and Zeikus 1993), all necessary chemicals were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). In some experiments, algae were cultivated in artificial seawater medium (ASM 30, (Starr and Zeikus 1993)) but in contrast to the original receipt the concentrations of the macronutrients was adapted to those in BBM+V: N 2.941 mmol/l; P 1.615 mmol/l; K 1.943 mmol/l; S 0.304 mmol/l; Mg 0.304 mmol/l; Ca 0.170 mmol/l.

For the experiments using iodine and zinc, small amounts of sodium iodide (NaI) and zinc chloride (ZnCl) (Merck, Darmstadt, Germany) were added to reach concentrations of 0.801  $\mu\text{M I}^-$  and 0.954  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ . The cell density was kept by dilution below 0.5 optical density to minimize mutual shading of the algae. The culture was mixed daily to avoid formation of a biofilm at the bottom of the flasks. The cultivation of *T. asymmetrica*, *C. vulgaris* and *M. salina* for the determination of the growth rates took 60 days. In this case the cultures were not diluted.

## Treatments

After removal from the culture flasks, the algae were concentrated by centrifugation at moderate speed (190 g, 15 min) and their concentration subsequently adjusted to an optical density of 1.0 at 750 nm as determined in a spectrophotometer (Uvikon 922, Kontron, Milano, Italy). The algal suspension was darkened for one hour before further steps were taken. For the treatment with arabinol algae grown in BBM+V were suspended for 1 h in a 500 mM arabinol solution in BBM+V medium (Kosugi et al. 2013), before they were washed again in BBM+V to avoid the formation of crystals during desiccation. Therefore, only the arabinol taken up by the algae was effective.

A transparent Perspex plate (10 cm x 15 cm) with 45 holes of a diameter of 8 mm in 5 rows with a distance of ca. 7 mm between the holes was firmly placed on top of filter paper disks of a diameter of 10 mm (NM 615, Macherey-Nagel, Düren, Germany). Each disk was located under a hole in the Perspex plate. Below the disks was another layer of filter paper of the same type and below the filter paper several layers of lab paper towels were placed. Two times 1 ml of the algal suspension was pipetted in 10 holes of the plate. After the medium was taken up by the lab paper, homogeneous algal samples with similar number of cells per area remained.

For the treatments with nigericin and DTT the algal samples were placed in an air tight polypropylene chamber (Emsa, Emsdetten, Germany) on a plastic grid (Lock & Lock, Seoul, South Korea). Then 1 ml of the nigericin and DDT solutions were pipetted on the samples. DTT was used at a concen-

---

tration of 5 mM (Bilger and Björkman 1990), the concentration of Nigericin was 6  $\mu\text{M}$  (Schreiber et al. 1995). In both treatments the incubation lasted for one hour. Below the grid was distilled water to keep the relative humidity at 100 % to avoid desiccation.

#### Desiccation and measurement of $q_{\text{des}}$

The desiccation process followed the protocol described in Wieners et al. (2018). However, in Wieners et al. (2018), chlorophyll fluorescence was determined continuously, whereas here measurements took place only after 24h rehydration at 100% relative humidity (r.H.), and after additional 24h at 85% r.H. for a second desiccation. This was done to avoid an unnecessary exposition of the samples to the excitation beam ( $0.05 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). The algae were desiccated either in darkness or under low light ( $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) using fluorescent tubes (Lumilux T8 58 W, Osram, Munich, Germany).

#### HPLC analysis

After the measurement for the chlorophyll fluorescence, the disks with the algal samples on them were placed into 2ml reaction tubes and frozen in liquid nitrogen ( $-196^\circ\text{C}$ ) and stored at  $-86^\circ\text{C}$  until extraction for pigment analysis. For the extraction 1.5 ml of an ice-cold solution of 90% dimethylformamid and 10% water was pipetted in the reaction tubes and incubated for 72h at  $4^\circ\text{C}$  in darkness. The remaining pellets after centrifugation were completely bleached in this process.

The supernatant was filtered ( $0.45\mu\text{m}$ , F 2504-3, Thermo Scientific, Rockwood,

U.S.A.) into brown HPLC vials. Quantification of the photosynthesis pigments was carried out with an HPLC-system of the Agilent 1100-series (Agilent Technologies, Santa Clara, U.S.A.) as described by (Niinemets et al. 1998). Pigments were separated with a Hypersil ODS-column ( $4.6 \times 250 \text{ mm}$ ,  $5\mu\text{m}$  particle size, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, U.S.A.) in combination with a mobile phase defined by a gradient of 10 mM Tris buffer (Roth) at pH 7.8 and 100 % acetone (Roth). The gradient started with 75 % acetone for 7.5 min. During the following 9.5 min, the concentration of acetone was increased to 100 % and remained there for 3 min. During the post-run the acetone was decreased within 2 min to 75 %. Finally, the column was flushed for 8 min before injection of the next sample. Chl *a* and *b* as well as the carotenoids were identified by their absorption spectra monitored by a photodiode array detector (Agilent, Santa Clara, United States) and their retention time.

The detector was calibrated using pure pigment extracts for all carotenoids (except antheraxanthin) prepared by thin layer chromatography (Lichtenthaler 1978), and spectrophotometric determination using the extinction coefficients of Davies (Davies et al. 1984). Chlorophyll was calibrated using a leaf extract and the equations provided by Porra et al. (Porra et al. 1989).

#### Light gradient

Growth of *T. asymmetrica*, *C. vulgaris* and *Microchoropsis salina* in cell culture flasks was determined at an irradiance of 3, 5, 10, 15, 19, 25, 30, 33, 42, 45, 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 110, 135, 150, 155, 160, 170, 180, 210, 270, 350 and  $380 \mu\text{mol}$

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in a climate chamber at  $21^\circ \text{C}$  for 60 days. Number of replicates was three.

#### OD-Measurement

The measurement of the optical density followed the protocol described in Wieners et al (2018).

#### Growth model

Growth was modelled according to the widely used law of population growth (Verhulst 1838), i.e. the logistic function that describes the population size  $P$  as a function of time  $t$ :

$$P(t) = \frac{K P_0 e^{rt}}{K + P_0 (e^{rt} - 1)}$$

where

$$\lim_{t \rightarrow \infty} P(t) = K$$

With population size  $P(t)$  being determined by the maximum growth rate  $r$ , the carrying capacity  $K$  and the initial population size  $P_{(0)}$ .

The data used to fit the model were averages of three replicate growth curves, measured as optical density over time. This resulted in one curve per treatment and hence a total of 270 curves. To fit the model to the data, measured initial population size  $P_{(0)}$  and time  $t$  were used as input. The initial estimate for the carrying capacity  $K$  was the optical density reached one week after the end of the measurements in the respective treatment. The values for  $r$  and  $K$  were obtained using the Solver analysis tool integrated in MS Excel (Microsoft, Redmond,

United States): The GRG (Generalized Reduced Gradient) nonlinear method was used to minimise the difference between the data and the model (calculated as least sum of squares). For the final result, a maximal remaining sum of squares of 0,0005 was accepted.

$P_{(t)}$  represents population size at a given time  $t$ .  $P_{(0)}$  is the population size at the start and  $K$  is the carrying capacity. The constant  $r$  defines the growth rate.

## Results

Influence of growth irradiance on relative growth rate, xanthophyll cycle pigment contents and  $q_{\text{des}}$

The contents of zeaxanthin were manipulated by growing *T. asymmetrica* over a range of irradiances which revealed the response of growth rates to irradiance. It was possible to obtain positive growth of *T. asymmetrica* at irradiances as low as  $3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 1). On the other hand, growth was already light saturated at about  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Growth at high irradiance was not limited by the experimental design, in which algal cultures were maintained in closed culture flasks in which the medium was not changed. This is shown by the high growth rates reached by *Microchloropsis salina* (Fig. 1). Also the growth rate of *C. vulgaris* increased up to  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , reaching a value of twice that of *T. asymmetrica*. Growth of *M. salina* was even not light saturated of the whole range of applied PFDs. *T. asymmetrica* displayed the highest growth rates among the three species at irradiances below  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pointing out its shade adapted nature. Surprisingly though, it showed no reduction of growth at irradiances

reaching almost 8 times that which was sufficient to saturate the growth rate. This behaviour is in contrast to that of *C. vulgaris* which showed decreasing growth rates at higher irradiances.

In the range of PFD at which growth was light limited  $F_v/F_m$  of *T. asymmetrica* stayed maximal, but began to decrease at higher irradiances (Fig. 2). This reflects increased excessive light at PFDs above 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Over the whole range of growth PFDs the pool size of the violaxanthin cycle pigments (V+A+Z) increased with increasing irradiance. Here, an increase of V+A+Z was observable also at PFDs limiting for growth.

When *T. asymmetrica* was desiccated, quenching of  $F_0$  ( $q_{\text{des}}$ ) was observed, which was strongly increased with growth PFD (Fig. 3). As it has been hypothesized that  $q_{\text{des}}$  might be dependent on the presence of zeaxanthin, we compared  $q_{\text{des}}$  with zeaxanthin content (Fig. 3 inset). It is apparent that here was a good correlation between  $q_{\text{des}}$  and zeaxanthin.

Results of the experiments with iodine and zinc and arabitol: In further experiments, the algae were cultivated under an intermediate irradiance of 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $\pm$  20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) with the growth media containing traces of iodine and/or zinc (0.801  $\mu\text{M I}^-$  and 0.954  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ ). This leads to an enhancement of desiccation induced chlorophyll fluorescence quenching (Wieners et al.2018). Addition of zinc or iodine led to slight enhancement of  $q_{\text{des}}$ , whereas addition of both ions resulted in a strong synergistic enhancement of  $q_{\text{des}}$  (Fig. 4). Probably due to an unavoidable variation of growth PFD between 95 and 135  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Z varied in the analysed samples between 12 and 35 mol per mol chl *a+b*. Over this range, the

effect of zinc and iodine was independent on Z concentration (Fig. 4).

Also treatment of isolated algae with arabitol has been reported to enhance  $q_{\text{des}}$  (Kosugi et al. 2013, Wieners et al.2018). This treatment caused an intermediate enhancement of  $q_{\text{des}}$ , again independent of the Z content in the algae.

#### Results of the treatments with DTT

To further elucidate the relationship between zeaxanthin contents and  $q_{\text{des}}$ , one hour before desiccation algae were incubated with 5mM DTT, an inhibitor of the violaxanthin de-epoxidase (Yamamoto and Kamite 1972). Fig. 5 shows the results of the treatment with DTT of *T. asymmetrica* grown under low light (5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and high light (210  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) conditions, desiccated under weak light (10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and in darkness. Generally, algae cultivated under high light conditions showed a stronger  $q_{\text{des}}$  as those grown under low light conditions, as already observed before (Fig. 3). Illumination during desiccation had in all samples a promoting effect on  $q_{\text{des}}$  (Fig 5, upper panels). With the exception of low light grown algae desiccated in the light, DTT inhibited  $q_{\text{des}}$  in all experiments significantly ( $p \leq 0,05$ ), with the strongest effect in the high light grown algae exposed to light during desiccation. The zeaxanthin contents of the algae at the end of the desiccation treatment are shown in the lower panels of Fig. 5. DTT lowered in all experiments the zeaxanthin contents, although the effect size was sometimes small (dark treated HL grown samples). An effect of DTT in samples desiccated in the light was to be expected, but we observed in low light grown algae also an inhibitory action in the dark. This indicates

---

activation of violaxanthin de-epoxidase in the absence of light. This effect was not observable in high light grown algae.

#### Results of the treatments with nigericin

During illumination, violaxanthin de-epoxidase is activated by the formation of a  $\Delta$  pH across the thylakoid membrane. Nigericin, a compound which dissipates the  $\Delta$  pH, was used as an additional inhibitor of zeaxanthin formation. Figure 6 shows the results of the treatment with nigericin of *T. asymmetrica* grown under low light and high light conditions and desiccated under weak light or in darkness, as used for the experiments with DTT. The extents of  $q_{des}$  of the controls were the same as observed before in the controls of the experiments using DTT (Fig. 5): Algae grown in high light showed a stronger  $q_{des}$  than those cultivated under low light conditions and  $q_{des}$  was stronger when the samples were desiccated under weak light than in darkness. Nigericin showed only an effect on  $q_{des}$  when desiccation took place under weak light but not in darkness. The effect was strongest with the algae cultivated at high light conditions. Illumination during desiccation enhanced zeaxanthin contents, while this effect was (at least partially) inhibited by nigericin.

Neither DTT nor nigericin were able to inhibit the formation of  $q_{des}$  completely but only to a rather small fraction.

When comparing the effects of the inhibitors on  $q_{des}$  with their effect on zeaxanthin contents, it becomes obvious that the relative effects on the former parameter were always larger than those on the latter one (Fig. 7). High light and low light grown algae showed distinctly different relationships bet-

ween  $q_{des}$  and Z content. However, within each group there was a fair correlation between both parameters.

#### Discussion

The main aim of the experiments was to analyse the relationship between  $q_{des}$  and zeaxanthin content in the algae, allowing the discussion of a functional role of zeaxanthin in the mechanism of  $q_{des}$ . Four different approaches were used to manipulate the strength of  $q_{des}$  and the content of zeaxanthin: variation in the growth irradiance; growth in the presence of different concentrations of zinc and iodine ions; treatment with arabinol; and use of inhibitors of zeaxanthin formation.

The influence of the growth irradiance on the strength of  $q_{des}$  and the zeaxanthin content.

As shown in Fig. 2, there is a strong positive correlation between the growth irradiance and the strength of the desiccation induced chlorophyll fluorescence quenching of *T. asymmetrica*. Using a gradient of different growth irradiances, we induced strong differences in the ability to show desiccation induced quenching in the following drought experiments.  $q_{des}$  is assumed as a protective mechanism against photoinhibition in the desiccated state (Heber et al. 2001, 2010; Wieners et al. 2012; Bilger 2014). Since without an active electron transport light can be harmful for the photosynthetic apparatus (Heber et al. 2001, 2010; Nishiyama et al. 2011; Vass 2011). The damage to the PSII is dependent on the dose of the radiation (Gauslaa and Solhaug 1999). So a regulation of the capacity of non-radiative energy dissipation according to growth irradiance

---

seems comprehensible to adapt to different light intensities, may they depend on location or seasonal changes.

Transplantation experiments have shown that lichen thalli react sensitive to a change of the environmental light conditions but are able to adapt to higher light irradiances to a certain degree over time (Gauslaa et al. 2006; McEvoy et al. 2007). Some of the adaptations in this acclimatisation process are performed by the lichen as holobiont, as the increase of melanin produced by the fungal partner (McEvoy et al. 2007; Mafole et al. 2017) but it is more than likely that the photobionts are involved in this process, too, as changes in the content of chlorophylls and carotenoids related to different solar irradiation shows (Paoli et al. 2010). So our results, even if we did our experiments with isolated photobionts cultivated in a liquid medium only exposed once to desiccation following our protocol, what differs in many ways from the conditions in a lichen thallus, are nevertheless comparable with the situation in the field.

Growth at different irradiance was used to manipulate zeaxanthin contents and resulted in an increase of VAZ / chl  $a+b$  by a factor of up to 4 and of Z / chl  $a+b$  by a factor of up to 10. These findings are in line with observations in higher plants (Demmig-Adams and Adams III 1992; Demmig-Adams and Adams 1996; Bailey et al. 2001; Jespersen et al. 2017; Mishanin et al. 2017) as well as in algae (Olaizola and Duerr 1990; Casper-Lindley and Björkman 1998; Wilson and Huner 2000; La Rocca et al. 2015; Endo et al. 2017). Both, the strength of  $q_{des}$  and the content of zeaxanthin were strongly dependent on the irradiance of the growth light (Fig. 2). The role of the violaxan-

thin cycle not only for non-photochemical quenching in metabolically active plants but also for the formation of  $q_{des}$  during desiccation of poikilohydric organisms such as lichens, desiccation tolerant mosses and aero-terrestrial algae is under discussion (Heber 2008; Kranner et al. 2008; Gasulla et al. 2009; Fernández-Marín et al. 2010, 2011, 2013).

The good relationship we observed between  $q_{des}$  and Z content in the algae (Fig. 3 inset) seems to support a function of Z in  $q_{des}$ . However, one must consider that a correlation does not necessarily imply a causal relationship. Also other high light induced structural changes in the photosystems could have caused the increase of  $q_{des}$ .

There are numerous other mechanisms for  $q_{des}$  under discussion which are independent from zeaxanthin (Bilger 2014). Different from higher plants, in green algae PSI and PSII are not strictly separated from each other (Anderson and Andersson 1982; Krämer et al. 1988). This allows the possibility that PSI and PSII are able to attach to each other via lateral movement in the thylakoid membranes which may also enable a direct energy transfer from PSII to PSI. In the desiccated state, PSI is easily oxidized and would act as a non-photochemical quencher of the light energy transferred by spillover from PSII (Slavov et al. 2013). Shrinking of the thylakoids due to desiccation may cause a better contact between PSI and PSII. Acclimation to high light may have led to structural adjustments in the thylakoid architecture which could enhance this type of quenching.

The increase of Z and VAZ at increased growth irradiances can be seen in the context of the growth response of *T. asymmetrica*. Growth increased with irradiance only at irra-

---

diances below a PFD of  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and was light saturated over most of the range. This must be most probably attributed to the shade adaptation of this species and not to limitations imposed by the medium or other growth conditions, as *C. vulgaris* and especially *M. salina* could raise their growth rate considerably. However, limited growth must lead irrespectively of its causes to excessive PFD.  $F_v/F_M$  reflects clearly the growth rates. As long as growth was light limited, optimal PS II efficiency remained high, but started to decline once growth was light saturated. It is unclear if the decrease of  $F_v/F_M$  must be interpreted as a sign of damage or as sustained down regulation of PS II. Down regulation could be dependent on the presence of Z, which increased indeed at the same time. However, for establishing a functional relationship between  $F_v/F_M$  and Z, more experiments are necessary. With respect to the capacity for  $q_{\text{des}}$ , it might be important that it increased in parallel to the decline in  $F_v/F_M$ . Potentially enhanced non-radiative dissipation was positively correlated with the capacity for further, desiccation-induced, non-radiative dissipation.

The influence of  $\text{I}^-$  and  $\text{Zn}^{2+}$  and a treatment with arabitol to  $q_{\text{des}}$  and zeaxanthin content

As a second method to manipulate  $q_{\text{des}}$  the addition of iodine and zinc ions to the growth medium was used (Wieners et al. 2012, Wieners, Göthlich and Bilger, submitted). Growth of *T. asymmetrica* in the simultaneous presence of both ions had a remarkable influence to the strength of  $q_{\text{des}}$ . Fig. 4). Although the effects of iodine and/or zinc ions to  $q_{\text{des}}$  were very pronounced, there was no significant effect of the content of zeaxanthin.

The same was true for the treatment with arabitol prior to the desiccation of the algae. It is still unknown by which mechanism the combination of iodine and zinc enhances  $q_{\text{des}}$ . From our results it can be stated that this mechanism does not seem to involve zeaxanthin, or is at least independent of the amounts of zeaxanthin present.

The influence of DTT and nigericin to  $q_{\text{des}}$

The presence of weak light during desiccation had an enhancing effect on the formation of desiccation induced chlorophyll fluorescence quenching in *T. asymmetrica* (Figs. 5 and 6). The light effect was strongest in algae grown under high light conditions. This suggests that a light dependent reaction was responsible for a part of the observed  $q_{\text{des}}$  or that the process of the formation of  $q_{\text{des}}$  was accelerated by light. One may hypothesize that the effect of light during desiccation may be caused by its induction of a pH and the ensuing formation of zeaxanthin. Therefore, experiments were conducted in the presence of the protonophore nigericin and the inhibitor of violaxanthin de-epoxidase (VDE), DTT (Yamamoto and Kamite 1972). Treatment with DTT caused a reduction of  $q_{\text{des}}$  compared with to controls in weak light and darkness. DTT should have inhibited light-induced zeaxanthin formation. However, it has also been reported that zeaxanthin could be formed by desiccation itself (Fernández-Marín et al. 2010, 2011; Fernández Marín et al. 2018) which could also be sensitive to DTT. Algae grown under high light conditions were affected stronger than those grown under low light conditions. Since the algae grown in high light had also a higher content of zeaxanthin a relation bet-

---

ween both observations seems plausible.

In contrast to the treatment with DTT, nigericin showed an inhibitory effect to the formation of  $q_{des}$  only in the presence of weak light (Fig. 6). This is plausible considering the role of nigericin in dissipating the light induced proton gradient across the thylakoid membrane. Again, the effect was stronger in algae grown under high light. But similar to the observations after treatment with DTT the formation of  $q_{des}$  was not inhibited completely. This would suggest that there are other factors involved in the formation of  $q_{des}$  apart from zeaxanthin. Alternatively, one would have to conclude that the formation of zeaxanthin could be independent from a low pH in the thylakoids.

The influence of the growth irradiance on the maximum growth rates

As in Fig. 1 is shown, the growth irradiance has, little surprisingly, a strong influence on the maximum growth rates of *T. asymmetrica*, *C. vulgaris* and *M. salina* (Sorokin and Krauss 1958; Brown and Richardson 1968; Wahidin et al. 2013). Even if the classification of algae in shade plants and sun plants, as it is used for higher plants (Boardman 1977; Björkman 1981; Givnish 1988; Öquist et al. 1992) must be taken with big circumspection due to the huge differences between plants in the common sense and algae, the comparably low maximum growth rates of *M. salina* at low light intensities and the high growth rates at higher intensities reminds remarkably to the situation at plants adapted to high light conditions. In contrast to this, *C. vulgaris* showed higher maximum growth rates at lower light intensities and lower  $r_{max}$  at higher irradiation, so it would be

justifiable to call this alga strain shade adapted, at least in comparison with *M. salina*. On the other hand, *T. asymmetrica* showed no decline in its growth rate at high irradiances, in contrast to *C. vulgaris*. These data indicate that the concept of sun and shade plants is transferable from higher plants to microalgae. *M. salina* could be considered as a sun-alga while *C. vulgaris* showed the characteristics of a rather shade preferring species. *T. asymmetrica* did not fit in this scheme and showed a high plasticity concerning irradiance. This trait corresponds well with the natural occurrence of the host of *T. asymmetrica*, the lichen *Diploschistes albescens* in the association *Toninietalia coeruleonigris* (Brechener 2001; Bültmann 2012). This community is characteristic for habitats which can be exposed to full solar radiation with a strongly fluctuating availability of water (Scherhag et al. 1977; Akin 1991; Kottek et al. 2006).



---

## Conclusions

The question if  $q_{des}$  is caused by zeaxanthin cannot be answered conclusively by the results of our experiments. Several observations support a role of zeaxanthin in  $q_{des}$ :

There was a good correlation between  $q_{des}$  and the chlorophyll related content of zeaxanthin in the algae grown under different light regimes. The zeaxanthin detected at the end of the desiccation treatment was presumably mainly present already at the begin of the desiccation, but our results could also be interpreted that the formation of zeaxanthin occurred during desiccation as observed by others (Fernández-Marín et al. 2010, 2011). Desiccation under weak light promoted the formation of  $q_{des}$  as it would be expected if zeaxanthin formed in the light was the major quencher. Furthermore, inhibitors like DTT and nigericin which should block the synthe-

sis of zeaxanthin also had an effect on the formation of  $q_{des}$ . These inhibitors did not completely inhibit  $q_{des}$ , but they also did not eliminate the presence of zeaxanthin.

On the other hand, in the inhibitor studies we did not detect a good correlation between zeaxanthin content and  $q_{des}$ . Furthermore, the finding of an effect of iodine, zinc and arabitol on the strength of  $q_{des}$  independent from the amount of zeaxanthin present in the algae does clearly indicate that also mechanisms independent on the presence of zeaxanthin are responsible for the formation of desiccation induced chlorophyll fluorescence quenching. Our results support the hypothesis that the protective mechanism of  $q_{des}$  is the sum of different processes causing a very effective thermal dissipation of absorbed light energy, which would be fatal under the conditions in a desiccated photobiont otherwise.

## Literature

- Ahmadijian V (2012) The lichens. Elsevier Verlag, Amsterdam, Netherlands
- Alpert P (2005) The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integrative and Comparative Biology* 45:685–695
- Alpert P (2006) Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *J Exp Biol* 209:1575. doi: 10.1242/jeb.02179
- Anderson JM, Andersson B (1982) The architecture of photosynthetic membranes: lateral and transverse organization. *Trends in Biochemical Sciences* 7:288–292
- Armstrong RA (2017) Adaptation of lichens to extreme conditions. In: Shukla V., Kumar S., Kumar N. (Eds.), *Plant Adaptation Strategies in Changing Environment*. Springer Singapore, Singapore, pp 1–27
- Bailey S, Walters RG, Jansson S, Horton P (2001) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta* 213:794–801
- Beijerinck M (1890) Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Bot Zeitung* 48:781–5
- Bilger W (2014) Desiccation-induced quenching of chlorophyll fluorescence in cryptogams. In: Demmig-Adams B, Garab G, III WA, Govindjee (eds) *Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 409–420
- Bilger W, Björkman O (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25:173–185
- Björkman O (1981) Responses to different quantum flux densities. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H (eds), *Physiological plant ecology I*. Springer, Berlin Heidelberg, Germany, pp 57–107
- Boardman NT (1977) Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual Reviews of Plant Physiology* 28:355–377
- Brechener (ed) (2001) *Kompaktlexikon der Biologie. 1: A bis Fotom*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Germany
- Brown TE, Richardson FL (1968) The effect of growth environment on the physiology of algae: light intensity. *Journal of Phycology* 4:38–54
- Bültmann H (2012) The lichen syntaxa in the checklist of higher syntaxa of Europe—an overview and what we can do with them. *Annali di Botanica* 2:11–18
- Calatayud A, Deltoro VI, Barreno E, Valle Tascon S del (1997) Changes in in vivo chlorophyll fluorescence quenching in lichen thalli as a function of water content and suggestion of zeaxanthin associated photoprotection. *Physiologia Plantarum* 101:93–102
- Cannone N, Corinti T, Malfasi F, et al (2017) Moss survival through in situ cryptobiosis after six centuries of glacier burial. *Scientific Reports* 7:4438
- Casper-Lindley C, Björkman O (1998) Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments. *Photosynthesis Research* 56:277–289. doi: 10.1023/A:1006037516479
- Davies AJ, Khare A, Mallams AK, et al (1984) Carotenoids and related compounds. Part 38. Synthesis of (3 RS, 3 RS)-alloxanthin and other acetylenes. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*: 2147–2157
- De Vera J-P, Horneck G, Rettberg P, Ott S (2002) The potential of the lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space—I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *International Journal of Astrobiology* 1: 285–293
- De Vera J-P, Horneck G, Rettberg P, Ott S (2004) In the context of panspermia: may lichens serve as shuttles for their bionts in space? In: *Proceedings of the third European workshop on exo-astrobiology*, 18 - 20 Nov. 2003, Madrid, Spain. ESA Publication Division, Noordwijk, pp 197–198
- Demmig-Adams B, Adams III W (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43:599–626
- Demmig-Adams B, Adams W, Green T, Czygan C, Lange OL (1990) Differences in the susceptibility to light stress in two lichens forming a phycosymbiodeme, one partner possessing and one lacking the xanthophyll cycle. *Oecologia* 84:451–456 84: 451. doi:10.1007/BF00328159
- Demmig-Adams B, Adams WW (1996) Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* 198:460–470
- Dietz S, Büdel B, Lange O, Bilger W (2000) Transmittance of light through the cortex of lichens from contrasting habitats. In: *Bibliotheca Lichenologica, New aspects in cryptogamic research: Contribution in honour of Ludger Kappen*. J Cramer, Berlin, Stuttgart, pp 171–182
- Endo H, Okumura Y, Sato Y, Agatsuma Y (2017) Interactive effects of nutrient availability, temperature, and irradiance on photosynthetic pigments and color of the brown alga *Undaria pinnatifida*. *Journal of Applied Phycology* 29:1683–1693
- Fawley MW, Jameson I, Fawley KP (2015) The phylo-

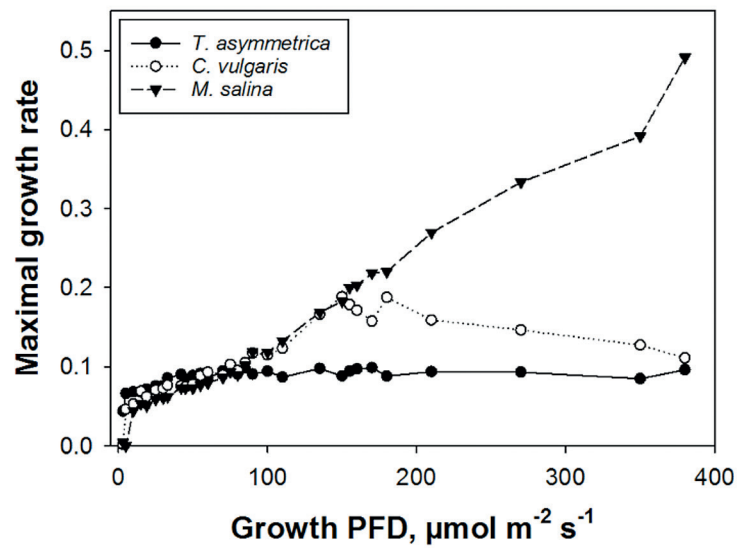
- geny of the genus *Nannochloropsis* (Monodopsideaceae, Eustigmatophyceae), with descriptions of *N. australis* sp. nov. and *Microchloropsis* gen. nov. *Phycologia* 54:545–552
- Fernández-Marín B, Balaguer L, Esteban R, Becerril J, García-Plazaola JI (2009) Dark induction of the photoprotective xanthophyll cycle in response to dehydration. *Journal of Plant Physiology* 166:1734–1744. doi: 10.1016/j.jplph.2009.04.019
- Fernández-Marín B, Becerril J, García-Plazaola J (2010) Unravelling the roles of desiccation-induced xanthophyll cycle activity in darkness: a case study in *Lobaria pulmonaria*. *Planta* 231:1335–1342
- Fernández-Marín B, Kranner I, Sebastián MS, Artetxe U, Laza JM, Vilas JL, Pritchard HW, Nadajaran J, Miguez F, Becerril J, Gracia-Plazaola JI (2013) Evidence for the absence of enzymatic reactions in the glassy state. A case study of xanthophyll cycle pigments in the desiccation-tolerant moss *Syntrichia ruralis*. *Journal of Experimental Botany* 64:3033–3043
- Fernández-Marín B, Míguez F, Becerril J, García-Plazaola J (2011) Dehydration-mediated activation of the xanthophyll cycle in darkness: is it related to desiccation tolerance? *Planta* 234:579
- Fernández Marín B, Neuner G, Kuprian E, Laza JM, García-Plazaola JI, Verhoeven A (2018) First evidence of freezing tolerance in a resurrection plant: insights into molecular mobility and zeaxanthin synthesis in the dark. *Physiologia plantarum* 163: 472-489
- Friedl T, Gärtner G (1988) *Trebouxia* (pleurastrales, chlorophyta) as a phycobiont in the lichen genus *diploschistes*. *Archiv für Protistenkunde* 135:147–158. doi: 10.1016/S0003-9365(88)80061-7
- García-Plazaola JI, Esteban R, Fernández-Marín B, Kranner I, Porcar-Castell A (2012) Thermal energy dissipation and xanthophyll cycles beyond the arabidopsis model. *Photosynthesis Research* 113:89–103. doi: 10.1007/s11120-012-9760-7
- Gasulla F, de Nova PG, Esteban-Carrasco A, Zapata JM, Barreno E, Guera A (2009) Dehydration rate and time of desiccation affect recovery of the lichenic algae *Trebouxia erici*: alternative and classical protective mechanisms. *Planta* 231:195–208
- Gauslaa Y, Lie M, Solhaug KA, Ohlson M (2006) Growth and ecophysiological acclimation of the foliose lichen *Lobaria pulmonaria* in forests with contrasting light climates. *Oecologia* 147:406
- Gauslaa Y, McEvoy M (2005) Seasonal changes in solar radiation drive acclimation of the sun-screening compound parietin in the lichen *Xanthoria parietina*. *Basic and Applied Ecology* 6:75–82. doi: 10.1016/j.baae.2004.10.003
- Gauslaa Y, Solhaug K (1999) High-light damage in air-dry thalli of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* – interactions of irradiance, exposure duration and high temperature. *Journal of Experimental Botany* 50:697–705
- Gauslaa Y, Solhaug KA (2004) Photoinhibition in lichens depends on cortical characteristics and hydration. *The Lichenologist* 36:133–143. doi: 10.1017/S0024282904014045
- Gilmore AM (1997) Mechanistic aspects of xanthophyll cycle dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum* 99:197–209
- Givnish T (1988) Adaptation to Sun and Shade: a Whole-Plant Perspective. *Functional Plant Biol* 15:63–92
- Heber U (2008) Photoprotection of green plants: a mechanism of ultra-fast thermal energy dissipation in desiccated lichens. *Planta* 228:641–650. doi: 10.1007/s00425-008-0766-5
- Heber U, Bilger W, Bligny R, Lange OL (2000) Phototolerance of lichens, mosses and higher plants in an alpine environment: analysis of photoreactions. *Planta* 211:770–780. doi: 10.1007/s004250000356
- Heber U, Bilger W, Shuvalov VA (2006) Thermal energy dissipation in reaction centres and in the antenna of photosystem II protects desiccated poikilohydric mosses against photo-oxidation. *Journal of Experimental Botany* 57:2993–3006
- Heber U, Bilger W, Türk R, Lange OL (2010) Photoprotection of reaction centres in photosynthetic organisms: mechanisms of thermal energy dissipation in desiccated thalli of the lichen *Lobaria pulmonaria*. *New Phytologist* 185:459–470. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03064.x
- Heber U, Bukhov NG, Shuvalov VA, Kobayahi Y, Lange OL (2001) Protection of the photosynthetic apparatus against damage by excessive illumination in homoiohydric leaves and poikilohydric mosses and lichens. *Journal of Experimental Botany* 52:1999–2006
- Horton P, Ruban A, Walters R (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annual review of plant biology* 47:655–684
- Jahns P, Holzwarth AR (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1817:182–193
- Jespersen E, Brix H, Sorrell BK (2017) Acclimation to light and avoidance of photoinhibition in *Typha latifolia* is associated with high photosynthetic capacity and xanthophyll pigment content. *Functional Plant Biology* 44:774–784
- Kappen L (1973) Response to extreme environments

- In: Ahmadjian V, Hale ME (eds) The Lichens. Academic Press, New York, United States, pp 311-380
- Karsten U, Herburger K, Holzinger A (2014) Dehydration, temperature, and light tolerance in members of the aeroterrestrial green algal genus *Interfilum* (Streptophyta) from biogeographically different temperate soils. *J Phycol* 50:804–816. doi: 10.1111/jpy.12210
- Komura M, Yamagishi A, Shibata Y, Iwasaki I, Itoh S (2010) Mechanism of strong quenching of photosystem II chlorophyll fluorescence under drought stress in a lichen, *Physciella melanchla*, studied by subpicosecond fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797:331–338. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.11.007
- Kosugi M, Miyake H, Yamakawa H, Shibata Y, Miyazawa A, Sugimura T, Satoh K, Itoh S, Kashino Y (2013) Arabitol provided by lichenous fungi enhances ability to dissipate excess light energy in a symbiotic green alga under desiccation. *Plant and cell physiology* 54:1316–1325
- Krämer P, Wilhelm C, Wild A, Mörschel E, Rhiel E (1988) Ultrastructure and freeze-fracture studies of the thylakoids of *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae). *Protoplasma* 147:170–177
- Kranner I, Beckett R, Hochman A, Nash TH (2008) Desiccation-tolerance in lichens: a review. *The Bryologist* 111:576–593. doi: 10.1639/0007-2745-111.4.576
- Kranner I, Zorn M, Turk B, Wornik S, Beckett RP, Bati F (2003) Biochemical traits of lichens differing in relative desiccation tolerance. *New Phytologist* 160:167–176. doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00852.x
- Krause GH, Jahns P (2004) Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds) *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 463–495
- Kress E, Jahns P (2017) The dynamics of energy dissipation and xanthophyll conversion in *Arabidopsis* indicate an indirect photoprotective role of zeaxanthin in slowly inducible and relaxing components of non-photochemical quenching of excitation energy. *Frontiers in Plant Science* 8:2094. doi: 10.3389/fpls.2017.02094
- La Rocca N, Sciuto K, Meneghesso A, Moro I, Rascia N, Morosinotto T (2015) Photosynthesis in extreme environments: responses to different light regimes in the Antarctic alga *Koliella antarctica*. *Physiologia plantarum* 153:654–667
- Lange OL, Bilger W, Rimke S, Schreiber U (1989) Chlorophyll fluorescence of lichens containing green and blue-green algae during hydration by water vapor uptake and by addition of liquid water. *Botanica Acta* 102:306–313. doi: 10.1111/j.1438-8677.1989.tb00110.x
- Lichtenthaler HK (1978) *Praktikum der Photosynthese*. Quelle & Meyer, Wiebelsheim, Germany
- Mafole TC, Chiang C, Solhaug KA, Beckett RP (2017) Melanisation in the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* reduces the efficiency of photosynthesis. *Fungal Ecology* 29:103–110. doi: 10.1016/j.funeco.2017.07.004
- McEvoy M, Gauslaa Y, Solhaug KA (2007) Changes in pools of depsidones and melanins, and their function, during growth and acclimation under contrasting natural light in the lichen *Lobaria pulmonaria*. *New Phytologist* 175:271–282. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02096.x
- Mishanin VI, Trubitsin BV, Patsaeva SV, Ptushenko VV, Solovchenko AE, Tikhonov AN (2017) Acclimation of shade-tolerant and light-resistant *Tradescantia* species to growth light: chlorophyll a fluorescence, electron transport, and xanthophyll content. *Photosynthesis research* 133:87–102
- Miyake H, Komura M, Itoh S, Kosugi M, Kashino Y, Satoh K, Shibata Y (2011) Multiple dissipation components of excess light energy in dry lichen revealed by ultrafast fluorescence study at 5 K. *Photosynthesis Research* 110:39. doi: 10.1007/s11120-011-9691-8
- Müller P, Li X-P, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant physiology* 125:1558–1566
- Murata N, Allakhverdiev SI, Nishiyama Y (2012) The mechanism of photoinhibition in vivo: re-evaluation of the roles of catalase, -tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1817:1127–1133
- Niinemets Ü, Bilger W, Kull O, Tenhunen J (1998) Acclimation to high irradiance in temperate deciduous trees in the field: changes in xanthophyll cycle pool size and in photosynthetic capacity along a canopy light gradient. *Plant, Cell & Environment* 21:1205–1218
- Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N (2011) Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiologia Plantarum* 142:35–46. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01457.x
- Niyogi KK, Bjorkman O, Grossman AR (1997) *Chlamydomonas* xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching. *The Plant Cell* 9:1369–1380
- Olaizola M, Duerr EO (1990) Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. *Jour-*

- nal of Applied Phycology 2:97–104
- Öquist G, Anderson JM, McCaffery S, Chow W (1992) Mechanistic differences in photoinhibition of sun and shade plants. *Planta* 188:422–431
- Osmond C (1994) What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: Backer NR, Bowyer JR (eds) *Photoinhibition of Photosynthesis from molecular mechanisms to the field*. Bios Scientific Publishers, Oxford, Great Britain, pp 1–24
- Paoli L, Pisani T, Munzi S, et al (2010) Influence of sun irradiance and water availability on lichen photosynthetic pigments during a Mediterranean summer. *Biologia* 65:776–783. doi: 10.2478/s11756-010-0087-6
- Porra R, Thompson W, Kriedemann P (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 975:384–394
- Potts M (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological reviews* 58:755–805
- Potts M (2001) Desiccation tolerance: a simple process? *Trends in Microbiology* 9:553–559. doi: 10.1016/S0966-842X(01)02231-4
- Potts M, Slaughter SM, Hunneke F-U, Garst JF, Helm RF (2005) Desiccation tolerance of prokaryotes: application of principles to human cells. *Integrative and Comparative Biology* 45:800–809
- Proctor MCF, Oliver MJ, Wood AJ, Alpert P, Stark LR, Cleavitt NL, Mishler BD (2007) Desiccation-tolerance in bryophytes: a review. *The Bryologist* 110:595–621. doi: 10.1639/0007-2745(2007)110[595:DI-BAR]2.0.CO;2
- Raggio J, Pintado A, Ascaso C, De la Torre R, De los Rios A, Wierzos J, Horneck G, Sancho LG (2011) Whole lichen thalli survive exposure to space conditions: results of Lithopanspermia experiment with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology* 11:281–292
- Ruban AV (2016) Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: Mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiol* 170:1903. doi: 10.1104/pp.15.01935
- Ruban AV, Murchie EH (2012) Assessing the photoprotective effectiveness of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching: a new approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1817:977–982
- Sadowsky A, Ott S (2016) Symbiosis as a successful strategy in continental Antarctica: performance and protection of *Trebouxia* photosystem II in relation to lichen pigmentation. *Polar Biology* 39:139–151. doi: 10.1007/s00300-015-1677-0
- Schreiber U, Endo T, Mi H, Asada K (1995) Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. *Plant and cell physiology* 36:873–882
- Solhaug KA, Larsson P, Gauslaa Y (2010) Light screening in lichen cortices can be quantified by chlorophyll fluorescence techniques for both reflecting and absorbing pigments. *Planta* 231:1003–1011. doi: 10.1007/s00425-010-1103-3
- Sorokin C, Krauss RW (1958) The effects of light intensity on the growth rates of green Algae. *Plant physiology* 33:109
- Starr RC, Zeikus JA (1993) UTEX—the culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures. *Journal of phycology* 29:1–106
- Štepigová J, Vráblíková H, Lang J, Vecerova K, Bartak M (2007) Glutathione and zeaxanthin formation during high light stress in foliose lichens. *Plant Soil Environ* 53:340–344
- Trainor FR, Gladych R (1995) Survival of algae in a desiccated soil: a 35-year study. *Phycologia* 34:191–192. doi: 10.2216/i0031-8884-34-3-191.1
- Vass I (2011) Role of charge recombination processes in photodamage and photoprotection of the photosystem II complex. *Physiologia Plantarum* 142:6–16. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01454.x
- Veerman J, Vasil'ev S, Paton GD, Ramanauskas J, Bruce D (2007) Photoprotection in the lichen *Parmelia sulcata*: the origins of desiccation-induced fluorescence quenching. *Plant Physiol* 145:997. doi: 10.1104/pp.107.106872
- Verhulst P-F (1838) Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. correspondance mathématique et physique publiée par a. Queletet 10:113–121
- Wahidin S, Idris A, Shaleh SRM (2013) The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource technology* 129:7–11
- Ware MA, Belgio E, Ruban AV (2015) Photoprotective capacity of non-photochemical quenching in plants acclimated to different light intensities. *Photosynthesis research* 126:261–274
- Wieners PC, Mudimu O, Bilger W (2012) Desiccation-induced non-radiative dissipation in isolated green lichen algae. *Photosynthesis Research* 113:239–247. doi:10.1007/s11120-012-9771-4
- Wieners PC, Mudimu O, Bilger W (2018) Survey of the occurrence of desiccation-induced quenching of basal fluorescence in 28 species of

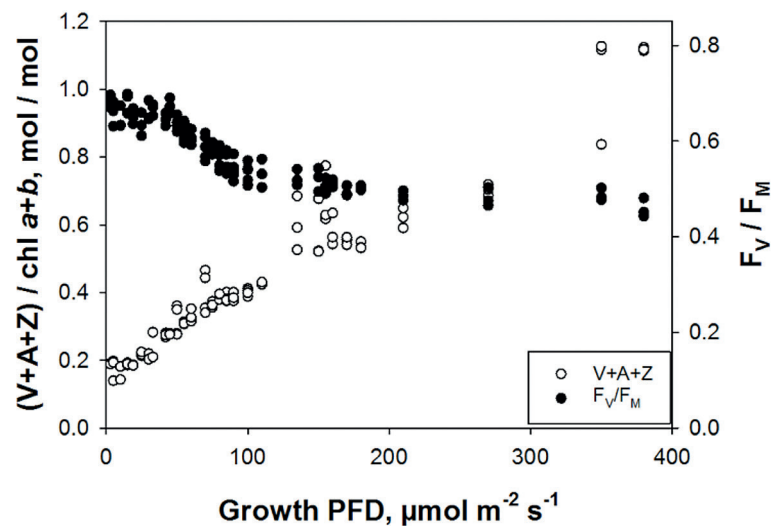
- 
- green microalgae. *Planta* 248: 601-612. doi: 10.1007/s00425-018-2925-7
- Wilson KE, Huner NP (2000) The role of growth rate, redox-state of the plastoquinone pool and the trans-thylakoid pH in photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to growth irradiance and temperature. *Planta* 212:93–102
- Wood AJ (2007) The nature and distribution of vegetative desiccation-tolerance in hornworts, liverworts and mosses. *The Bryologist* 110:163–177. doi: 10.1639/0007-2745(2007)110[163:|ENFI-B]2.0.CO;2
- Wu L, Zhang G, Lan S, Zhang D, Hu C (2014) Longitudinal photosynthetic gradient in crust lichens' thalli. *Microbial Ecology* 67:888–896. doi: 10.1007/s00248-014-0366-9
- Yamakawa H, Fukushima Y, Itoh S, Heber U (2012) Three different mechanisms of energy dissipation of a desiccation-tolerant moss serve one common purpose: to protect reaction centres against photo-oxidation. *Journal of experimental botany* 63:3765–3775
- Yamakawa H, van Stokkum IHM, Heber U, Itoh S (2018) Mechanisms of drought-induced dissipation of excitation energy in sun- and shade-adapted drought-tolerant mosses studied by fluorescence yield change and global and target analysis of fluorescence decay kinetics. *Photosynthesis Research* 135:285–298. doi: 10.1007/s11120-017-0465-9
- Yamamoto HY, Kamite L (1972) The effects of dithiothreitol on violaxanthin de-epoxidation and absorbance changes in the 500-nm region. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 267:538–543

## Figures



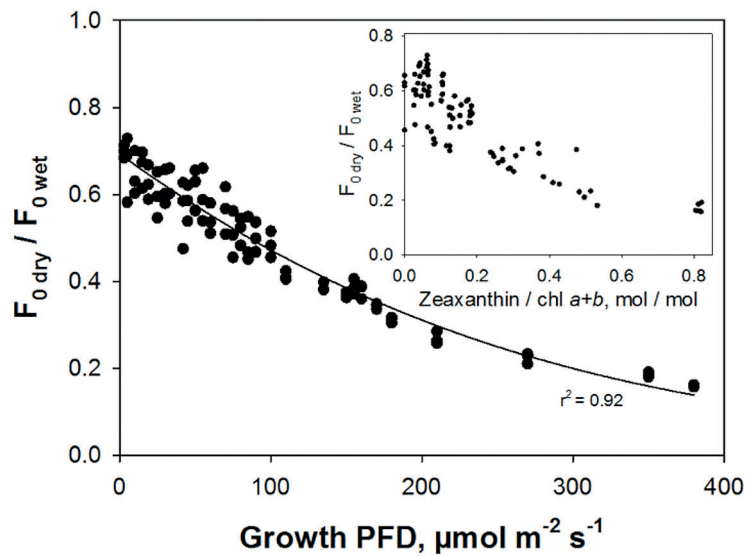
**Fig. 1:** Maximal growth rates ( $r_{max}$ ) of *Trebouxia asymmetrica*, *Chlorella vulgaris* and *Microchloropsis salina* determined as a function of photosynthetic photon flux density. Data are means of three independent cultu-

res for each PFD and alga species. Growth was followed by measurements of OD over 60 days.  $r_{max}$  was modelled according to the law of population growth (Verhulst 1838).



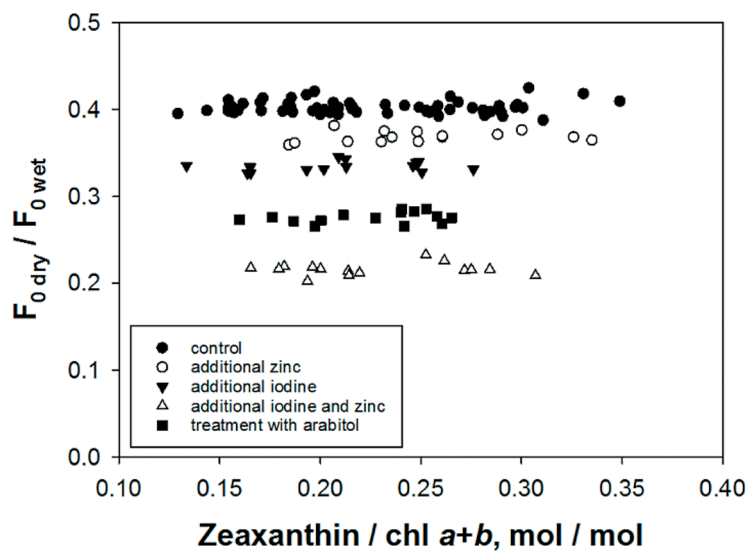
**Fig. 2:** The pool size of the xanthophyll cycle pool and  $F_V/F_M$  of *Trebouxia asymmetrica* as

a function of the growth PFD. Each point refers to one single culture.



**Fig. 3:** Desiccation induced quenching in *Trebouxia asymmetrica* as a function of growth PFD. Each point refers to one single culture. Inset: Desiccation-induced fluo-

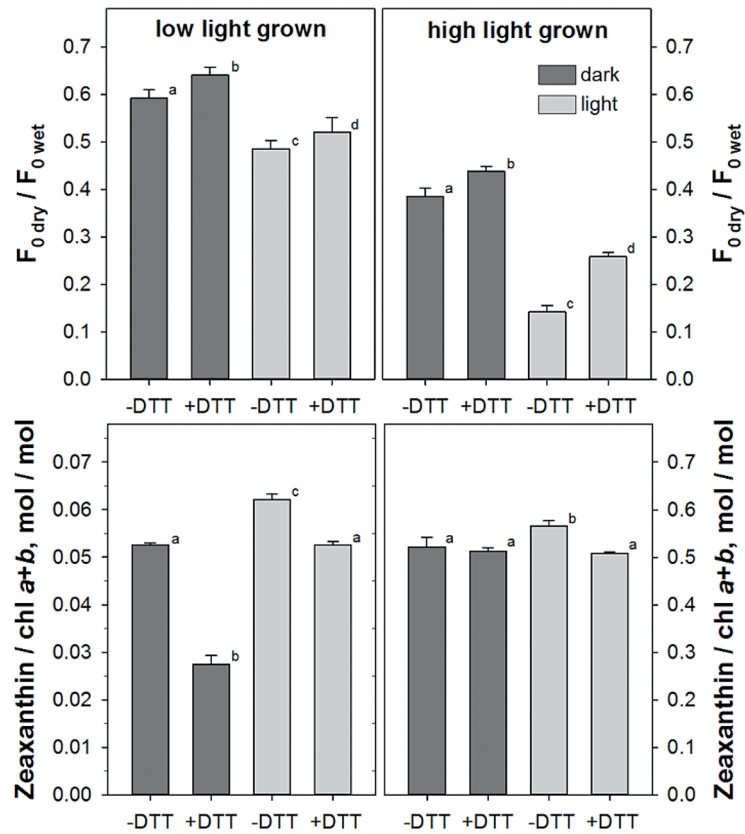
rescence quenching in *T. asymmetrica* as a function of the zeaxanthin content determined after the desiccation treatment.



**Fig. 4:** Desiccation-induced fluorescence quenching in a grown in the presence of additional zinc and/or iodine ions or after incubation with 0.5 M arabitol as a function of the zeaxanthin content determined after the desiccation treatment. Zinc and iodine

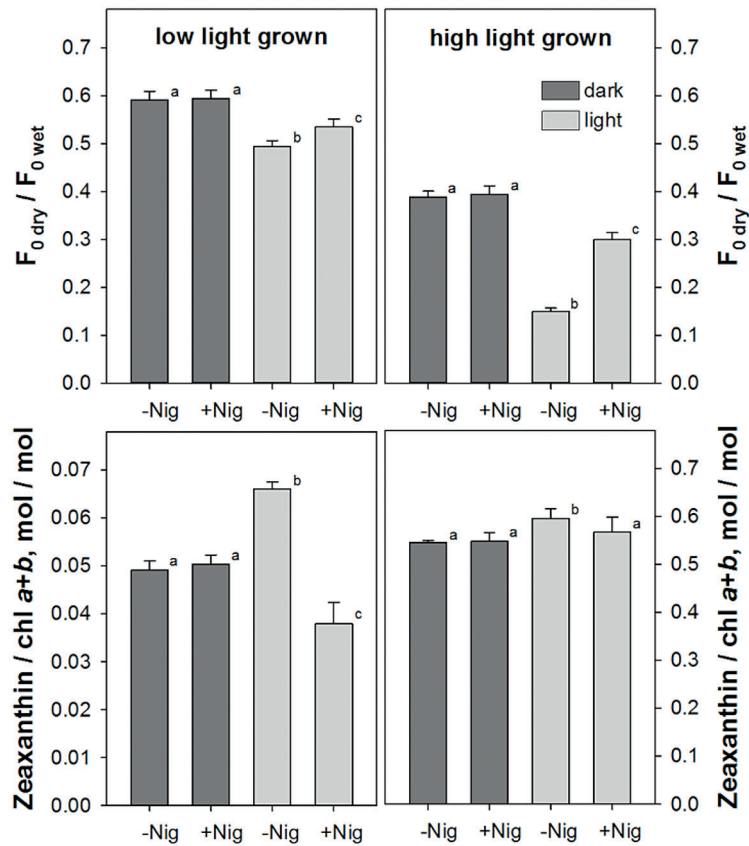
concentrations were 2 times of that present in seawater and were sufficient to saturate their enhancement of  $q_{des}$ . Growth PFD ranged between 95 to 135  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .





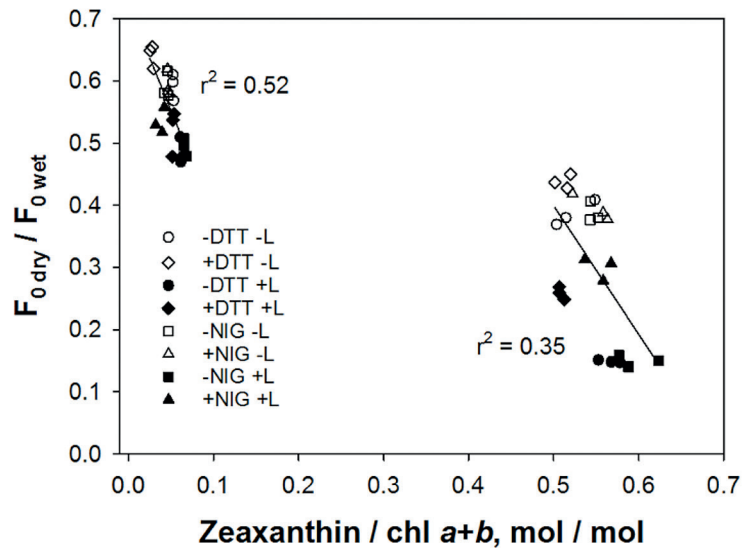
**Fig. 5:** The effect of the presence of 5 mM DTT on  $q_{\text{des}}$  (upper panels) and zeaxanthin content (lower panels) after desiccation with (light grey bars) or without (dark grey bars)

weak light of  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of *Trebouxia asymmetrica* grown at high light ( $210 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and low light ( $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).



**Fig. 6:** The effect of the presence of 6  $\mu\text{M}$  nigericin on  $q_{\text{des}}$  (upper panels) and zeaxanthin content (lower panels) after desiccation with (light grey bars) or without (dark grey bars)

weak light of 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of *Trebouxia asymmetrica* grown at high light (210  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and low light (5  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).



**Fig. 7:**  $q_{des}$  in the presence or absence of DTT or nigericin after desiccation of *Trebouxia asymmetrica* with or without weak light ( $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) as a function of the content of zeaxanthin. The algae with zeaxanthin contents below  $0.1 \text{ mol / mol}$  were cultiva-

ted at low light ( $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), whereas the remaining algae were cultivated at high light ( $210 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). The same data as used for Figs. 5 and 6 are shown. The lines are drawn by linear regression.



*Cladonia rangiferina*

---

## 3.5 Vergleichbarkeit von osmotischem Stress mit durch Austrocknung an der Luft verursachtem Stress in Hinblick auf $q_{des}$

### Einleitung

Es ist auf den ersten Blick naheliegend hyperosmotischen Stress, der unter anderem mit einem Wasserverlust der Zellen verbunden ist, mit Stress durch Trockenheit zu vergleichen. Dies gilt insbesondere für poikilohydre Organismen im Allgemeinen wie auch aeroterrestrische Grünalgen und Photobionten von Flechten im Besonderen, da diese im Gegensatz zu Höheren Pflanzen nur wenige Möglichkeiten haben, ihre Homöostase bezüglich ihres Wasserhaushalts aufrecht zu erhalten. Sowohl bei hyperosmotischem Stress als auch bei Austrocknung an der Luft wird eine Weiterleitung der Anregungsenergie über die Elektronentransportkette erschwert bzw. gänzlich unmöglich gemacht, da zu deren Funktionieren Wasser essentiell erforderlich ist. Dies wiederum macht den betroffenen photosynthetisch aktiven Organismus, den an der Akzeptorseite des PSII ansetzenden Modellen zur Entstehung der Photoinhibition folgend, besonders anfällig gegen durch exzessives Licht verursachte Photoinhibition.  $q_{des}$  ist ein möglicher Schutzmechanismus gegen Photoinhibition im ausgetrockneten Zustand (siehe Kapitel 3.1). Daher ist es naheliegend zu überprüfen, ob ein dem  $q_{des}$  entsprechender, möglicherweise mit diesem mechanistisch identischer, Prozess auch dann zu beobachten ist, wenn der Wasserverlust nicht durch Austrocknung an der Luft sondern durch hyperosmotischen Stress verursacht wird.

Doch auch wie beim Vergleich von Kältetoleranz mit Austrocknungstoleranz (Verhoeven et al. 2017a) gibt es neben vielen Ähnlichkeiten, etwa der zentralen Rolle, die Polyolen als Gegenosmotika zukommt (Schobert 1977) auch gravierende Unterschiede. Bei Austrocknung an Luft findet der Prozess der Plasmolyse nicht statt (Munns 2002) und es kommt neben dem eigentlichen potentiellen Wasserverlust durch hyperosmotische Salzlösungen die Toxizität von Ionen hinzu. Die in die Zelle einströmenden anorganischen Ionen stören die Hydratationssphäre von Makromolekülen und beeinträchtigen so deren Funktion (Xiong and Zhu 2002). Daher ist es, um die Wirkung des durch osmotischen Stresses verursachten Wasserverlustes mit dem durch Austrocknung zu vergleichen, sinnvoll (Bisson and Kirst 1995; Munns 2002) auf Zuckerlösungen (Mannitol, Ribitol etc.) zurückzugreifen, die bei gleicher osmotischen Wirkung zu einer deutlich kleineren Schädigung führen (Gilmour et al. 1984), um den Einfluss, den die Toxizität der Ionen auf den Photosyntheseapparat und damit auch auf die Eigenschaften der Chlorophyllfluoreszenz der untersuchten Algen haben könnte, von vornherein als weiteren Faktor auszuschließen.

Um den Vergleich zwischen den durch Austrocknung an der Luft verursachten Stress durch Trockenheit mit dem durch ein Osmotikum verursachten osmotischen Stress ziehen zu können, ist eine Reihe von Überlegungen notwendig:

Die Konzentration eines Stoffes wird in der Regel in der Einheit mol/l (molare Lösung) oder mol/kg (molale Lösung) angegeben, wobei sich letztere auf die in einer Lösung gelöste Stoffmenge im Verhältnis zur Menge des Lösungsmittels (nicht zur Lösung!) bezieht, weswegen die Werte für die molare und molale Konzentration gerade bei hohen Konzentrationen stark voneinander abweichen.

Die Osmolarität einer Lösung ergibt sich nun aus dem Dissoziationsverhalten eines Stoffes. Ein Molekül NaCl zerfällt in ein Na<sup>+</sup> und ein Cl<sup>-</sup> Ion, daher wäre die ideale Osmolarität also doppelt so groß wie die Molarität einer NaCl-Lösung.

Allerdings ist die Dissoziation eines Salzes nicht immer vollständig und stark von der Konzentration des Salzes und von der Temperatur abhängig (Davies 1938). Zusätzlich dazu kommt es zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den gelösten Ionen, so dass nicht alle gelösten Teilchen einen gleich starken osmotischen Effekt ausüben (Debye and Huckel 1923), so dass auch bei einer vollständigen Dissoziation die reale Osmolarität nicht der idealen Osmolarität entspricht und daher bei dissoziierenden Stoffen stets kleiner ist.

Bei nicht dissoziierenden Stoffen wie Zuckern hingegen ist die reale Osmolarität stets höher als die ideale (Willert et al. 1995). Dies wird durch eine starke Wechselwirkung des gelösten Zuckers mit Wassermolekülen erklärt, die dadurch so stark in die Hydrathülle eingebunden werden, dass sie nicht mehr Teil der frei beweglichen Lösungsmittelmoleküle sind und daher auch nicht mehr als Teil des Lösungsmittels betrachtet werden können. Dadurch verringert sich der Anteil des Lösungsmittels im Verhältnis zum gelösten

Stoff und erhöht sich die reale Osmolarität im Vergleich zur idealen (Zavitsas 2001).

Die reale Osmolarität, die zum Vergleich der Stärke des osmotischen Stresses mit dem durch Austrocknung an der Luft verursachten Trockenstress notwendig ist (s.u.), kann nicht direkt gemessen oder aus der idealen Osmolarität abgeleitet werden (Streng et al. 1978). Sehr wohl kann aber die reale Osmolarität ( $c_{osm}$ ), die sich ebenso wie die Molalität ( $m$ ) einer Lösung auf die Menge des gelösten Stoffes im Verhältnis zur Menge des Lösungsmittels bezieht (Osm/kg), durch die Messung der Gefrierpunktserniedrigung ( $T$ ) gemessen werden, wenn die molare Konzentration des gelösten Stoffes ( $c$ ), der Gefrierpunkt und die kryoskopische Konstante  $E_k$  des Lösungsmittels bekannt sind (bei Wasser 273,2 K bzw. 1,858 K kg/mol) (Willert et al. 1995; Zatloukal 2009; Šklubalov and Zatloukal 2010):

$$c_{osm} = \frac{\Delta T/E_k}{m} \cdot c$$

Mit der so ermittelten realen Osmolarität  $c_{osm}$  lässt sich nun das Wasserpotential  $\psi_s$ , das unter diesen Umständen dem osmotischen Potential  $\psi_s$  entspricht, mit der absoluten Temperatur  $T$  und der allgemeinen Gaskonstanten  $R$  errechnen:

$$c_{osm} \cdot R \cdot T = -\psi_s \approx -\Psi$$

Und dieses sich aus der realen Osmolarität ergebende Wasserpotential ist mit dem aus dem molaren Volumen ( $V_m$ ), Temperatur und relativer Luftfeuchte berechenbaren Wasserpotential (Brennicke and Schopfer 2010),

$$\Psi = \frac{R \cdot T}{V_m} \cdot \ln(rF)$$

welches während der Austrocknung an Luft einer definierten Luftfeuchte herrschte, direkt vergleichbar.

## Fragestellungen

Da nun ein direkter Vergleich des auf die Zellen einwirkenden Wasserpotentials unabhängig davon, ob dieses durch die Osmolarität einer Lösung einer bestimmten Konzentration eines Osmotikums oder aber durch eine bestimmte Luftfeuchte der Umgebungsluft verursacht wird, möglich ist, kann mit diesem Ansatz überprüft werden, ob bei *T. asymmetrica*, die bei Austrocknung an der Luft einen deutlichen  $q_{des}$  zeigt, dies auch bei hyperosmotischem Stress der Fall ist. Neben der Reduktion der Grundfluoreszenz  $F_0$  ist auch  $F_v/F_M$  ein wichtiger Parameter. Nur dann, wenn durch Anregungslicht keine variable Fluoreszenz mehr verursacht werden kann, also  $F_v/F_M$  gegen Null sinkt, ist davon auszugehen, dass die Anregungsenergie tatsächlich über das NPQ abfließt und daher auch eine dem  $q_{des}$  vergleichbare Schutzfunktion anzunehmen ist. Kurzum: Tritt bei osmotischem Stress bei *T. asymmetrica* ein dem  $q_{des}$  vergleichbares Phänomen auf oder nicht? Und falls ja, worin liegen die Unterschiede und Ähnlichkeiten dieser beiden Phänomene?

Bei der Untersuchung von  $q_{des}$ , definitionsgemäß durch Austrocknung an der Luft hervorgerufen, an *T. asymmetrica* und anderen austrocknungstoleranten Grünalgen war der direkte Vergleich mit *C. vulgaris*, einer austrocknungssensitiven Alge, hilfreich (siehe Kapitel 3.1) Es wurde untersucht, wie sich

die Chlorophyllfluoreszenzparameter dieser Alge im Vergleich zu *T. asymmetrica* unter der Einwirkung von osmotischem Stress verändern. Dies war insbesondere wichtig, um spezifische, dem  $q_{des}$  entsprechende Reaktionen von *T. asymmetrica* von solchen unterscheiden zu können, die nicht oder nicht direkt mit  $q_{des}$  verbunden sind. Welche Veränderungen sind bei den Chlorophyllfluoreszenzparametern auch bei *C. vulgaris* unter osmotischem Stress zu beobachten und sind daher nicht mit  $q_{des}$  vergleichbar?

## Material und Methoden

Abweichend zu dem in Wieners et al. 2018b beschriebenen Protokoll für die Anzucht der Mikroalgen wurden *T. asymmetrica* und *C. vulgaris* in 5 L Schott-Flaschen (Schott AG, Mainz, Deutschland) in Bold's Basal Medium (BBM) (Starr and Zeikus 1993) bei Raumtemperatur auf einer Fensterbank (ONO 77°) kultiviert und mit Pressluft (25 L/min) belüftet. Das Medium selbst hatte eine ideale Osmolarität von 0,01° Osm/L, so dass das osmotische Potential des Mediums für die folgenden Experimente zu vernachlässigen war (Schörle 2017).

Die Entnahme der Algen und deren Aufkonzentration durch Zentrifugation folgten dem in Wieners et al 2018b beschriebenen Protokoll. Ähnlich wie dort wurden die Algen ebenso auf Filterpapierscheiben (NM 615, Macherey-Nagel, Düren, Germany) suspendiert und das Wasser durch Kapillarwirkung entzogen. Aber um ein Austrocknen der Proben zu verhindern, fand dies in einem Exsikkator, dessen Trocknungsmittelkammer mit Wasser gefüllt war und dessen Wände zusätzlich mit vollentsalztem Wasser befeuchtet wurden, bei 100% relativer Luftfeuchtigkeit

keit über Nacht statt.

Dann wurden die Proben mit der entstandenen Algenschicht nach unten zur weiteren Behandlung in 24-Well-Platten der Firma Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland) gegeben. In den Wells befanden sich jeweils 210 µL BBM Lösung. Damit befanden sich die zu untersuchenden Algen direkt an der Unterseite der Wells und in BBM-Medium. Um ein Aufschwimmen der Proben im weiteren Verlauf der Experimente zu verhindern, wurden die Filterpapierscheiben durch O-Ringe auf dem Grund der Wells fixiert. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass sich bei der Chlorophyllfluoreszenzmessung der Abstand zwischen den Algen einerseits und der Faseroptik andererseits nicht verändern konnte.

Für die Experimente wurde Sorbitol wegen seiner geringen Zytotoxizität und hohen Löslichkeit als Osmotikum gewählt (Gilmour et al. 1984). Die wirksame Endkonzentration durch die Summe der zugegebenen Sorbitol-Lösungen und dem bereits in den Wells vorhandenen BBM-Mediums berechnet (Tabelle 1). Die Experimente wurden mit folgenden effektiven Konzentrationen an Sorbitol durchgeführt. Das jeweilig wirksame Wasserpotential wurde wie in der Einleitung erläutert rechnerisch ermittelt.

**Tab. 2:** Auflistung der sich über einer gesättigten Lösung der entsprechenden Salze bei 20°C ergebende Luftfeuchte in rH% und das daraus resultierende Wasserpotential  $-psi$  in MPa.

Mol/ L	Osm	-psi MPa
0,01 M	0.01	0.02
0,01 M	0.01	0.02
0,1 M	0.1	0.25
0,2 M	0.2	0.49
0,4 M	0.4	0.99
0,55 M	0.55	1.36
0,99 M	1	2.47
1,92 M	2	4.94
2,92 M	3.2	7.91
3,65 M	4.18	10.33
4,21 M	4.98	12.3
4,55 M	5.5	13.59

**Tab. 1:** Konzentrationen der für die Experimente verwendeten Sorbitol-Lösungen in mol/L und die sich daraus ergebenden Werte der Osmolarität in Osmol und des Wasserpotentials in  $-psi$  (Schörle 2017).

Vergleichend fanden Experimente statt, in denen Proben von *T. asymmetrica*, dem in Wieners et al. 2018b dargestellten Protokoll folgend, über verschiedenen gesättigten Salzlösungen, die die Luftfeuchtigkeit definierten, ausgetrocknet wurden (Tabelle 2):

	rH% bei 20°C	-psi MPa
Wasser	100	0
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	95	7.02
KNO <sub>3</sub>	92	11.41
KCl	84.5	23.04
NaCl	75	39.36

Für die Messung der Chlorophyllfluoreszenz



wurde ein PAM-2000-Fluorometer der Firma Walz GmbH (Effeltrich, Deutschland) verwendet. Die Messung, der mit Sorbitol-Lösungen verschiedener Konzentrationen behandelten Proben, erfolgte von unten durch die Böden der einzelnen Wells der Multiwellplatten, wobei ein entsprechender Aufbau dafür sorgte, dass der Abstand der Lichtfaseroptik des Fluorimeters bei jeder Messung konstant blieb. Vor der Messung wurden die Algen für eine Stunde vorverdunkelt. Die Messung der über verschiedenen Salzlösungen getrockneten Algen erfolgte nach dem in Wieners et al 2018b vorgestellten Protokoll.

Für den Vergleich der Chlorophyllfluoreszenzparameter wurden die Werte vor der Zugabe der Sorbitol-Lösungen mit denen nach einer Stunde Einwirkzeit verglichen. Für die Proben, die an Luft verschiedener Luftfeuchte getrocknet wurden, wurden, dem in Wieners et al 2018b dargestellten Protokoll folgend, die Werte nach 24h Rehydrierung bei 100% relativer Luftfeuchte als Referenz verwendet.

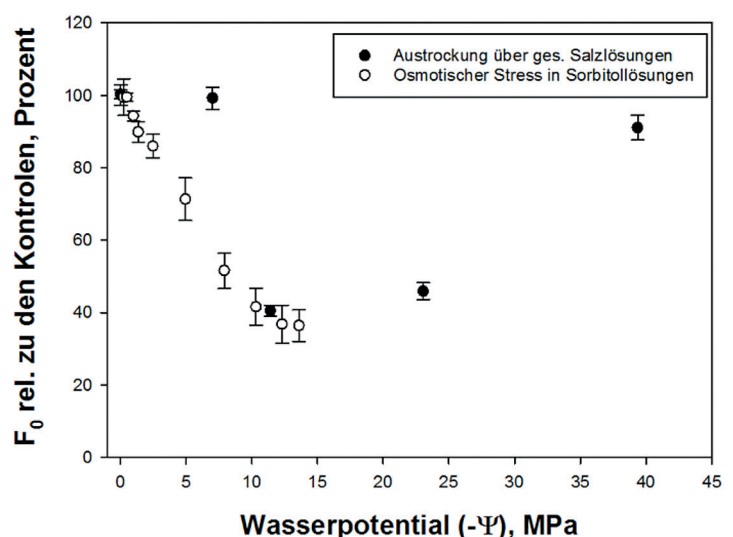
## Ergebnisse

Es ist in Abb. 2 erkennbar, dass trotz experimenteller Unterschiede die Reduktion von  $F_0$  nach Erreichen eines Equilibriums mit der

Umgebungsluft bei einer relativen Luftfeuchte von 92% und damit einem Wasserpotential von -11,4 MPa vergleichbar stark ausfiel wie nach der Einwirkung einer Sorbitol-Lösung mit einem vergleichbar großen Wasserpotential. Bei verhältnismäßig hohen Luftfeuchten, entsprechend der Wasserpotentiale zwischen 0 und 7 MPa, blieb  $F_0$  konstant auf einem Wert, wie er auch in wasserdampfgesättigter Luft bei 100% r.H. gemessen werden kann, während es bei Sorbitol-Lösungen mit vergleichbarem Wasserpotential bereits zu einem deutlichen Absinken des  $F_0$  Werts im Vergleich zum Startwert kam. Bei osmotischem Stress konnte in einem weiten Bereich ein bestimmtes Wasserpotential einer bestimmten Verringerung von  $F_0$  zugeordnet werden. Bei der Austrocknung an der Luft ist das nicht der Fall. Hier kam es entweder zu einer massiven Reduktion von  $F_0$  oder nicht. Bei sehr niedrigen Wasserpotentialen kleiner als -15 MPa war bei der Austrocknung die Reduktion von  $F_0$  weniger stark ausgeprägt als bei höheren Wasserpotentialen. Aufgrund der Löslichkeit von Sorbitol gibt es hier keine Vergleichswerte für osmotischen Stress.

Was die variable Fluoreszenz betrifft (Abb. 3), so sind die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der beiden verschiede-

**Abb. 2:** Vergleich von  $q_{des}$ , also eine durch Austrocknung an Luft verursachte Reduktion von  $F_0$  (schwarze Kreise) und der Reduktion von  $F_0$  durch osmotischen Stress (weiße Kreise) bei *T. asymmetrica*. Die Daten für Letztere stammen aus Schörle (2017). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Stichprobengröße für die Experimente mit osmotischen Stress betrug  $n=8$ , die für die Experimente mit Austrocknung an Luft definierter relativer Feuchte  $n=15$ .

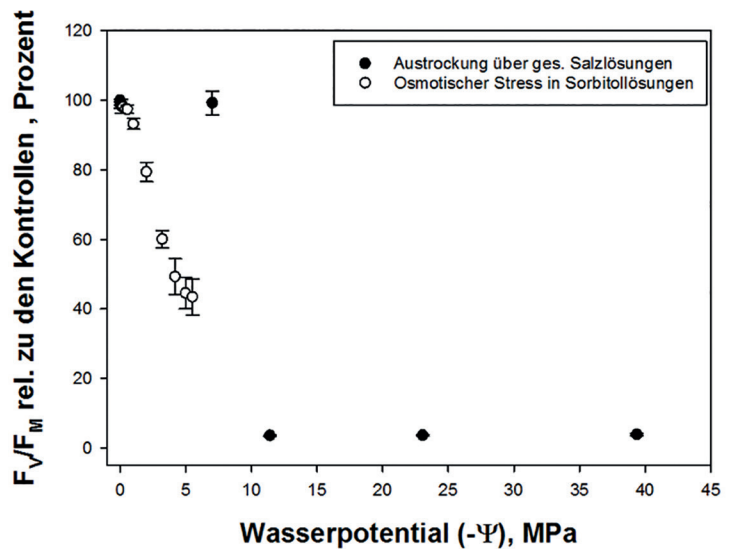


nen experimentellen Ansätze sehr deutlich: Während  $F_V/F_M$  bei *T. asymmetrica* bei Austrocknung an der Luft massiv absank, war die Reduktion bei osmotischem Stress durch Sorbitol-Lösungen sehr viel geringer und von der Stärke des osmotischen Potentials abhängig. Bei relativ hohen Feuchten, im Bereich von bis zu etwa 10 MPa Wasserpotential, blieb  $F_V/F_M$  trotz des Wasserpotentials auf einem dem Referenzwert vergleichbarem Niveau. Unterhalb einer bestimmten Grenze fiel dagegen die variable Fluoreszenz auf null ab. Wieder kann bei den mit Sorbitol-Lösungen behandelten Algen eine bestimmte Reduktion einem bestimmten Wasserpotential

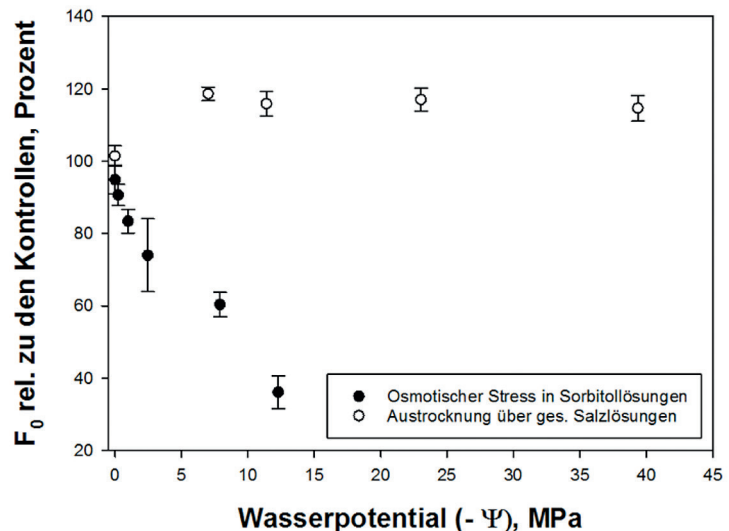
zugeordnet werden. Die Reduktion von  $F_V/F_M$  durch osmotischen Stress scheint in einem logistischem Verhältnis zur Stärke des negativen Wasserpotentials zu stehen, während es bei der Reduktion von  $F_V/F_M$  durch verschiedene Luftfeuchten einen Schwellenwert zu geben scheint, bei dessen Unterschreiten die variable Fluoreszenz verschwindet, aber oberhalb dieses Schwellenwertes kein Rückgang von  $F_V/F_M$  zu beobachten ist.

Die Ergebnisse der Experimente zur Vergleichbarkeit zwischen osmotischem Stress und dem Stress durch Austrocknung an Luft werden im Abschnitt 4.10 diskutiert.

**Abb. 3:** Vergleich des Rückgangs von  $F_V/F_M$  von *T. asymmetrica* bei Austrocknung bei definierter Luftfeuchte (schwarze Kreise) und bei osmotischem Stress durch eine Sorbitollösung (weiße Kreise). Die Daten für Letztere stammen aus Schörle (2017). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Stichprobengröße für die Experimente mit osmotischen Stress betrug  $n=8$ , die für die Experimente mit Austrocknung an Luft definierter relativer Feuchte  $n=15$ .



**Abb. 4:** Rückgang von  $F_0$  bei *C. vulgaris* durch osmotischen Stress in Sorbitol-Lösungen. Die Daten stammen aus Schörle (2017). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Stichprobengröße für die Experimente betrug  $n=8$ .



## 4. Diskussion

### 4.1 Die Bestimmung von $q_{des}$

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die durch Austrocknung induzierte Lösung der Chlorophyll-grundfluoreszenz und die mögliche Rolle dieses  $q_{des}$  als Schutz gegen Photoinhibition bei aeroterrestrischen Grünalgen untersucht, was es voraussetzt,  $q_{des}$  reproduzierbar messen und die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können.

Auf den ersten Blick erscheint es keine besondere Herausforderung zu sein, die Veränderung der Stärke eines Fluoreszenzsignals zu messen, um  $q_{des}$  zu ermitteln. In der Praxis aber stellte dies eine wesentliche Hürde dar, die überwunden werden musste. Zunächst einmal ist die Stärke des  $F_0$ -Signals nicht nur von den energetischen Zuständen des PSII abhängig, sondern auch von der Stärke des Messlichtes, dem Abstand des Endes des Lichtwellenleiters zur Probe, den optischen Eigenschaften dieser und natürlich auch von der Signalverstärkung innerhalb des Messgerätes. Daher musste der Messvorgang selbst in hohem Maße standardisiert werden, um miteinander vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Ein weiteres Problem stellte sich ein, als sich zeigte, dass bei vielen der untersuchten Algen der  $F_0$  Wert im hydrierten Zustand keineswegs stabil war, sondern schon zu einem Zeitpunkt, an dem Trockenstress noch keine plausible Erklärung sein konnte zusammen mit dem Wert für  $F_V/F_M$  zu steigen begann, ehe es danach zu dem erwarteten Abfall beider Werte kam. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits vielfach bei Flechten beobachtet, war aber zum Teil mit der Veränderung des optischen Systems Flechte

während der Austrocknung erklärt worden (Heber et al. 2007b).

Dieser Anstieg von  $F_0$  und  $F_V/F_M$  ist möglicherweise auf die Versorgung der Algen mit  $CO_2$  zurückzuführen. Bei aquatischen Algen erfolgt die Aufnahme von Kohlenstoff (überwiegend) nicht durch im Wasser gelöstes  $CO_2$ , das ohnehin zumeist nur in geringen Mengen vorliegt, sondern über die Aufnahme von Hydrogencarbonat- und Carbonat-Ionen über einen dafür geeigneten Carbon Concentration Mechanism (CCM) (Schwoerbel and Brendelberger 2013). Diese stehen natürlich über das Dissoziationsgleichgewicht der Kohlensäure  $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$ ;  $H_2CO_3 + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + HCO_3^-$  und  $HCO_3^- + H_2O \rightleftharpoons CO_3^{2-} + H_3O^+$  auch in Beziehung zur Konzentration des im Wasser gelösten  $CO_2$ , aber auch zur Konzentration der vorhandenen Metall-Ionen wie  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ , und  $Ca^{2+}$  (etwa im Calciumcarbonat-Kohlensäure-Kohlenstoffdioxid-Gleichgewicht) und dem pH-Wert (Atkins and Jones 2006; Schwoerbel and Brendelberger 2013). Für eine optimale Versorgung von aquatischen Algen mit Kohlenstoff sind die verwendeten Medien gut geeignet (Andersen 2005). Bei vielen aeroterrestrischen Algen hingegen fehlt aber, wie auch bei den meisten (terrestrischen) höheren Pflanzen, die CCM, die diese zur Aufnahme von Karbonat-Ionen befähigen würden (Atkinson et al. 2016). Daher ist es naheliegend zu vermuten, dass aeroterrestrische Algen wie *T. asymmetrica* in flüssigen Kulturmedien wie BBM+V ohne zusätzliche Belüftung möglicherweise Kohlenstoff-limitiert sind.

Verdunstet nun zunächst das flüssige Wasser, das die Algenzellen umgibt, so wird dadurch die Versorgung mit  $CO_2$  verbessert, was sich möglicherweise im An-

stieg des  $F_0$  und des  $F_V/F_M$  äußert. Dieses Phänomen trat nicht bei aquatischen Algen auf und war auch dann nicht zu beobachten, wenn *T. asymmetrica* abweichend von den in den Publikationen beschriebenen Kulturbedingungen zusätzlich mit Umgebungsluft begast wurden (Schörle 2017).

Dass die Werte für  $F_0$  vor Beginn der eigentlichen Austrocknung nicht konstant und erheblichen zeitlichen Veränderungen unterworfen waren, machte die etwas umständlich erscheinende Definition des Referenzwertes für den  $q_{des}$  erforderlich: Als Vergleichswert wurde der  $F_0$ -Wert gewählt, bei dem gleichzeitig der  $F_V/F_M$  Wert sein Maximum erreichte. Doch auch dieses Maximum war nicht unter allen Austrocknungsbedingungen gleich hoch, was es erforderlich machte einen weiteren Schritt in das Protokoll einzufügen und die Proben erneut mit wasserdampfgesättigter Luft zu befeuchten, womit die Fähigkeit vieler aeroterrestrischer Algen genutzt wurde, Luftfeuchte als Quelle für Wasser zu nutzen (Bertsch 1966b; Lange and Kilian 1985; Lange et al. 1989b; Phinney et al. 2018). Auf diese Weise wurde vermieden, dass die Algen von einem Wasserfilm bedeckt wurden. Nach 24 Stunden stellten sich nun stabile Maximalwerte für  $F_V/F_M$  und  $F_0$  ein, die als Referenzpunkte für die Ermittlung von  $q_{des}$  genutzt werden konnten.

Dieses Protokoll wurde bei den Experimenten, die dem ersten im Rahmen dieser Arbeit erstellten Artikel (Wieners et al. 2012) zugrunde liegen, noch nicht angewandt, da das Problem mit dem Anstieg des  $F_0$ -Wertes während der Austrocknung erst bei einer kontinuierlichen Messung des Vorgangs in Erscheinung tritt. Da der Ablauf der Experimente aber bereits stark standardisiert war, bleibt auch bei erweitertem Erkenntnisstand

der Wert der Daten der unter gleichen Bedingungen gemessenen Proben relativ zueinander bestehen. Lediglich eine Vergleichbarkeit zu davon abweichenden Experimenten ist nicht im vollen Umfang gegeben.

#### 4.2 $q_{des}$ ist ein Schutzmechanismus gegen Photoinhibition

Im Rahmen der dem Artikel von 2012 zugrunde liegenden Experimente zeigte sich, dass es eine gute negative Korrelation zwischen der Stärke von  $q_{des}$  und der durch eine Exposition mit starkem Licht verursachten Reduktion von  $F_V/F_M$  im ausgetrockneten Zustand der untersuchten Grünalgen gab.

Die gängigen Modelle zur Photoinhibition lassen vermuten, dass photosynthetisch aktive Organismen im stoffwechsellaktiven Zustand gegen exzessives Licht besonders empfindlich sind. Aber im Gegensatz dazu erwiesen sich die zu  $q_{des}$  fähigen Algen gerade im ausgetrockneten Zustand als erheblich widerstandsfähiger als im stoffwechselaktiven, hydrierten Zustand. Nach der Wiederbenetzung zeigten die im trockenen Zustand belichteten Algen höhere  $F_V/F_M$ -Werte als dies bei den Algen der Fall war, die im feuchten, stoffwechselaktiven Zustand exponiert worden waren. Beide Beobachtungen zusammen zeigen, dass  $q_{des}$  tatsächlich eine entscheidende Rolle beim Schutz von aeroterrestrischen Grünalgen gegen Photoinhibition spielt. Durch die Gabe von Jod- und Zink-Ionen ins Nährmedium (siehe Kapitel 4.7) konnte die Stärke des  $q_{des}$  erhöht werden und darauf folgende Expositionsexperimente zeigten, dass dieser stärkere  $q_{des}$  mit einer Verbesserung des Schutzes vor Photoinhibition einher ging, was ein weiteres starkes Indiz für die Rolle von  $q_{des}$  als

---

Schutzmechanismus der aeroterrestrischen Grünalgen gegen Lichtstress im ausgetrockneten Zustand darstellt.

Allerdings ist zu beachten, dass  $q_{des}$  natürlich nicht der einzige Schutzmechanismus ist über den austrocknungstolerante photosynthetisch aktive Organismen gegen Lichtstress verfügen: Von Screening-Pigmenten innerhalb der Zellen (Solovchenko and Merzlyak 2008) und effektiven Schutzsubstanzen gegen oxidativen Stress (Gill and Tuteja 2010) über die Beschattung der Zellen durch weitere Gewebeschichten, die auch abschirmende Substanzen enthalten können (Gauslaa and Solhaug 2004; Solhaug et al. 2010), bis hin zu der Veränderung der optischen Eigenschaften des ganzen Organismus, wie er bei vielen Flechten zu beobachten ist (Veerman et al. 2007), gibt es zahlreiche weitere Schutzmechanismen. Auch die Bildung einer Bio-Kruste, wie es für viele aeroterrestrische Algen typisch ist, hat eine gewisse Schutzfunktion vor Sonneneinstrahlung (Belnap 2003, 2006; de La Torre et al. 2010). Die bei aeroterrestrischen Grünalgen unter natürlichen Bedingungen beobachtete ungewöhnliche Widerstandsfähigkeit gegen Lichtstress ist daher die Summe all dieser Schutzmechanismen.

#### 4.3 Die Fähigkeit zu $q_{des}$ ist unter aeroterrestrischen Grünalgen weit verbreitet

Die Reihenuntersuchung einer größeren Anzahl von einzelligen Grünalgen nach dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Protokoll zeigte, dass die Fähigkeit zu austrocknungsinduziertem Chlorophyllfluoreszenz-Quenching bei aeroterrestrischen Grünalgen generell weit verbreitet ist. Es ist besonders hervorzuheben, dass alle aus

Flechten isolierten Grünalgen unter den gewählten Bedingungen dazu in der Lage waren. Dies widerlegt eindeutig die in der Literatur zu findende Hypothese, dass Photobionten für die Ausbildung von  $q_{des}$  auf bestimmte vom Pilzpartner der Flechtensymbiose gebildete Komponenten angewiesen wären (Kosugi et al. 2013). Weiterhin zeigte sich, dass eine klare Korrelation zwischen der Fähigkeit einer Grünalge, bei Austrocknung  $q_{des}$  zu zeigen und deren Toleranz gegen Austrocknung selbst besteht. In keinem einzigen Fall wurde beobachtet, dass  $q_{des}$  aufgetreten wäre, ohne dass die betreffende Alge auch Austrocknungstoleranz gezeigt hätte, oder aber dass eine Alge kein  $q_{des}$  gezeigt hätte, dennoch aber keinen massiven, irreparablen Schaden durch die Austrocknung erlitt. Dies ist umso erstaunlicher, als dass  $q_{des}$  ja nur eine von vielen Anpassungen zur Austrocknungstoleranz darstellt, wie in der Einleitung ausführlich dargelegt wurde, und daher ein anderes Ergebnis durchaus denkbar gewesen wäre.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass  $q_{des}$  mit hoher Wahrscheinlichkeit unter aeroterrestrischen Grünalgen, frei lebenden wie lichenisierten, eine weit verbreitete Adaption an die poikilohydre Lebensweise dieser Organismen darstellt und die Fähigkeit dazu unter diesen eher die Regel als die Ausnahme ist.

#### 4.4 Die Lichtbedingungen während des Wachstums haben einen großen Einfluss auf $q_{des}$

Für alle photoautotrophen Organismen ist Licht wohl einer der wichtigsten Umweltfaktoren. Und gerade bei einem Phänomen, dessen Sinn und Zweck höchstwahrschein-

lich der Schutz vor Lichtstress darstellt ist es mehr als naheliegend zu vermuten, dass Veränderungen der Lichtbedingungen während des Wachstums auch auf  $q_{des}$  einen Einfluss haben könnten. Diese Vermutung hat sich bei den dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimenten in vollem Umfang bestätigt. Je höher die Lichtintensität war, unter denen *T. asymmetrica* kultiviert wurde, desto stärker fiel bei den dann folgenden Austrocknungsexperimenten der gemessene  $q_{des}$  aus.

Dies legt einen Zusammenhang zwischen dem ebenfalls stark vom Wachstumslicht abhängigen Xanthophyllzyklus, insbesondere im Hinblick auf die Größe des VAZ-Pools im Verhältnis zur Konzentration des vorhandenen Chlorophylls, nahe, was an späterer Stelle der Diskussion ausführlicher behandelt werden soll.

Neben den Experimenten zur Wirkung des Wachstumslichtes auf  $q_{des}$  wurde auch der Einfluss der Lichtbedingungen auf die Wachstumsraten von *T. asymmetrica* im Vergleich zu *C. vulgaris* und *M. salina* untersucht. Dabei zeigte sich, dass *T. asymmetrica* mit einer erstaunlichen Plastizität auf verschiedene Lichtintensitäten reagieren kann. Selbst unter extremen Schwachlichtbedingungen, bei denen weder *C. vulgaris* noch *M. salina* gedeihen konnten, war bei *T. asymmetrica* noch ein Wachstum festzustellen. Gleichzeitig blieben bei Starklicht die Wachstumsraten im Vergleich zu niedrigeren (optimalen?) Lichtintensitäten konstant, während die Wachstumsraten von *C. vulgaris* zurückgingen. Diese Kombination aus einem sehr niedrigen Lichtkompensationspunkt einerseits und relativer Unempfindlichkeit gegenüber Starklicht andererseits ist ausgesprochen bemerkenswert und deutet darauf hin, dass *T. asymmetrica* wahrscheinlich auch unter natürlichen Be-

dingungen innerhalb der Flechtensymbiose in einem sehr weiten Bereich verschiedener Lichtbedingungen gut gedeihen kann.

4.5 Die Austrocknungsgeschwindigkeit ist für  $q_{des}$  ein kritischer Faktor

Es zeigte sich, dass der Austrocknungsgeschwindigkeit eine entscheidende Bedeutung bei der Ausbildung von  $q_{des}$  zukommt. Im Rahmen der Experimente, bei denen die Proben bei verschiedenen hohen, durch gesättigte Lösungen verschiedener Salze gepufferten Luftfeuchten ausgetrocknet wurden, zeigte sich, dass die Stärke von  $q_{des}$  in hohem Maße von der herrschenden Luftfeuchte und damit von der durch diese bedingten Austrocknungsgeschwindigkeit abhängt. Bei einer zu raschen Austrocknung war, selbst bei der Wahl eines geeigneten Referenzpunktes zur Bestimmung von  $q_{des}$ , kaum eine Verringerung von  $F_0$  während der Austrocknung messbar, während bei einer relativ hohen Luftfeuchte und damit einer langsameren Austrocknung ein sehr deutlicher  $q_{des}$  beobachtet werden kann.

Weiterhin wurde beobachtet, dass bei einer sehr raschen Austrocknung durch sehr niedrige relative Luftfeuchte (33% r.H.) die gemessene Stärke der Grundfluoreszenz  $F_0$  konstant bleibt, so als habe die schnelle Austrocknung das Fortschreiten des für die Ausbildung von  $q_{des}$  notwendigen Prozesses unterbunden. Möglicherweise ist dies auf die rasche Ausbildung eines glasartigen Zustandes durch Substanzen wie Trehalose zurückzuführen. Es ist bekannt, dass dieser jedwede Enzymaktivität unterbindet (Fernández-Marín et al. 2013).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass der Prozess, der zur Bildung von  $q_{des}$  führt,

ein aktiver ist, der einsetzt, wenn ein gewisser Wassergehalt in den Zellen der Algen unterschritten wird, und selbst ein Minimum an Wasser benötigt. Das  $q_{des}$  einfach nur von der Konzentration eines in konstanter Menge in der Zelle vorhandenen Stoffes abhängt, die mit zunehmendem Wasserverlust steigt, kann daher sicher ausgeschlossen werden, denn in einem solchen Szenario sollte die Bildung von  $q_{des}$  nicht von der Austrocknungsgeschwindigkeit abhängig sein.

Weiterhin könnte die Beobachtung, dass die Stärke von  $q_{des}$  von der Austrocknungsgeschwindigkeit abhing, die sich zum Teil stark widersprechenden Ergebnisse bei den Untersuchungen von isolierten Flechten-Photobionten hinsichtlich ihrer Fähigkeit zu  $q_{des}$  erklären (Kosugi et al. 2009, 2013): Erfolgte die Austrocknung zu rasch, wäre kein  $q_{des}$  beobachtet worden, wiewohl diese Algen möglicherweise unter anderen Bedingungen bei geringerer Austrocknungsgeschwindigkeit sehr wohl in der Lage gewesen wären, dieses Phänomen zu zeigen. Wird nun durch weitere Faktoren, wie etwa das Vorhandensein eines wirksamen Osmotikums oder andere Eigenschaften wie etwa Wassergehalt oder Dicke der Proben die Austrocknungsrate verändert, so sollte sich das erheblich auf die Stärke des beobachteten  $q_{des}$  auswirken.

Ein Flechtenthallus oder das Lager aero-terrestrischer Algen bilden einen Puffer für Wasser und Luftfeuchtigkeit, so dass die Austrocknungsrate, denen die Algen im Inneren einer Flechte ausgesetzt sind, deutlich niedriger sein dürften als die, denen die isolierten Flechtentalgen bei gleicher Luftfeuchte ausgesetzt wären. Dies könnte erklären, warum man bei einer intakten Flechte einen starken  $q_{des}$  beobachten kann, aber bei aus dieser Flechte isolierten Photobionten unter

scheinbar gleichen Bedingungen nicht mehr (Kosugi et al. 2009).

Unter natürlichen Umständen stellt nicht nur das Flechten- oder Algenlager selbst einen Puffer dar, sondern die gesamte Umgebung wie auch das Substrat. Zudem sind sehr rasche Wechsel der Luftfeuchte von 100% zu Werten unter 30%, wie etwa bei der Trocknung über Silicagel unter den Bedingungen des Freilandes nicht zu erwarten. Daher ist davon auszugehen, dass Flechten und aero-terrestrische Algen an ihren natürlichen Standorten in der Regel genug Zeit haben dürften, um  $q_{des}$  auszubilden. Es ist zudem gut möglich, dass die Geschwindigkeit, mit der ein bestimmter Standort austrocknet, einen erheblichen Einfluss darauf haben kann, ob und welche aero-terrestrischen Algen oder Flechten an diesem gedeihen können. Möglicherweise ist die für einen Standort maximal auftretende Austrocknungsrate ein Faktor, der bei der Bildung der für Flechtengemeinschaften typischen Patchiness (Ott et al. 1996) eine Rolle spielt.

Zusätzlich kommt noch hinzu, dass die Wahl eines geeigneten Referenzpunktes für die Messung von  $q_{des}$  von entscheidender Bedeutung ist und man durch dessen Wahl bei einem identischen Verlauf von  $F_0$  über die Zeit zu höchst unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Stärke des  $F_0$  Quenchs kommen kann, wie sich im Artikel Wieners et al. (2018b) zeigen ließ. Daher muss der Referenzpunkt zur Bestimmung von  $q_{des}$  für verschiedene Algen und Flechten unter Berücksichtigung des (möglicherweise sehr unterschiedlichen) zeitlichen Verlaufs von  $F_0$  und  $F_V/F_M$  während des Experimentes gewählt werden.

## 4.6 Wirkung von Arabitol und Trehalose

Wie schon in der Einleitung dieser Arbeit dargelegt kommt Zuckern eine wichtige Rolle bei der Austrocknungstoleranz von zur Kryptobiose fähigen Lebewesen zu. Es wird vermutet, dass sie einerseits das zur Aufrechterhaltung der Strukturen von Proteinen und Membranen notwendige Wasser ersetzen und andererseits auch maßgeblich an der Bildung des glasartigen Zustandes, in den das Zytoplasma ab einem gewissen, niedrigen Wassergehalt übergeht, beteiligt sind. Darüber hinaus sind auch andere potentielle Wirkmechanismen dieser Zucker unter Diskussion: Unter gewissen Umständen kann Trehalose wohl sogar als Schutz vor Photoinhibition dienen (Yanykin et al. 2016). Wegen der zentralen Rolle, die der Ausbildung des glasartigen Zustands des Zytoplasmas bei der Austrocknungstoleranz im Allgemeinen zukommt, erschien es folgerichtig zu untersuchen, inwieweit Zucker auch eine Rolle bei der Bildung des  $q_{des}$ , eines ebenfalls mit Austrocknungstoleranz verbundenen Phänomens, bei isolierten Photobionten spielen.

Bei Experimenten mit Trehalose-Lösungen zeigte sich jedoch bei *T. asymmetrica* und *Coccomyxa* sp. kein Einfluss auf die Stärke des  $q_{des}$  dieser Algen. Sehr wohl zeigte sich aber, dass Trehalose bei Lichtexposition im nassen, stoffwechselaktiven Zustand eine gewisse Schutzfunktion haben könnte, da die Reduktion von  $F_v/F_m$  im Vergleich zu den Kontrollen signifikant vermindert war (Wieners et al. 2012).

Es ist aber anzumerken, dass zu diesem Zeitpunkt das verwendete Protokoll noch keine durchgehende Messung der Chlorophyllfluoreszenz während des gesamten Austrocknungsvorganges vorsah und auch

als Referenzpunkt zur Ermittlung von  $q_{des}$  lediglich ein Wert vor Beginn des Experimentes verwendet wurde. Dennoch erscheint es unwahrscheinlich, dass dadurch die Ergebnisse dahingehend beeinflusst wurden, dass ein realer Effekt der Trehalose auf  $q_{des}$  nicht beobachtet werden konnte. Es ist lediglich anzunehmen, dass die im Rahmen dieser Experimente gesammelten Daten nicht ohne Vorbehalte mit denen aus späteren Experimenten verglichen werden können.

Die später, nach dem verbesserten und in Wieners et al. (2018b) dargestellten Protokoll, durchgeführten Experimente zu der Wirkung von Arabitol auf  $q_{des}$  hingegen zeigten einen eindeutigen Einfluss dieses Zuckers auf die Stärke des austrocknungsinduzierten  $F_0$  Quenches von *T. asymmetrica*. Zwar erwies sich *T. asymmetrica*, ebenso wie eine große Zahl anderer isolierter Flechten-Photobionten, sehr wohl auch ohne die Gabe von Arabitol in der Lage,  $q_{des}$  zu zeigen, was im Gegensatz zu von anderen gemachten Beobachtungen steht (Kosugi et al. 2009). Dennoch kann angenommen werden, dass das vom Mycobionten gebildete Arabitol in Flechten eine verstärkende Wirkung auf den  $q_{des}$  der Photobionten hat (Kosugi et al. 2013).

Man kann darüber spekulieren, ob dieser Effekt ggf. durch die osmotische Wirkung zu begründen wäre: Während des Austrocknungsprozesses steigt die Konzentration von Arabitol in den Zellen unweigerlich an, so dass dem Wasserverlust ein ständig steigendes osmotisches Gefälle entgegen wirkt. Dies könnte die Austrocknung verzögern und auf diese Weise dem Prozess, der zur Ausbildung des  $q_{des}$  führt mehr Zeit verschaffen, ehe der Wassergehalt innerhalb der Zellen soweit fällt, dass dieser abbricht. Grund-



sätzlich sollte dies aber bei allen Zuckern mit vergleichbaren Eigenschaften bezüglich Molekülmasse und Wasserpotential der Fall sein, gesetzt den Fall, auch diese werden in größeren Mengen in die Algenzellen aufgenommen. Kosugi (2013) konnte zeigen, dass dies für Ribitol und Mannitol nicht der Fall ist. Hier wäre die einfachste Erklärung, dass diese Zucker eben nicht in größeren Mengen aufgenommen wurden, auch wenn natürlich zum gegenwärtigen Zeitpunkt eine wesentlich komplexere Wirkung des Arabitols auf die Bildung von  $q_{des}$  nicht ausgeschlossen werden kann.

#### 4.7 Die Wirkung von Jod- und Zink-Ionen auf $q_{des}$

Das wahrscheinlich erstaunlichste Ergebnis dieser Arbeit war jedoch die Beobachtung, dass Jod- und Zink-Ionen, vor allem in Kombination, die in geringen Konzentrationen dem Wachstumsmedium von *T. asymmetrica* zugesetzt wurden, nicht nur einen starken Einfluss auf die Stärke von  $q_{des}$  hatten, sondern sich auch auf die Wachstumsraten, die diese Alge unter den Kulturbedingungen zeigte, deutlich auswirken. Das legt nahe, dass sie auf eine weitreichende Weise die Physiologie dieser Alge beeinflussen.

#### Mögliche Wirkmechanismen von Jod

Halogene, vor allem Jod und Brom, spielen eine sehr wichtige Rolle in vielen marinen Algen (Küpper et al. 2014; Küpper 2015). Phaeophyten und Rhodophyten sind dafür bekannt, dass sie sehr hohe Gehalte im Millimol-Bereich dieser Elemente, elementar, als Ionen oder auch als Teil von

organischen Verbindungen, enthalten (Kylin 1930; Küpper 2015), aber auch in Chlorophyten können Jod und Jodverbindungen gefunden werden (Blunt et al. 2009; Cabrita et al. 2010). Ob und in welchem Ausmaß Jod auch bei Flechten eine Rolle spielt, ist viel weniger gut untersucht, aber von einigen Flechten ist bekannt, dass sie Jod aus der Umwelt akkumulieren (Daillant et al. 2009).

#### Wirkung als anorganisches Antioxidans

Es ist bekannt, dass Jod, dessen Ionen und jodhaltige organische Verbindungen bei Phaeophyceae für eine Vielzahl biologischer Prozesse von großer Bedeutung ist (Leblanc et al. 2006; Küpper 2015). So hat sich gezeigt, dass der oxidative Stoffwechsel von Laminariales von Jod abhängig ist (Küpper et al. 1998, 2008, 2013) und das bei *Laminaria digitata* Jod ein sehr wichtiges anorganisches Antioxidans darstellt (Küpper et al. 2008, 2013). Jod spielt eine wichtige Rolle bei der Akklimatisation von Tangen an osmotischen Stress und scheint bei diesen auch Einfluss auf das nicht photochemische Quenching zu haben (Nitschke and Stengel 2014). Doch selbst bei den auf die Wirkung von Jod hin im Vergleich zu Flechten und aeroterrestrischen Algen gut untersuchten Phaeophyceae, bleiben zur Zeit noch viele Fragen offen (Küpper et al. 1998; Küpper 2015). Allerdings sind Chlorophyta nur sehr weitläufig mit den Phaeophyceae verwandt, so dass jede Übertragung von wissenschaftlichen Ergebnissen zwischen diesen beiden höchst unterschiedlichen Gruppen mit der gebotenen Skepsis betrachtet werden muss. Für Grünalgen im Allgemeinen und für Flechten-Photobionten im Besonderen ist es derzeit vollkommen unklar, ob Jod bei die-

---

sen Organismen eine Rolle spielt und wenn ja, welche, einmal von der Beobachtung abgesehen, dass auch einige marine Grünalgen beträchtliche Mengen an Jod einlagern und dass auch bei Flechten gezeigt werden konnte, dass sie Jod akkumulieren (Dailliant et al. 2009). Und natürlich weisen auch die Ergebnissen dieser Arbeit in diese Richtung.

#### Antioxidative Wirkung über Haloperoxidasen

Eine weitere Möglichkeit, durch die Jod dazu beitragen könnte, die Widerstandskraft gegenüber Stress und die allgemeine Vitalität von *T. asymmetrica* zu erhöhen, liegt möglicherweise in der Wirkung von Haloperoxidasen. Diese Peroxidasen katalysieren die Oxidation eines Halogenids durch Wasserstoffperoxid, wodurch dieses entgiftet wird. Der Vergleich der Nernst-Gleichungen dieser Reaktion der verschiedenen Halogeniden zeigt, dass bei  $\text{Cl}^-$   $E_0$  bei 1.36 V, bei  $\text{Br}^-$   $E_0$  1,09 V und bei  $\text{I}^-$   $E_0$  0.536 V liegt, was bedeutet, dass die Oxidation von Jodid thermodynamisch wesentlich günstiger ist, als die der anderen Halogenide. Aufgrund von Abschirmungseffekten würde die Oxidation von Fluoriden  $E_0=2,87$  V Energie benötigen und ist daher durch Wasserstoffperoxid nicht möglich) (Courtin et al. 1982; Kirk 1991; Moore and Okuda 1999).

Haloperoxidasen sind eine ausgesprochen weit verbreitete Enzymfamilie (van Pée 1996; Regelsberger et al. 2003; Wagner et al. 2008; Winter and Moore 2009; Paul and Pohnert 2011). Auch nicht als Haloperoxidasen klassifizierte Peroxidasen können die Oxidation von Halogeniden katalysieren, was etwa bei horseradish peroxidase (HRP) aus dem Meerrettich (*Armoracia rusticana*) der Fall ist, die Iodid oxidieren kann. Hem-

und Vanadium-Peroxidasen sind generell bei Reaktionen mit Halogeniden nicht substratspezifisch (Van Peè 2001). Allein bei *Arabidopsis*, deren Genom zu den kleinsten unter den höheren Pflanzen zählt, wurden über 40 Gene für Peroxidasen und Haloperoxidasen gefunden (O'Brien 2000).

Unter Trockenstress (Leedham Elvidge et al. 2015), osmotischem Stress (Nitschke and Stengel 2014) oder exzessivem Licht (Keng et al. 2013) zeigen eine Vielzahl von daraufhin untersuchten Algen verstärkte Transkription oder/und verstärkte Aktivität von Halogenperoxidasen, denen eine wichtige Bedeutung zur Entgiftung von ROS in den Zellen zukommt, aber auch bei der Synthese von halogenierten Lipiden, deren biologische Bedeutung zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch unklar ist (Harwood and Guschina 2009). Halogenierte Fettsäuren wurden auch in Flechten nachgewiesen (Dembitsky 2017).

#### Mögliche Wirkmechanismen von Zink

Seit langem ist Zink als sehr wichtiges Spurenelement bei allen Lebewesen bekannt (Da Silva and Williams 2001). Dieses Element ist ein unentbehrlicher Bestandteil einer großen Vielzahl von Enzymen wie etwa der RNA-Polymerase oder der Carboanhydrase. Eine weitere bedeutende Rolle kommt den Zinkfingerproteinen zu, die als wichtige Transkriptionsfaktoren zur Regulierung des Genoms von eukaryotischen Zellen beitragen.

Bei höheren Pflanzen kann bei einem Mangel an Zink ein Rückgang der Photosynthese-Rate, eine Erniedrigung von  $F_v/F_m$  sowie ein Anstieg der Konzentration von Sauerstoffradikalen ( $\text{O}_2^-$ ) und eine stärkere

---

Peroxidation der Lipide beobachtet werden (Wang and Jin 2005). Die Blätter von Pflanzen, die unter einem Zinkdefizit leiden, sind in hohem Maße empfindlich gegen Photoinhibition (Cakmak 2000).

Es wird vermutet, dass verstärkter oxidativer Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) für die bei Zinkmangel auftretenden Symptome verantwortlich ist. Zink spielt eine bedeutende Rolle bei der Vermeidung und beim Abbau von ROS und schützt daher verschiedene wichtige Zellbestandteile wie die Lipide der Membranen und Membranproteine, Chlorophyll und den Photosyntheseapparat sowie Enzyme mit SH-Gruppen und die DNA vor schädlicher Oxidation (Cakmak 2000; Wang and Jin 2005).

#### Zink als essentieller Nährstoff für Algen

Zink ist ein essentieller Mikronährstoff für alle Lebewesen, der zahlreiche wichtige Aufgaben an mannigfaltigen Stellen des Stoffwechsels erfüllt (s.o.). Dabei bilden Algen, ganz gleich welchen Platz sie in der Systematik der Lebewesen einnehmen, keine Ausnahme.

Sowohl Zinkmangel als auch ein Überschuss dieses Elements verursachen zahlreiche physiologische Reaktionen bei den daraufhin untersuchten Mikroalgen. Beispielsweise war *Chlamydomonas reinhardtii* bei Zinkmangel nicht mehr in der Lage, an Luft photoautotroph zu wachsen, da diese Alge aus der Luft kein CO<sub>2</sub> mehr aufnehmen konnte. Außerdem hatte der Mangel an Zink zur Folge, dass große Mengen an Kupfer in den Zellen akkumuliert wurden, die Algen aber dennoch phänotypisch alle Anzeichen eines Kupfermangels zeigten (Malasarn et al. 2013). Ein Überschuss an Zink hingegen

hemmt bei *Scenedesmus obliquus* und *Scenedesmus quadricauda* das Wachstum (Omar 2002) und schädigt bei *Antithamnion plumula* und *Ectocarpus siliculosus* unter anderem auch den Photosyntheseapparat (Küpper et al. 2002). Die Wirkung von Zink auf den Metabolismus aquatischer Algen wurde gut dokumentiert (Saha et al. 2013; Volland et al. 2014), allerdings gibt es nur relativ wenige Arbeiten, die sich mit der potentiellen Wirkung von Zink und anderen Metallen als Toxin oder als Mikronährstoff bei aeroterrestrischen Algen bzw. Flechten beschäftigen. Bemerkenswert ist vor allem, dass sich die verschiedenen untersuchten Algen zum Teil sehr erheblich in ihrer Sensitivität auf hohe bzw. niedrige Zinkkonzentrationen unterscheiden (Hauck and Huneck 2007; Hauck et al. 2008; Hauck 2008).

Da Zink ein essentieller Mikronährstoff ist, enthalten alle normalerweise zur Kultur von Algen genutzten Nährmedien dieses Element (Starr and Zeikus 1993; Chadd et al. 1996; Saha et al. 2013). Das Ziel bei der Entwicklung eines Kulturmediums für Algen ist aber nicht unbedingt, ein optimales Wachstum für eine bestimmte Alge zu ermöglichen. Das Ziel liegt im Regelfall darin, mit einer möglichst kleinen Anzahl von verschiedenen Kulturmedien eine möglichst große Anzahl verschiedener Algen in Kultur halten zu können und das wünschenswerterweise auch noch mit möglichst geringen Kosten (Andersen 2005). Dies muss berücksichtigt werden, wenn man die Zusammensetzung der meisten üblichen Algen-Kulturmedien betrachtet, die nicht darauf hin untersucht wurden, ob sie die für eine bestimmte Alge optimale Konzentration des wichtigen Mikronährstoffes Zn<sup>2+</sup> aufweisen. So gesehen ist es nicht besonders verwunderlich, dass

---

eine Veränderung der Konzentration von Zink im Kulturmedium erheblichen Einfluss auf vielfältige physiologische Eigenschaften der kultivierten Alge hat. Erstaunlich ist bei den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit gemachten Experimente aber, dass eine kumulative Wirkung von Jod und Zink in Kombination beobachtet werden konnte, da so eine kumulative Wirkung bisher noch von keiner anderen Alge bekannt war.

Eine mögliche Erklärung für die kumulative Wirkung von Jod und Zink

Das bemerkenswerteste Ergebnis der verschiedenen zu diesem Thema gemachten Experimente ist sicherlich, dass sich zeigte, dass Jod- und Zinkionen eine stark kumulative Wirkung auf *T. asymmetrica* haben, sowohl was das Wachstum als auch was die Fähigkeit zu  $q_{des}$  betrifft. Es gibt durchaus eine Reihe von Erklärungsansätzen für die jeweilige Wirkung dieser Elemente, von der bekannten Rolle von Zink als wichtiger Mikronährstoff bis hin zu der stark antioxidativen Wirkung von Jod als anorganisches Antioxidationsmittel (Venturi et al. 2000). Die Beobachtungen zur Fluoreszenzlöschung aus dem Bereich der organischen Chemie jedoch stellt eine direkte mechanistische Verbindung zwischen Jod und Zink dar:

Bei Experimenten (Lebold et al. 2004) mit Zinkmesotetrakis(4-sulfonatphenyl)porphyrin, das erstaunliche strukturelle Ähnlichkeiten mit Chlorophyll aufweist, zeigte sich, dass die Gegenwart von Jod zu einer starken Fluoreszenzlöschung führt. Bei diesen Experimenten war Zinkmesotetrakis(4-sulfonatphenyl)porphyrin in den Membranen von Lipidmicellen eingelagert, um auf diese Weise den Aufbau von Thylakoidmembranen

nachzuahmen. Wurde nun eine Jodid-Lösung zugegeben, kam es zu einem starken Rückgang der beobachteten Fluoreszenz. Von allen untersuchten Halogenen war dabei die Wirkung von Jod-Ionen am stärksten (Lebold et al. 2004). Substanzen wie Zinkmesotetrakis(4-sulfonatphenyl)porphyrin, eingelagert in Membranen, sind Gegenstand der Forschung zur Entwicklung künstlicher Photosynthese-Systeme, die erhebliche Analogien zur biologischen Photosynthese aufweisen (Robert 2016) und wie diese den Aufbau von pH-Gradienten zur Synthese von Produkten höherer Enthalpie aus solchen niedrigerer Enthalpie nutzen (sollen). Wegen der doch deutlichen Unterschiede zwischen den Vorgängen in den von Lebold (et al 2004) in vitro gemachten Experimenten zu den bei weitem komplexeren Vorgängen an den Thylakoidmembranen eines Chloroplasten ist aber bei aller Ähnlichkeit der Vorgänge Vorsicht geboten, diese Ergebnisse auf ein lebendes System zu übertragen. Außerdem würde ein solcher Vorgang nur eine der gemachten Beobachtungen, nämlich  $q_{des}$ , erklären, nicht aber die Steigerung der maximalen Wachstumsraten.

Möglicherweise setzen die Wirkungen beider Elemente sogar an einer ganz anderen Stelle an, was bei den mannigfaltigen Funktionen von Zink in einer Zelle und der generellen Wirksamkeit von Jod aufgrund seines Redoxpotentials durchaus plausibel wäre, und sowohl das gesteigerte Wachstum als auch die Verstärkung von  $q_{des}$  könnten beide sekundäre Folgen dieser Wirkung(en) sein.

Im Allgemeinen geht man davon aus, dass ein Organismus einem Trade off zwischen den Investitionen, die nötig sind um Resistenzen gegen Stressfaktoren aufzubauen, und Wachstum unterliegt (Herms

---

and Mattson 1992) und daher eine verstärkte Widerstandskraft gegen Stress mit vermindertem Wachstum erkaufte wird und vice versa. Diesem Prinzip scheint *T. asymmetrica* zu widersprechen, denn gerade die Kulturen, die verursacht durch die Behandlung mit Jod und Zink ein besonders schnelles Wachstum zeigen, zeigten gleichzeitig auch einen besonders stark ausgeprägten  $q_{des}$ , der als Schutzmechanismus gegen Photoinhibition dient.

Andererseits könnte aber auch eine hohe Vitalität eines Organismus unter bestimmten Umständen die Aktivität von Stoffwechselwegen fördern, die zwar in der konkreten momentanen Situation nicht unbedingt direkt dem Wachstum dienen, sehr wohl aber langfristig das Überleben dieses Organismus wahrscheinlicher machen. So tendieren Pflanzen unter günstigen Umständen dazu, mehr Speichersubstanzen aufzubauen als unter ungünstigen, auch wenn diese unter den gerade herrschenden Bedingungen von keinem direkten Nutzen für das Wachstum sind. Ebenso wie es für eine höhere Pflanze von Nachteil wäre, erst dann Speicherstoffe einzulagern, wenn die Umweltbedingungen sich bereits verschlechtert haben, könnte es für *T. asymmetrica* ebenfalls ungünstig sein, erst dann die für  $q_{des}$  notwendigen Anpassungen auszubilden, wenn die Austrocknung bereits eingesetzt hat.

Unzweifelhaft werden noch umfangreiche Forschungsarbeiten auch mit anderen methodischen Ansätzen erforderlich sein, um an dieser Stelle zu befriedigenden Antworten kommen zu können.

#### 4.8 Vergleich der Ergebnisse zu den vorgeschlagenen Modellen für $q_{des}$

Für  $q_{des}$  wurden eine ganze Reihe von möglichen Mechanismen vorgeschlagen:

Bereits in der Einleitung wurde auf den Xanthophyll-Zyklus eingegangen, dem eine zentrale Rolle bei der Entstehung von NPQ bei höheren Pflanzen (Johnson et al. 1993; Demmig-Adams 1998), Moosen (Lovelock et al. 1995), Farnen (Czeczuga 1985), Cyanobakterien (Campbell et al. 1998; El Bissati et al. 2000) und eukaryotischen Algen (Niyogi et al. 1997) (hier auch in abgewandelter Form bei Diatomeen (Arsalane et al. 1994; Casper-Lindley and Björkman 1998)) zukommt. Der Xanthophyllzyklus spielt wiederum eine wichtige Rolle bei der strahlungslosen Dissipation potentiell schädlicher Lichtenergie (Bilger and Björkman 1990; Demmig-Adams et al. 1990c; Demmig-Adams and Adams III 1992; Pinnola et al. 2013; Kress and Jahns 2017). Wegen der Ähnlichkeit des Phänomens des omnipräsenten xanthophyllzyklus-abhängigen NPQ und dem des  $q_{des}$  wurde/wird davon ausgegangen, dass der Xanthophyll-Zyklus auch hier von großer Bedeutung sei (Deltoro et al. 1998a; Verhoeven et al. 2017a; Fernández Marín et al. 2018), was in einem separaten Abschnitt (s.u.) ausführlicher diskutiert werden soll.

Alternativ oder ergänzend zum Xanthophyll-Zyklus wurden aber auch eine ganze Reihe weiterer möglicher Mechanismen vorgeschlagen. Ohne Anspruch auf Vollständigkeit seien an dieser Stelle einige aufgeführt:

Protein-Pigment-Komplex  
als Energiesenke

Heber machte darauf aufmerksam,

dass bei Flechten die Entstehung von  $q_{des}$  während der Austrocknung unabhängig von Licht oder einer Protonierungsreaktion sei und sich daher deutlich vom xanthophyllzyklus-abhängigen NPQ unterscheidet (Heber 2008; Heber et al. 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Glutaraldehyd  $q_{des}$  inhibieren kann (Heber et al. 2007b; Heber 2008). Da die Wirkung von Glutaraldehyd in dessen Reaktion mit Proteinen liegt (Coughlan and Schreiber 1984), sei daraus zu folgern, dass Proteine bei der Entstehung von  $q_{des}$  eine entscheidende Rolle spielen (Heber et al. 2010). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass während die Fluoreszenzemission bei einer Wellenlänge von 685 nm während der Austrocknung von Flechten stark zurück geht (was  $q_{des}$  ist), es gleichzeitig zu einer starken Emission von infrarotem Licht kommt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass der Emitter dieses infraroten Lichts eine extrem kurze Lebensdauer des angeregten Zustandes aufweist, was die Vermutung nahe legt, ein Infrarotemitter, mutmaßlich ein Protein-Pigment-Komplex, spiele bei der Entstehung von  $q_{des}$  eine entscheidende Rolle (Veerman et al. 2007; Komura et al. 2010): Der Emitter wirke wie eine extrem starke Energiesenke und verkürze daher die Zeit, in der die Chlorophyllmoleküle in einem angeregten Energiezustand verbleiben, was den eigentlichen Schutz vor Photoinhibition bewirkte (Heber et al. 2007b, 2010; Heber 2008).

Das von Heber (2007, 2008, 2010) vorgeschlagene Modell eines Protein-Pigment-Komplexes als Energiesenke für überschüssige Anregungsenergie und Ursache für die Entstehung von  $q_{des}$  böte eine gute Erklärung für die Beobachtung, warum sich  $q_{des}$  auch bei einer ohne Licht erfolgenden Aus-

trocknung von *T. asymmetrica* und anderen Photobionten beobachten lässt, da es von der Bildung und der Konzentration von Zeaxanthin unabhängig wäre. Dies würde auch erklären, warum Nigericin nicht in der Lage war, die Bildung von  $q_{des}$  (vollständig) zu inhibieren. Etwas schwieriger ist es, zu erklären, warum DTT, welches Proteine an einer Konformationsänderung hindern sollte, ebenfalls nicht in der Lage war,  $q_{des}$  grundsätzlich zu unterbinden. Entweder war die Behandlung mit DTT nicht in der Lage, genug der an diesem postulierten Mechanismus beteiligten Proteine zu fixieren, oder aber für die Entstehung des Protein-Pigment-Komplexes ist keine gravierende Konformationsänderung des Proteins erforderlich, so dass aus diesem Grund DTT größtenteils wirkungslos auf die Entstehung von  $q_{des}$  blieb. Dies wäre durchaus denkbar, da auch die Membranen einer Zelle bei Austrocknung schwerwiegenden Veränderungen unterworfen sind und mit sinkendem Wassergehalt der Zelle ihre Eigenschaften verändern und sich dadurch auch die Bedingungen für die in oder an die Membranen angelagerten Proteine verändern (Gasulla et al. 2016).

#### Konformationsänderungen des LHCII

Ein weiterer Ansatz, der sich aber mehr auf die Entstehung von NPQ im Allgemeinen, denn auf den Spezialfall des  $q_{des}$  bezieht, aber natürlich auch dort eine bedeutende Rolle spielen könnte, geht von einer Konformationsänderung des LHCII Proteins aus. Diese erlaubt, dass sich Aggregate aus Chlorophyllmolekülen im Light Harvesting Complex bilden. In dieser aggregierten Form ist die Zeit, in der die Chlorophyllmoleküle angeregt bleiben, drastisch verkürzt (Mulline-

---

aux et al. 1993; Moya et al. 2001). Das wiederum führt zu einer deutlichen Steigerung der strahlungslosen Dissipation und damit, den Gesetzen der Thermodynamik folgend, auch zu einer deutlichen Verringerung der Grundfluoreszenz. Bemerkenswerterweise haben die dies betreffenden Untersuchungen gezeigt, dass bei dieser Aggregation Zeaxanthin nicht direkt beteiligt ist und daher dieser Vorgang nicht ohne weiteres mit dem Modell des Zeaxanthin-abhängigen NPQ in Einklang gebracht werden kann (Horton et al. 1996; Pascal et al. 2005).

Dieses Modell ist mit den gemachten Beobachtungen nur schwierig in Einklang zu bringen. Auch bei diesem Modell wäre Zeaxanthin nicht direkt an der Entstehung des  $q_{des}$  beteiligt, was den beobachteten  $q_{des}$  bei Austrocknung in Dunkelheit und die Ergebnisse der Behandlung mit Nigericin erklären könnte. Allerdings sieht dieses Modell definitionsgemäß eine Konformationsänderung der LHCII Proteine als Auslöser der Aggregation der Chlorophyll-Moleküle. Da DTT eben genau eine solche Änderung unterbinden sollte, steht damit die Beobachtung, dass eben  $q_{des}$  auch noch nach der Behandlung mit DTT messbar ist, im Gegensatz zu diesem vorgeschlagenen Mechanismus.

Ein direkter Energietransfer von Chlorophyll auf Xanthophylle und vice versa

Ein weiterer Ansatz die Entstehung des NPQ zu erklären, liegt in der Annahme, dass nicht nur Anregungsenergie von den Carotinoiden des Light-Harvesting-Complexes auf Chlorophyll übertragen werde, sondern auch ein Energietransfer in die Gegenrichtung von angeregten Chlorophyll-Molekülen auf Carotinoide stattfindet. Das soll zu einer

Umwandlung der Anregungsenergie in Wärme und soweit zu NPQ führen (Ruban et al. 2007; Liao et al. 2010). Dies setzt voraus, dass es zu einer starken Wechselwirkung der Energiezustände der beteiligten Chlorophyll-Moleküle und Carotinoide kommt, was zu einer deutlichen Verkürzung der Lebenszeit der angeregten Energiezustände in diesem System führt (Gradinaru et al. 2001). Die Rolle, die in diesem Modell Zeaxanthin zukäme, ist unklar, aber die Autoren gehen davon aus, dass es eine funktionale Verbindung gibt (Liao et al. 2010). Wie schon beim zuvor erläuterten Modell der Konformationsänderung des LHCII-Komplexes zur Erklärung der Entstehung von NPQ beschreibt auch dieses Modell keine spezielle an Austrocknung gebundene Form des NPQ, sondern beschäftigt sich in erster Linie mit der Entstehung von nicht-photochemischem Quenching in stoffwechselaktiven Zellen.

Diese Modelle sind insofern mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbar, als dass sie keine Aussagen über eine durch DTT hemmbare, notwendige Enzymaktivität machen, noch direkte Aussagen über die Rolle, die Zeaxanthin bei der Entstehung von NPQ zukommen soll, treffen. Liao und andere haben jedoch die Vermutung geäußert, dass Zeaxanthin in irgendeiner Weise an diesem Prozess beteiligt sein könne (Liao et al. 2010). Da im Rahmen dieses Modells die Rolle von Zeaxanthin unklar bleibt, können auf Basis der Ergebnisse dieser Arbeit keine eindeutigen Aussagen dazu getroffen werden, inwieweit dieses Modell auf den  $q_{des}$  angewandt werden kann oder nicht. Doch wäre bei diesem Modell die Konzentration von Zeaxanthin für den Mechanismus relevant, so bestünde ein klarer Widerspruch.

---

Schneller, reversibler Ladungsaustausch zwischen Chlorophyll und Xanthophyll-Molekülen oder zwischen Chlorophyll-Molekülen als Erklärung für NPQ.

Dem zuvor beschriebenen Modell zur Entstehung von NPQ durch direkten Energietransfer zwischen Chlorophyll und Carotinoiden sehr ähnlich ist auch dieser Ansatz (Holt et al. 2005; Avenson et al. 2008; Müller et al. 2010). Auch in diesem Modell ist der eigentliche Mechanismus des NPQ im LHCII-Komplex verortet. Doch hier wird davon ausgegangen, dass es zu einer Rekombinationsreaktion zwischen Singulett-Zuständen und damit zu einer gegenseitigen Auslöschung kommt. Hervorzuheben ist, dass das von Müller et al. (2010) vorgeschlagene Modell von einer Interaktion zwischen Chlorophyll-Molekülen ausgeht und dabei keine anderen Carotinoide direkt beteiligt seien, insbesondere auch nicht Zeaxanthin.

Bei diesem Modell wird nicht von einer direkten Beteiligung von Zeaxanthin an der Entstehung von  $q_{des}$  ausgegangen, so dass es gut mit den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten in Einklang zu bringen ist, da weder DTT noch Nigericin noch eine Austrocknung bei Dunkelheit die Entstehung von  $q_{des}$  bei *T. asymmetrica* unterbinden konnten und somit eine (ausschließliche) Abhängigkeit des  $q_{des}$  von Zeaxanthin ausgeschlossen werden kann. Aber es ergeben sich aus diesem Modell auch keine weiteren Vorhersagen, die durch die Ergebnisse bestätigt oder verworfen werden könnten. Weiterhin zeigten DTT und Nigericin zumindest eine teilweise Wirkung, die, wenn ein diesem Modell entsprechender, alleiniger wirksamer Mechanismus die einzige Ursache für  $q_{des}$  wäre, nicht zu erklären ist.

Grundsätzlich ist im Hinblick auf alle Modelle, die davon ausgehen, dass der Mechanismus, der für die Entstehung von  $q_{des}$  verantwortlich ist, vom Prinzip her derselbe sei, wie der oder die Prozesse, die zur Entstehung von NPQ führen, anzumerken, dass diese nur schwer erklären können, warum sich der  $q_{des}$  bei einer Vielzahl von daraufhin untersuchten Algen eher wie eine Alles-oder-Nichts-Reaktion verhält. Die untersuchten Algen waren entweder zu einem ausgeprägten  $q_{des}$  fähig und austrocknungstolerant oder aber sie zeigten keinen  $q_{des}$  und waren austrocknungssensitiv. Da aber die Fähigkeit zu NPQ unter Algen und anderen oxidative Photosynthese betreibenden Organismen universell verbreitet ist, wären zumindest einige „Zwischenstufen“ zu erwarten gewesen, da ja alle untersuchten Algen, da zu NPQ in der Lage, auch zumindest grundsätzlich über die notwendigen Mechanismen verfügten  $q_{des}$  zu bilden. Da dies aber nicht der Fall ist, ist das ein starkes Indiz dafür, davon auszugehen, dass ein grundsätzlich anderer Mechanismus als der des NPQ  $q_{des}$  zugrunde liegt, den eine Alge eben besitzen kann, oder eben auch nicht.

Energietransfer von PSII auf PSI als austrocknungsinduzierter Quench-Mechanismus

Im Gegensatz zu höheren Pflanzen sind bei Grünalgen PSII und PSI nicht streng räumlich voneinander getrennt (Anderson and Andersson 1982), sondern sind in den gleichen Membranarealen anzutreffen (Krämer et al. 1988). Dies erlaube es, dass sich bei Austrocknung PSII und PSI durch laterale Bewegung in der Thylakoid-Membran aneinander lagern können, was die direkte



Übertragung der Anregungsenergie von PSII auf das PSI ermöglichen. Unter diesen Umständen läge das PSI in oxidiertem Zustand vor, etwa als Konsequenz von Lichteinwirkung (Heber et al. 2006; Heber 2012; Yamakawa et al. 2012) und der Energietransfer von PSII auf PSI diene unter anderem auch dazu, PSI auch bei schwachem Licht ständig in diesem oxidierten Zustand zu halten. P700+ ist als extrem starker Quencher im PSI bekannt und könnte auf diese Weise auch gleichzeitig PSII effektiv quenchen. So wären beide Photosysteme effektiv vor Photoinhibition geschützt (Slavov et al. 2013).

Da bei Grünalgen im Gegensatz zu höheren Pflanzen PSII und PSI nicht räumlich getrennt in den Thylakoiden vorkommen, wäre ein entsprechender Mechanismus, bei dem letztlich P700+ aus dem PSI als Quencher fungieren würde, durchaus plausibel. Da dieser Mechanismus weder direkt von der Konzentration von Zeaxanthin oder des pH-Wertes im Inneren des Thylakoidlumens abhängig wäre, passen die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit gemachten Experimente recht gut zu dieser Hypothese. Auch die nicht vollständige Inhibition von  $q_{des}$  durch DTT und Nigericin würden erklärt, da an der Bildung eines solchen Aggregates aus PSII und PSI ggf. das Zytoskelett und die damit verbundenen Motorproteine, nicht aber Enzyme wie VDE, beteiligt wären. Die Beobachtungen zeigen weiterhin, dass die Entstehung von  $q_{des}$  ein aktiver Prozess ist, der durch sehr schnelle Austrocknung unterbrochen werden kann. Auch dies würde sich mit einem solchen Modell der aktiven Umordnung der Photosysteme in der Thylakoidmembran gut vereinbaren lassen

Phosphorylierung von PSII und LHC bei Trockenstress als mögliche Ursache von  $q_{des}$

Immunoblot-Untersuchungen haben gezeigt, dass sich bei der austrocknungstoleranten (!) nicht näher bestimmten (!) grünen Makroalge *Ulva* sp. während des Wasserverlustes zwar die Zusammensetzung der Thylakoid-Proteine nicht verändert, es sehr wohl aber zu einer ausgeprägten Phosphorylierung der an PSII und am LHC beteiligten Proteine kommt. Inwieweit damit ein Mechanismus verbunden ist, der direkt zur Bildung einer austrocknungsinduzierten Chlorophyllfluoreszenz-Löschung führt ist unklar, jedoch ist es durchaus denkbar, dass die Phosphorylierung dieser Proteine gut mit einigen der oben umrissenen Modelle in Einklang zu bringen sein könnte, bei denen Konformationsänderungen von Proteinen eine wichtige Rolle spielen (Gao et al. 2015).

Dass die Phosphorylierung von PSII und LHC eine Rolle bei der Entstehung von  $q_{des}$  spielen könnte, ist zwar an sich interessant, weist aber nicht direkt darauf hin, wie dies zu einem Vorgang wie  $q_{des}$  führen könnte. Darüber hinaus ist unklar, ob es zu einem vergleichbaren Phänomen auch bei anderen austrocknungstoleranten Grünalgen kommt und inwieweit es sich dabei um eine Schutzreaktion vor Trockenstress oder aber um eine Konsequenz von Trockenstress handelt: Möglicherweise ist die beobachtete Phosphorylierung eher das Resultat des durch die Austrocknung selbst verursachten Zerfalls des ATP. Normalerweise enthalten lebende Zellen etwa fünfmal so viel ATP als aufgrund des stöchiometrischen Gleichgewichts mit ADP zu erwarten wäre (Nicholls and Ferguson 2002). Gleichzeitig wird ATP bei höheren Konzentrationen in

wässriger Lösung oder aber bei pH-Werten größer 7.4 oder kleiner 6.8 zunehmend instabil. Dies macht die Übertragung von Phosphatgruppen auf andere Moleküle immer wahrscheinlicher (Chance et al. 1972; Berg et al. 2018). Nichtsdestotrotz böte der von Gao (2015) vorgeschlagene Mechanismus eine Erklärung für die Entstehung eines von Zeaxanthin unabhängigen  $q_{des}$  auch bei Austrocknung ohne Licht, wie dieser unter anderem bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zu beobachten war.

Leider bietet keiner der in der Literatur vorgeschlagenen möglichen Mechanismen für die Entstehung von  $q_{des}$  oder NPQ eine augenfällige Erklärung, warum Jod und/oder Zink einen direkten Einfluss auf  $q_{des}$  haben sollten. Eine direkte Verbindung zwischen Jod und Zink und einem dem Chlorophyll sehr ähnlichen Molekül und Fluoreszenzlöschung stellen lediglich die Arbeiten von Lebold et al. (2004) und Robert et al. (2016) her, dieses aber nur in vitro.

#### 4.9 Diskussion der Ergebnisse in Hinblick auf eine mögliche Rolle des Xanthophyllzyklus bei der Entstehung von $q_{des}$

##### Wirkung von Wachstumslicht

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kulturexperimente mit *T. asymmetrica* bei verschieden starker Beleuchtung zeigten, dass es eine positive Korrelation zwischen der Beleuchtungsstärke und der Stärke des beobachteten  $q_{des}$  gibt (Kapitel 3.4). Gleichzeitig zeigten die HPLC-Untersuchungen eine ebensolche Korrelation zwischen der Beleuchtungsstärke und dem Gehalt an Zeaxanthin relativ zum Gehalt an

Chlorophyll *a* und *b*. Dies gilt auch für das Verhältnis der Größe des VAZ-Pools relativ zum Chlorophyllgehalt.

Diese Ergebnisse legen einen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Zeaxanthin und der Stärke des  $q_{des}$  nahe, was ein Indiz für die Richtigkeit der Modelle ist, die einen Zeaxanthin abhängigen Mechanismus für die Entstehung des  $q_{des}$  postulieren. Die verschiedenen Modelle zur Entstehung des  $q_{des}$  schließen allerdings nicht aus, dass mehr als ein Mechanismus für die Entstehung der austrocknungsinduzierten Chlorophyllfluoreszenzlöschung und der damit verbundenen strahlungslosen Dissipation der absorbierten Lichtenergie verantwortlich ist.

Weiterhin kann die Korrelation der von der Beleuchtungsstärke abhängigen Stärke von  $q_{des}$  und des Gehalts von Zeaxanthin auf eine kausale Verknüpfung hinweisen, aber ebenso ist es möglich, dass sowohl die Stärke des  $q_{des}$  als auch der Gehalt an Zeaxanthin unabhängig voneinander von der Beleuchtungsstärke während der Kultur von *T. asymmetrica* beeinflusst wurden.

##### Austrocknungsgeschwindigkeit

Die bedeutende Rolle, die die Geschwindigkeit, mit der die Austrocknung der Algen erfolgt, bei der Stärke des beobachteten  $q_{des}$  hat, deutet darauf hin, dass die Entstehung des  $q_{des}$  ein dynamischer und nicht primär nur von der Konzentration eines schon vor dem Beginn der Austrocknung in den Thylakoiden vorhandenen Stoffes abhängiger Prozess ist. Wäre dies der Fall, so sollte die Austrocknungsgeschwindigkeit nur einen relativ geringen Einfluss auf die Stärke von  $q_{des}$  haben, insbesondere dann, wenn ein dem NPQ der höheren Pflanzen analo-

---

ger Prozess zugrunde läge. Die Entstehung von NPQ ist ein recht schneller Prozess, der in der Größenordnung von einigen Minuten erfolgt (Bilger and Björkman 1991). Die Austrocknung der Proben im Rahmen der Experimente hingegen dauerte Stunden. In dieser Größenordnung sollte die Austrocknungsgeschwindigkeit keine Auswirkung auf die Stärke von  $q_{des}$  gezeigt haben, was aber durchaus der Fall war. Insbesondere das Einfrieren von  $F_0$  bei rascher Austrocknung, die immer noch in einem ungleich längeren Zeitrahmen erfolgte als für die Bildung von NPQ bei höheren Pflanzen nötig ist, spricht klar gegen eine einfache Abhängigkeit von der Konzentration eines Stoffes, wie zum Beispiel Zeaxanthin.

Da das pH und lichtabhängige Modell zur Entstehung des NPQ durch die Umwandlung von Violaxanthin über Antheraxanthin zum letztendlich wirksamen Zeaxanthin aber vorhersagen würde, dass die Stärke von  $q_{des}$ , gesetzt den Fall dessen Bildung würde dem gleichen Mechanismus folgen, lediglich von der Menge des vorhandenen Zeaxanthins in den Thylakoiden nach Austrocknung abhänge, sprechen die Ergebnisse eher nicht für eine bedeutende Rolle des Xanthophyll-Zyklus bei der Entstehung des  $q_{des}$ .

#### Jod & Zink und Arabitol

Die Ergebnisse zahlreicher, unabhängiger und sich auch im Design zum Teil deutlich unterscheidender Experimente zeigen, dass Jod- und Zink-Ionen, insbesondere in Kombination, einen deutlichen Einfluss auf die Stärke des beobachteten  $q_{des}$  bei *T. asymmetrica* haben. HPLC Untersuchungen zeigten jedoch, dass weder die Präsenz von

Jod noch die von zusätzlichem Zink, noch die Kombination beider Stoffe mit einer Veränderung der Konzentration an Zeaxanthin oder anderer zum Violaxanthin-Zyklus gehörigen Xanthophylle korreliert ist (Kapitel 3.4). Jod und/oder Zink haben also keinen Einfluss auf die Zeaxanthin-Konzentration. Auch die Behandlung der Algen mit Arabitol, einem Zucker, der bereits bei Experimenten anderer Arbeitsgruppen (Kosugi et al. 2013) eine erhebliche Wirkung auf die Stärke oder, unter den dort gewählten experimentellen Bedingungen, sogar auf das generelle Erscheinen von  $q_{des}$  hatte, zeigte zwar eine deutliche Verstärkung von  $q_{des}$ , aber keinen Einfluss auf die Konzentration der am Violaxanthin-Zyklus beteiligten Xanthophylle (Kapitel 3.4).

Das bedeutet, dass mit der Gabe von Jod und Zink oder Arabitol die Stärke des  $q_{des}$  unabhängig von der Konzentration an Zeaxanthin manipuliert werden kann. Diese Befunde sprechen dagegen, dass die Konzentration von Zeaxanthin von ausschlaggebender Bedeutung für die Stärke von  $q_{des}$  ist. Der Mechanismus, über den Jod, Zink oder Arabitol diesen Effekt hervorrufen, ist zum gegenwärtigen Stand des Wissens unbekannt. Auch der generelle Mechanismus über den es zu  $q_{des}$  kommt, steht zur Diskussion. So ist es leider nicht ohne weiteres möglich, Aussagen darüber zu treffen, inwieweit diese Stoffe die Wirksamkeit des Zeaxanthins erhöhen und auf diese Weise zu einer Verstärkung von  $q_{des}$  führen könnten. Allerdings erscheint dies im Moment zumindest nicht die einfachste Erklärung zu sein. Viel wahrscheinlicher wäre, ein wie auch immer gearteter von Zeaxanthin unabhängiger Mechanismus, der von diesen Stoffen manipuliert wird. An dieser Stelle sei noch einmal

---

auf die überraschende Wirkung von Jod und Zink auf das Wachstum von *T. asymmetrica* hingewiesen.

#### Experimente mit DTT, Nigericin und die Austrocknung bei Dunkelheit

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit gemachten Experimente zeigen, dass die Behandlung mit DTT zu einer Reduktion der Stärke des  $q_{des}$  in Vergleich zu den Kontrollen führte, unabhängig davon, ob die Austrocknung bei Licht oder in Dunkelheit stattfand (Kapitel 3.4). Zahlreiche vorhergegangene Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen konnten belegen, dass DTT das Enzym VDE an einer Formationsänderung hindert und auf diese Weise inhibiert (Yamamoto and Kamite 1972; Bilger et al. 1989; Bilger and Björkman 1990; Demmig-Adams et al. 1990c; Wuthirak et al. 2016). Aber natürlich ist VDE nicht das einzige Protein, was von der Wirkung von DTT betroffen ist, so dass von umfangreichen Auswirkungen dieser Behandlung auf den gesamten Proteinapparat der Zelle ausgegangen werden muss.

Die Proben von *T. asymmetrica*, die unter Starklichtbedingungen kultiviert wurden, zeigten eine stärkere Verminderung des  $q_{des}$  durch DTT als solche, die unter Schwachlicht kultiviert wurden. Algen, die unter stärkerer Lichtintensität gewachsen sind weisen einen höheren Gehalt an den am Violaxanthin-Zyklus beteiligten Xanthophyllen auf, als solche die unter schwächerem Licht kultiviert wurden. Also besteht eine Korrelation zwischen dem Gehalt an Xanthophyllen und der Wirksamkeit von DTT auf den  $q_{des}$ . So erscheint eine Rolle von Zeaxanthin auf die Entstehung von  $q_{des}$  (zumindest einen Teil des be-

obachteten  $q_{des}$ ) plausibel – vorausgesetzt eine Synthese von Zeaxanthin ist auch ohne Licht möglich. Diese Möglichkeit ist derzeit Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion (Fernández-Marín et al. 2010b, 2011a; Fernández Marín et al. 2018). Sollte dies auch im Rahmen dieser Experimente aufgetreten sein, so wäre damit die Verminderung der Stärke von  $q_{des}$  durch DTT nicht nur bei Schwachlicht sondern auch bei Dunkelheit, wie sie beobachtet wurde, erklärlich. Hervorzuheben ist, dass die Behandlung mit DTT das Entstehen des  $q_{des}$  bei den Proben nicht vollständig unterbinden konnte. Dies deutet darauf hin, dass  $q_{des}$  möglicherweise ein aus verschiedenen Teilaspekten, denen unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen, zusammengesetztes Phänomen ist.

Die Behandlung mit Nigericin führte ebenfalls zu einer Verringerung des beobachteten  $q_{des}$ , aber nur dann, wenn die Austrocknung unter schwachem Licht stattfand. Auch in diesem Fall war der beobachtete Effekt bei Algen, die unter starkem Licht kultiviert worden waren stärker als bei solchen, die unter schwachem Licht wuchsen. Aufgrund seiner Wirkungsweise als Protonophor sollte die Behandlung mit Nigericin die Membranen der Thylakoiden für Protonen durchlässig machen und auf diese Weise die Bildung eines pH-Gradienten zwischen dem Lumen der Thylakoiden und dem umgebenden Lumen der Chloroplasten verhindern oder zumindest stark reduzieren. Da der pH-Wert im Inneren der Thylakoiden von entscheidender Bedeutung für die von Zeaxanthin abhängige Regulation des Gleichgewichts zwischen absorbierter Lichtenergie einerseits und dem Elektronentransport andererseits ist und die Synthese von Zeaxanthin nur bei einem durch Lichtein-

---

strahlung verursachten niedrigen pH-Wert im Inneren des Thylakoidlumens erfolgt, ist die Verminderung von  $q_{des}$  durch die Behandlung mit Nigericin damit gut erklärlich (Demmig-Adams and Adams 1996; Demmig-Adams et al. 2014). Aber wie schon bei der Behandlung mit DTT wird auch durch die Behandlung mit Nigericin die Bildung von  $q_{des}$  nicht vollständig unterbunden. Einen nur auf die Dosiswirkung von Zeaxanthin folgendem mechanistischen Ansatz zur Erklärung von  $q_{des}$  folgend, würde das bedeuten, dass die Synthese von Zeaxanthin nicht nur auch ohne Licht sondern auch unabhängig vom pH-Wert erfolgen kann. Oder aber, wesentlich wahrscheinlicher, dass es (auch) andere, von Zeaxanthin unabhängige Mechanismen gibt, die zur Bildung von  $q_{des}$  führen.

#### Zusammenfassung

Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass es zumindest einige Beobachtungen dafür sprechen, dass der Zeaxanthin-Gehalt in *T. asymmetrica* bei der Entstehung von  $q_{des}$  eine Rolle spielen könnte. Dafür spricht die Korrelation zwischen Zeaxanthin-Gehalt und der Stärke des beobachteten  $q_{des}$  bei unter verschiedenen Lichtintensitäten kultivierten Algen und dass DTT und Nigericin in der Lage waren,  $q_{des}$  zumindest teilweise zu inhibieren. Allerdings wäre die Entstehung von  $q_{des}$  ohne Licht nur dann durch einen von dem Zeaxanthin-Gehalt abhängigen Mechanismus erklärlich, wenn man von einer Zeaxanthin-Synthese auch in Dunkelheit ausgeht (Fernández-Marín et al. 2010b, 2011a).

Allerdings ist es wenig wahrscheinlich, dass ein vom Zeaxanthin-Gehalt abhängiger, dem NPQ höherer Pflanzen entsprechender, Mechanismus bei *T. asymmetrica* und wahr-

scheinlich auch vielen anderen aeroterrestischen austrocknungstoleranten Mikroalgen allein für die Entstehung von  $q_{des}$  verantwortlich ist: Weder waren DTT noch Nigericin in der Lage den Entstehungsprozess von  $q_{des}$  wirklich vollständig zu inhibieren. Streng genommen war diese Reduktion sogar gemessen an der Stärke des gesamten  $q_{des}$  eher klein. Es zeigte sich keine Veränderung des Zeaxanthin-Gehaltes durch die Präsenz von Iod und zusätzlichem Zink im Kulturmedium oder durch die Behandlung mit Arabitol, obwohl beides starken Einfluss auf die Stärke von  $q_{des}$  hatte. Vielmehr scheint  $q_{des}$  ein komplexes Phänomen zu sein, bei dem mehrere Mechanismen zusammen spielen, wie es bereits andere Autoren postuliert haben (Heber 2008; Yamakawa et al. 2012, 2017; Slavov et al. 2013; Ruban 2016).

Die Kulturexperimente mit verschiedenen starken Wachstumslicht zeigten, dass *T. asymmetrica* bei den für die Experimente mit Jod und Zink verwendeten Lichtbedingungen bereits nicht mehr lichtlimitiert ist. Das gesteigerte Wachstum durch die Gabe von Jod und Zink kann als Indikator dafür betrachtet werden, dass die Algen unter diesen Bedingungen weniger (Licht-)Stress ausgesetzt waren. Dies wiederum hätte einen geringeren Gehalt an Zeaxanthin, welches in erster Linie aufgrund von Lichtstress gebildet wird, erwarten lassen und somit, einen direkten und unmittelbar vom Zeaxanthingehalt abhängigen Mechanismus für  $q_{des}$  vorausgesetzt, zu einer Verminderung desselben. Tatsächlich war aber das Gegenteil der Fall. Also sprechen auch diese Beobachtungen stark gegen einen nur vom Zeaxanthingehalt abhängigen Mechanismus des  $q_{des}$ .

4.10 Osmotischer Stress führt nicht zu einer dem  $q_{des}$  vergleichbaren Reaktion, wohl aber auch zu einer Reduktion von  $F_0$  und  $F_V/F_M$

Bei *T. asymmetrica* kam es durch osmotischen Stress zu einem Abfall der Stärke des Grundfluoreszenzsignals, der in zumindest für bestimmte Wasserpotentiale zwischen -10 MPa psi und -20 MPa psi in seiner Ausprägung durchaus dem durch Austrocknung an Luft verursachten  $q_{des}$  entspricht, wie in Abb. 2 zu erkennen ist. Aber es gibt auch gravierende Unterschiede. Bei osmotischem Stress fiel  $F_0$  auf Werte ab, die mit dem Wasserpotential der jeweiligen Sorbitol-Lösungen korrespondieren. Bei  $q_{des}$  fiel  $F_0$  abhängig von der jeweiligen Luftfeuchte ab oder aber, wenn die entsprechende aeroterrestrische Alge in der Lage war, trotz des auf sie einwirkenden negativen Wasserpotentials hydriert zu bleiben, eben nicht. Nur bei sehr rascher Austrocknung bei sehr niedriger Luftfeuchte und niedrigem Wasserpotential der Umgebungsluft sank  $F_0$  bei  $q_{des}$  nicht in der gleichen Größenordnung wie bei höheren Luftfeuchten (und damit kleineren Austrocknungsraten) ab (Wieners et al. 2018b). Dies ist möglicherweise auf ein rasches Entstehen einer glasartigen Matrix aus Kohlenhydraten zurückzuführen, welche einen wesentlichen Anteil an der Kryptobiose hat und jede Enzymaktivität unterbindet (Fernández-Marín et al. 2013). Es ist wahrscheinlich, dass dadurch auch die Prozesse, die für die Entstehung von  $q_{des}$  verantwortlich sind, unterbunden wurden und daher das  $F_0$ -Signal bei einer gewissen Stärke einfach einfro.

Der  $F_0$  Quench durch osmotischen Stress war somit von der Konzentration des

Osmotikums abhängig, während  $q_{des}$  eine Alles-oder-Nichts Reaktion darstellte, die beim Unterschreiten einer gewissen Wasserkonzentration in der Zelle einsetzte und endete, wenn entweder die maximal mögliche Stärke erreicht war oder aber der Prozess des  $q_{des}$  wegen Wassermangels abbrach.

Dieser grundsätzliche mechanistische Unterschied zwischen osmotischen Quench und  $q_{des}$  wird auch bei der Betrachtung von  $F_V/F_M$  deutlich (Abb.3). Ähnlich wie  $F_0$  fiel  $F_V/F_M$  bei osmotischem Stress auf einen Wert ab, der mit der Konzentration des Osmotikums korrespondierte, während bei  $q_{des}$  entweder das Signal auf seiner Ausgangsstärke bleibt und die Algen damit voll photosynthetisch aktiv bleiben oder aber sehr rasch auf Werte nahe gleich null abfiel. Bei osmotischem Stress durch Sorbitollösungen sank  $F_V/F_M$  zwar ab, blieb aber weiterhin deutlich messbar.

Da aber gerade die massive Reduktion von  $F_V/F_M$  zusammen mit dem Abfall von  $F_0$  die Beobachtungen sind, die auf einen Schutzmechanismus vor Photoinhibition durch  $q_{des}$  hindeuten, ist dieser Unterschied ausgesprochen wichtig, um beurteilen zu können inwieweit  $q_{des}$  und der durch osmotischen Stress verursachten Reduktion von  $F_0$  derselbe Mechanismus zugrunde liegt oder nicht. Bleibt die variable Fluoreszenz erhalten, obwohl der Elektronentransport nicht mehr in vollem Umfang möglich ist, so wird dadurch die Photoinhibition durch eine Hemmung der Akzeptor-Seite (siehe Modelle der Photoinhibition) wahrscheinlicher. Der Schutz durch  $q_{des}$  vor Photoinhibition beruht darauf, dass es eben nicht mehr zu einer als  $F_V/F_M$  messbaren Anregung von PSII kommt. Folglich ist, so überhaupt vorhanden, die Schutzwirkung durch die bei osmotischem

---

Stress durch Sorbitol-Lösungen verursachte Reduktion von  $F_o$  deutlich kleiner als die durch  $q_{des}$ .

Dass *T. asymmetrica*, trotz des zum Teil beträchtlichen osmotischen Stresses überhaupt noch in der Lage ist, ein durchaus nennenswertes  $F_v/F_M$  zu zeigen, ist hingegen wenig erstaunlich: Zum einen ist *T. asymmetrica* wie viele andere aeroterrestische Algen, insbesondere Photobionten von Flechten, in der Lage auch gegen ein hohes Wasserpotential Wasser aus feuchter Umgebungsluft aufzunehmen (Lange et al. 1989a; Büdel and Lange 1991), zum anderen haben diverse Experimente gezeigt, dass *T. asymmetrica* nicht nur den durch die Kultur in Meerwasser verursachten osmotischen Stress toleriert, sondern sogar darin sehr gut gedeiht, wie die Wachstumskurven der entsprechenden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen.

Wenn wir nun die Ergebnisse der mit *C. vulgaris* gemachten Experimente ansehen, dann werden die Unterschiede zwischen den beiden verschiedenen experimentellen Ansätzen noch deutlicher: Im Gegensatz zur Austrocknung an Luft zeigt *C. vulgaris* unter den gewählten experimentellen Bedingungen bei osmotischem Stress einen deutlichen Rückgang von  $F_o$ . Bei allen im Rahmen dieser Arbeit gemachten Experimenten, bei denen *C. vulgaris* an der Luft getrocknet wurde, gleich bei welcher Austrocknungsrate, kam es hingegen immer zu einem Anstieg dieses Parameters. An dieser Stelle muss nochmals betont werden, dass *C. vulgaris* bei der Austrocknung an Luft niemals  $q_{des}$  gezeigt hat und immer austrocknungssensitiv war.

Auch wenn das im Rahmen dieser Experimente verwendete Verfahren noch ver-

besserungsbedürftig ist und auch optische Artefakte durchaus eine denkbare Erklärung für einen Teil der Ergebnisse sein könnten (Schörle 2017), so erscheint doch der beobachtete Trend durchaus verlässlich zu sein. Das bedeutet, dass es gravierende Unterschiede zwischen einer Austrocknung an Luft und osmotischen Stress auch in Bezug auf  $q_{des}$  gibt und daher die Verwendung von Osmotika zur Simulation von Trockenstress, selbst wenn dabei nicht ionische Substanzen wie Sorbitol verwendet werden, wohl eher ungeeignet sind. Nichtsdestoweniger sind die Ergebnisse im Vergleich ausgesprochen interessant und gerade die Unterschiede zwischen Trockenstress und osmotischem Stress in Bezug auf die Chlorophyllfluoreszenz von austrocknungstoleranten und austrocknungssensitiven Algen können neue Einblicke in die Natur der Anpassungen der verschiedenen Algenspezies an diese beiden ähnlichen, aber im Detail doch sehr verschiedenen Stressfaktoren gewähren.

So sei an dieser Stelle erwähnt, dass sich etwa *Dunaliella salina*, eine extrem halophile und damit gegenüber osmotischem Stress sehr tolerante Alge, bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente keine Austrocknungstoleranz zeigte, während auch von einigen anderen aeroterrestischen Algen (*Chlorella trebouxioides* SAG 2143, *Chlorella luteoviridis* SAG 2196 und *Apatooccus lobatus* SAG 2096) bekannt ist, dass sie durchaus in voll marinen Medien gedeihen können und die nicht austrocknungstolerante Süßwasser-alge *C. vulgaris* (SAG 211-11b) auch noch in Brackwasser (1,9% Salinität) rund 80% ihrer maximal in Süßwassermedium erreichten maximalen Wachstumsrate zeigt (Gustavs et al. 2010). Bei der Anpassung an osmotischem Stress spielen

organische Osmolyte offenbar eine wichtige Rolle: In den entsprechenden nichtmarinen Spezies wurden unter marinen Bedingungen zum Teil beträchtliche Konzentrationen von niedermolekularen Kohlenhydraten wie Saccharose und Ribitol gefunden (Gustavs et al. 2010), was möglicherweise eine Verbindung zu den von Kosugi (Kosugi et al. 2013) aber auch im Rahmen dieser Arbeit gemachten Experimente mit Arabitol und damit auch zum Phänomen des  $q_{des}$  darstellt. Wichtig ist aber zu betonen, dass Euryhalinität und Austrocknungstoleranz unanständig voneinander vorkommen, wie etwa die Experimente mit *D. salina* (Wieners et al. 2018b) zeigen, und zwar eine Korrelation zwischen der Austrocknungstoleranz und  $q_{des}$ , nicht aber zwischen Euryhalinität und  $q_{des}$  besteht.

#### 4.11 Wachstumsraten unter verschieden starkem Wachstumslicht

Wenig überraschend zeigte sich bei den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten der starke Einfluss, den die Lichtbedingungen auf das Wachstum von Mikroalgen haben (Sorokin and Krauss 1958; Brown and Richardson 1968; Wahidin et al. 2013). Da ohnehin verschiedene Beleuchtungsstärken zur Manipulation des Zeaxanthin-Gehalts benutzt wurden und sich auch zeigte, dass die Stärke des Wachstumslichtes einen erheblichen Einfluss auf die Stärke des beobachteten  $q_{des}$  hatte, und um den Einfluss von Jod und Zink auf die maximalen Wachstumsraten von *T. asymmetrica* zu messen, ohnehin die maximalen Wachstumsraten quantifiziert wurden, lag es nahe, auch die Lichtabhängigkeit der Wachstumsraten (und, in anderem Zusammenhang, deren Carotinoid-Zusammensetzung) von *T.*

*asymmetrica* zu bestimmen. Um diese wiederum sinnvoll einordnen zu können waren Vergleichswerte notwendig, weswegen die Untersuchung auch auf *C. vulgaris* und *M. salina* ausgedehnt wurden (siehe Kapitel 3.4). An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Algen, anders als bei der Messung einer Lichtkurve, die Gelegenheit hatten unter den jeweiligen Lichtbedingungen tatsächlich längere Zeit zu wachsen, was heißt, sich voll zu akklimatisieren. Dabei wurde bei den von den regulären (also für die Kultur üblichen) Lichtstärken von etwa  $100 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  hin zu stärkeren Lichtintensitäten schrittweise vorgegangen, um Schäden durch plötzlichen Lichtstress zu vermeiden. Hierbei wurden die Kulturen um eine Stufe der Lichttreppe pro Tag angehoben. Diese langsame und schrittweise Akklimatisierung ist nötig, um durch Lichtstress induzierte Phänomene zu verhindern um dauerhafte Anpassungen an eine bestimmte Beleuchtungsstärke hinsichtlich der maximalen Wachstumsrate und Carotinoid-Zusammensetzung beobachten zu können.

Die Auswirkungen verschiedener Beleuchtungsstärken auf die Carotinoid-Zusammensetzung, insbesondere bezüglich des Gehaltes an Zeaxanthin, und die von den Lichtbedingungen während der Kultur beeinflusste Stärke des  $q_{des}$  wurden bereits an anderer Stelle ausführlich diskutiert (siehe Kapitel 4.4 und 4.9.). An dieser Stelle soll der Fokus auf die Diskussion der für *T. asymmetrica*, *C. vulgaris* und *N. salina* ermittelten maximalen Wachstumsraten und insbesondere deren Bedeutung in einem ökologischen Kontext gelegt werden.

Mikroalgen nach den gleichen Kriterien wie höhere Pflanzen in Sonnen- oder Schattenpflanzen zu klassifizieren (Boardman



---

1977; Björkman 1981; Givnish 1988; Öquist et al. 1992; Murphy et al. 2014) ist nicht unproblematisch, sind die Unterschiede zwischen Algen und höheren Pflanzen doch sehr gravierend: Bei der Kultur im flüssigen Medium spielt bei ihnen Stress durch Trockenheit ebenso wenig eine Rolle wie die (ohnehin kaum mögliche) Regulation der Transpiration. Auch die Mechanismen zur Aufnahme von CO<sub>2</sub> unterscheiden sich zwischen (den meisten) höheren Pflanzen und (den meisten) Mikroalgen sehr. Bei Mikroalgen erfolgt diese durch einen Carbon Concentration Mechanism über mehrere Zwischenschritte und Carbonat-Ionen, die die wichtigste Kohlenstoffquelle darstellen. Das im Wasser gelöste molekulare CO<sub>2</sub> hingegen ist kaum von Bedeutung (Atkinson et al. 2016; Harholt et al. 2016; Meyer et al. 2016). Dennoch sind diese Begriffe von Nutzen, um die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse in einen ökologischen Kontext einzubinden. Hierzu gibt es im Zusammenhang mit aquatischen Algen auch einige Beispiele aus der Literatur (Gargas 1971; Falkowski 1980; Nedbalová et al. 2017).

Wenn man nun das Schema von Sonnen- und Schattenpflanzen auf die untersuchten Algen anwendet, so kann man *M. salina* durchaus als Sonnen-Alge bezeichnen, da diese Alge bei niedrigen Lichtintensitäten kein oder nur ein geringes Wachstum zeigte, aber sich die maximalen Wachstumsraten mit höheren Lichtintensitäten (im Rahmen des Messbereichs) praktisch linear steigern ließen (Kapitel 3,4). Ähnliches wurde auch bei deutlich höheren Lichtintensitäten beobachtet (Göthlich et al., siehe Anhang). *C. vulgaris* hingegen zeigte ein Verhalten, das eher an das von Schattenpflanzen erinnerte: Diese Alge war auch in der Lage mit wenig

Licht zu wachsen und zeigte bei höheren Lichtintensitäten zunächst eine Sättigung und dann sogar einen Rückgang der maximalen Wachstumsraten.

*T. asymmetrica* aber zeigte ein Schema, das sich nicht in diese beiden Kategorien einfügen lässt: Auf der einen Seite konnte diese Alge selbst noch bei weniger Licht als *C. vulgaris* wachsen, auf der anderen Seite zeigte sie aber keinen Rückgang der maximalen Wachstumsrate bei hohen Lichtintensitäten von bis zu 380 μmol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>. Im Vergleich zu *C. vulgaris* und auch *M. salina* waren die maximalen Wachstumsraten von *T. asymmetrica* im Bereich über 60 μmol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> allerdings deutlich niedriger.

Diese Ergebnisse können als Anpassung von *T. asymmetrica* an ihre Rolle als Photobiont der Flechten gedeutet werden, in denen sie normalerweise vorkommt: *Diploschistes albescens* (Lettau 1937) *Fulgensia fulgida* und *Toninia sedifolia* (Beck et al. 2002). All diese Flechten sind Krustenflechten und typische Vertreter der moderat xerophytischen Bunten Erdflechtengesellschaft (Syntaxa Toninietalia coeruleonigricantis), die dadurch charakterisiert wird, dass es in ihr keine oder nur wenige größere Pflanzen gibt, so dass die dort vorkommenden Flechten der vollen Sonneneinstrahlung ausgesetzt sind (Bültmann 2012). Die Bunte Erdflechtengesellschaft ist vor allem in warmen Regionen Mitteleuropas, dem Mittelmeerraum sowie semi-ariden Regionen Amerikas und Asiens zu finden (Brechener 2001). Diese Regionen zeichnen sich durch eher humide Wintermonate und warme Sommermonate mit geringen und unregelmäßigen Niederschlägen aus (Scherhag et al. 1977; Akin 1991; Kottek et al. 2006). Zusammen mit der für die Bunte Erdflechtengesellschaft ty-

pischen geringen Wasserspeicherkapazität und guten Drainage des Substrats (Ott et al. 1996, 1997) ergibt sich dadurch eine extrem volatile Verfügbarkeit an Wasser, ohne dass diese notwendigerweise an eine bestimmte Lichtintensität gekoppelt ist (Sommerregen bzw. regenreiche Wintermonate). Hervorzuheben ist, dass zumindest von den Flechten der Gattung *Diploschistes* bekannt ist, dass sie keinen weiteren Photobionten besitzen (Nash 2002), so dass die gesamte Photosyntheseaktivität dieser Flechten unter allen Wachstumsbedingungen allein von *T. asymmetrica* abhängt. Bei anderen Photobionten, die im Rahmen anderer Flechtensymbiosen andere Habitate bewohnen, würde man möglicherweise zu ganz anderen Ergebnissen kommen:

So ist etwa für *Xanthoria parietina* bekannt, dass diese Flechte hohe Strahlungsintensitäten im hydrierten Zustand schlechter verträgt als im ausgetrockneten Zustand (Gauslaa and Solhaug 2004), was möglicherweise auf die Schutzwirkung von  $q_{des}$  zurückzuführen ist, während *Lobaria pulmonaria* wohl aufgrund von aktiven Reparaturprozessen im hydrierten Zustand resistenter gegen Photoinhibition ist als ausgetrocknet (Gauslaa and Solhaug 2004). Es gibt auch Beispiele für Flechten aus immerfeuchten Habitaten wie *Pseudocyphellaria dissimilis*, die nicht austrocknungstolerant sind (Green et al. 1991). Weiterhin gibt es auch Habitate, in denen Flechten zwar regelmäßig hoher Sonneneinstrahlung ausgesetzt, dabei aber stets ausgetrocknet sind, da nächtlicher Tau und Nebel die einzigen zur Verfügung stehenden Wasserquellen darstellen und sich daher die photosynthetisch aktive Phase dieser Flechten auf den frühen Morgen beschränkt, wobei man vom sogenann-

ten Flechtenfrühstück spricht (Lange et al. 1994). Allein schon diese kurze und unvollständige Aufzählung zeigt, dass bei Flechten-Photobionten ein großes Maß an Vielfalt bezüglich ihrer Anpassung an verschiedene Lichtverhältnisse zu erwarten ist!

Auch außerhalb der Flechtensymbiose ist eine große Vielfalt an Anpassungen an unterschiedliche Lichtverhältnisse und deren kurz-, mittel- und langfristigen Schwankungen mehr als wahrscheinlich, da sich auch die Lebensräume von verschiedenen frei lebenden aeroterrestrischen und aquatischen Algen in dieser Hinsicht stark voneinander unterscheiden. Doch um dies beurteilen zu können, ist noch erhebliche Forschungsarbeit vonnöten. Diesen potentiell zu gewinnenden Erkenntnissen kommt nicht nur eine deskriptive Bedeutung zu, sondern sie dienen auch dem besseren Verständnis der Ökologie dieser Organismen und sollten darüber hinaus auch bei biotechnologischen Anwendungen von Mikroalgen, etwa bei der Konstruktion von Photobioreaktoren, berücksichtigt werden.

## 5. Ausblick

Aus dieser Arbeit ergeben sich zahlreiche neue Fragestellungen und weiterführende Forschungsansätze, die ich an dieser Stelle kurz umreißen möchte:

### 5.1 Der Wirkmechanismus von Jod und Zink auf die Entstehung von $q_{des}$

Die wahrscheinlich drängendste Frage, die sich aus dieser Arbeit ergibt, ist die nach dem Mechanismus, über den Jod und Zink Einfluss auf die Stärke des  $q_{des}$  nehmen. Wie schon an anderer Stelle erläutert ist die Wir-

---

kungsweise dieser beiden Stoffe und deren Interaktion im Moment noch mehr als unklar.

Es wäre wünschenswert in einem ersten weiterführenden Schritt die Aufnahme von Jod und Zink in die Algenzellen zweifelsfrei zu belegen und festzustellen, ob es eine Akkumulation über die Konzentration des Umgebungsmediums hinaus gibt.

Weiterhin wäre es hilfreich vor allem Jod innerhalb der Zelle, besser noch innerhalb der Chloroplasten, zu lokalisieren. Dies könnte wertvolle Hinweise auf mögliche Mechanismen geben, wie Jod und Zink Einfluss auf die Stärke von  $q_{des}$  nehmen können, vor allem ob ihre Wirkung direkt am Photosynthese-Apparat ansetzt oder aber indirekt an einer anderen Stelle des Zellstoffwechsels

## 5.2 Gaswechselfmessungen parallel zur Chlorophyllfluoreszenzmessung

Neben den Parametern der Chlorophyllfluoreszenz gibt es noch eine ganze Reihe anderer Parameter, die zu beobachten von großem Interesse wäre. Es wäre ohne Zweifel hilfreich zusätzlich zu der Messung der Fluoreszenz den Gaswechsel ausreichend präzise messen zu können, denn auch wenn die Argumentation, dass mit dem Wegfall der variablen Fluoreszenz die Photosynthese als Ganzes zum Erliegen kommt, schlüssig ist, könnte ein vom Messverfahren her gänzlich anderer Ansatz für die Verifizierung der gemachten Beobachtungen sehr nützlich sein. Auch könnte die ergänzende Messung des Gaswechsels weiteren Aufschluss auf die gesamte Stoffwechselaktivität der untersuchten Algen geben. So ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar, ab welchem Zeitpunkt der Austrocknung tatsächlich der gesamte Metabolismus zum Erliegen kommt. Insbe-

sondere da zu erwarten ist, dass die Entstehung von  $q_{des}$  kein passiver, nur vom Wassergehalt der Zellen abhängiger Prozess ist, sondern ein aktiver, wäre dies bedeutsam.

## 5.3 Bestimmung des Wassergehalts der Proben/der Algen während der Experimente

Bei den im Rahmen dieser Arbeit gemachten Experimenten konnte bislang der Wassergehalt der Zellen nicht direkt bestimmt werden, so dass unklar ist, wie hoch der tatsächliche Wassergehalt der Algen zu einem bestimmten Zeitpunkt des Austrocknungs- und Wiederbefeuchtungsprozesses eigentlich ist. Der Versuch, die Austrocknung an Luft durch osmotischen Stress zu ersetzen, was einen Teil dieses Problems relativiert hätte, wirft jedoch neue Fragen auf und ist aller Voraussicht nach nicht ohne weiteres mit der Austrocknung an Luft zu vergleichen (siehe oben). In einem ersten Schritt könnte man versuchen, den Wassergehalt der ganzen Probe genauer zu bestimmen und dessen Veränderung während der Experimente zu verfolgen, indem man die Gewichtsveränderung der Proben während dieser Vorgänge hinreichend genau misst. Aber auch das wäre letztendlich nur ein indirekter Ansatz, um den Wassergehalt der Algenzellen besser einschätzen zu können, da ja auch an allen Oberflächen der Probe (nicht nur denen der Algen) abgeschiedenes Wasser mitgewogen würde. Andere, wünschenswertere, zerstörungsfreie, Ansätze wären hier aller Voraussicht nach vielversprechender.

#### 5.4 Beobachtung des $q_{des}$ an einer einzelnen Zelle

Alle Experimente, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden, beruhen auf Proben, die aus zahlreichen Algenzellen bestanden. Daher sind auch die Ergebnisse der Chlorophyllfluoreszenzmessungen nicht die einer einzelnen Alge, sondern die Summe zahlreicher verschiedener Chlorophyllfluoreszenzsignale zahlreicher verschiedener Algen. Daraus ergeben sich Überlegungen, die bei weiteren Experimenten berücksichtigt werden sollten:

Wenn wir einen kontinuierlichen Verlauf eines Signals über eine gewisse Zeit betrachten, das aber eigentlich die Summe zahlreicher Signale ist, so bleibt unklar, ob sich all die Signale, die in diese Summe eingeflossen sind, ebenso verhalten wie die Summe selbst, oder ob sich der Signalverlauf erst durch die Aufsummierung der einzelnen Signale ergibt. So kann eine aus vielen Dioden zusammengesetzte Lichtquelle ebenso gut durch das Dimmen aller wie auch durch das Abschalten einzelner Dioden in der Summe ihrer Leuchtstärke verringert werden. Insbesondere erscheint es eher unwahrscheinlich, dass alle Algenzellen einer Probe tatsächlich der gleichen Austrocknungsrate unterworfen sind: Einige befinden sich direkt an der Oberfläche oder an den Kanten der Probe, andere unter der Oberfläche und/oder in der Mitte der Probe. So kommt es zu gewissen Unsicherheiten, inwieweit das gemessene Chlorophyllfluoreszenzsignal tatsächlich das Verhalten einer einzelnen Alge wieder spiegelt.

Da aber die Dynamik dieses Signals entscheidend ist, um Aussagen über den dem  $q_{des}$  zugrundeliegenden Mechanismus ma-

chen zu können, wäre es sehr wünschenswert, einen Weg zu finden, eine einzelne Algenzelle zu messen.

#### 5.5 Genauere Quantifizierung der Schutzwirkung des $q_{des}$ gegen Lichtstress

Auch wenn bereits gezeigt werden konnte, dass  $q_{des}$  eine Schutzwirkung gegen Photoinhibition bei aeroterrestrischen Algen im ausgetrockneten Zustand hat und sich durch die Gabe von Jod und Zink nicht nur  $q_{des}$  sondern eben auch der damit verbundene Schutz vor Photoinhibition verstärken lässt (Wieners et al. 2012), so steht doch noch aus, die einer bestimmten Verringerung der Grundfluoreszenz relativ zum Referenzwert zugeordnete Verminderung des durch Lichtexposition im ausgetrockneten Zustand verursachte Rückgangs an  $F_v/F_M$  genauer zu bestimmen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist das Verhältnis von  $q_{des}$  zum Schutz vor Photoinhibition noch unklar. Es könnte ebenso eine lineare wie eine logarithmische oder noch andersartige Abhängigkeit bestehen. Auch die Frage ob und in welcher Stärke ein Sättigungseffekt auftritt, ist noch unbeantwortet. Ebenso wie die Dynamik des Prozesses der Entstehung des  $q_{des}$  selbst, wären diese Informationen hilfreich, um den Mechanismus von  $q_{des}$  besser verstehen zu können. Die Antwort auf diese Frage ist darüber hinaus aber auch aus ökologischen bzw. evolutionsbiologischen Gesichtspunkten von großem Interesse: Wenn  $q_{des}$  ein Schutzmechanismus gegen Photoinhibition ist, dann wäre es wichtig, mehr über dessen Effizienz zu wissen.

---

## 5.6 Experimente mit verschiedenen Lichtspektren

Die verschiedenen Modelle zur Entstehung von Photoinhibition gehen von einer unterschiedlichen Wirksamkeit bestimmter Wellenlängen des absorbierten Lichts aus. Insbesondere das Modell der Mn-induced donor side photoinhibition besagt, dass es durch UV und blaues Licht zu einer ganz anderen Art von Schädigung kommt als durch Licht längerer Wellenlängen. Daraus ergibt sich die Frage, bei welchen Wellenlängen (und somit auch gegen welche Art der Photoinhibition)  $q_{des}$  einen Schutz darstellt und wie wirksam dieser ist. Dies könnte wertvolle Hinweise geben, wo der Mechanismus von  $q_{des}$  ansetzt, was wiederum hilfreich wäre, diesen Mechanismus selbst ergründen zu können.

## 5.7 Weitere Versuchsorganismen

Der größte Teil der Experimente, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurde mit *T. asymmetrica* durchgeführt. Auch wenn die Ergebnisse der Screening-Experimente (Wieners et al. 2018b) deutlich zeigen, dass *T. asymmetrica* was ihr Verhalten bezüglich  $q_{des}$  bei Austrocknung und ihr Vermögen bei 100% Luftfeuchte wieder zu hydrieren angeht gut mit anderen Photobionten und freilebenden aeroterrestrischen Algen vergleichbar ist, so hat die Beschränkung auf einen Modellorganismus eine Reihe von Nachteilen: Sehr leicht kann auf diese Weise eine spezielle Eigenschaft eines Organismus als eine allgemeine Eigenschaft vieler missdeutet werden. Besonders reizvoll wäre es, ein Paar aus zwei möglichst eng miteinander verwandter Arten zu finden, bei dem die eine

Art  $q_{des}$  und Austrocknungstoleranz zeigt, die andere aber nicht. Durch den Einsatz moderner molekularbiologischer Methoden könnte man dann die Unterschiede zwischen beiden Arten auf genetischem Niveau ermitteln und auf diese Weise eingrenzen, welche Anpassungen es denn nun genau sind, die es einer Alge erlauben, ein Leben als poikilohydre, austrocknungstolerante Art zu führen – und ggf. auch, welchen ökologischen Preis sie für diese Anpassungen zu zahlen hat (Herms and Mattson 1992).

## 6. Literaturverzeichnis

- Adams W, Demmig-Adams B, Lange O (1993) Carotenoid composition and metabolism in green and blue-green algal lichens in the field. *Oecologia* 94:576–584
- Adir N, Zer H, Shochat S, Ohad I (2003) Photoinhibition—a historical perspective. *Photosynth Res* 76:343
- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW (2012) The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 59:429–493. doi: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x
- Ahmadijian V (2012) *The lichens*. Elsevier, New York, United States
- Ahmadijian V (1988) The lichen alga *Trebouxia*: does it occur free-living? *Plant Syst Evol* 158:243–247
- Akin WE (1991) *Global patterns: climate, vegetation, and soils*. University of Oklahoma Press, Norman, United States
- Alekseev VR, Sychev VN, Novikova ND (2007) Studying the phenomenon of dormancy: why it is important for space exploration. In: *Diapause in Aquatic Invertebrates Theory and Human Use*. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp 207–214
- Allakhverdiev SI, Sakamoto A, Nishiyama Y, Murata N (2000) Inactivation of photosystems I and II in response to osmotic stress in *Synechococcus*. Contribution of water channels. *Plant Physiol* 122:1201–1208
- Alpert P (2005) The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integr Comp Biol* 45:685–695
- Alpert P (2006) Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *J Exp Biol* 209:1575. doi: 10.1242/jeb.02179
- Andersen RA (2005) *Algal culturing techniques*. Elsevier, New York, United States
- Anderson JM, Andersson B (1982) The architecture of photosynthetic membranes: lateral and transverse organization. *Trends Biochem Sci* 7:288–292
- Angelcheva L, Mishra Y, Antti H, Kjellsen TD, Funk C, Strimbeck RG, Schröder WP (2014) Metabolomic analysis of extreme freezing tolerance in Siberian spruce (*Picea obovata*). *New Phytol* 204:545–555
- Armstrong RA (2017) Adaptation of Lichens to Extreme Conditions. In: *Plant Adaptation Strategies in Changing Environment*. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp 1–27
- Armstrong RA, Smith S (1994) The levels of ribitol, arabitol and mannitol in individual lobes of the lichen *Parmelia conspersa* (Ehrh. ex Ach.) ACH. *Environ Exp Bot* 34:253–260
- Arsalane W, Rousseau B, Duval J (1994) Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem Photobiol* 60:237–243
- Atkins PW, Jones L (2006) *Chemie - einfach alles, Zweite, vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany
- Atkinson N, Feike D, Mackinder L, Meyer MT, Griffiths H, Jonikas MC, Smith AM, McCormick AJ (2016) Introducing an algal carbon concentrating mechanism into higher plants: location and incorporation of key components. *Plant Biotechnol J* 14:1302–1315
- Avenson TJ, Ahn TK, Zigmantas D, Niyogi KK, Li Z, Ballottari M, Bassi R, Fleming GR (2008) Zeaxanthin radical cation formation in minor light-harvesting complexes of higher plant antenna. *J Biol Chem* 283:3550–3558
- Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* 59:89–113. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759
- Baranov V, Novikova N, Polikarpov N, Sychev VN, Levinskikh MA, Alekseev VR, Okuda T, Sugimoto M, Gusev OA, Grigor'ev AI (2009) The bio-risk experiment: 13-month exposure of resting forms of organism on the outer side of the Russian segment of the international space station: preliminary results. Springer, pp 267–270
- Bartels D, Dinakar C (2013) Balancing salinity stress responses in halophytes and non-halophytes: a comparison between *Thellungiella* and *Arabidopsis thaliana*. *Funct Plant Biol* 40:819–831
- Beck A, Kasalicky T, Rambold G (2002) Myco photobiontal selection in a Mediterranean cryptogam community with *Fulgensia fulgida*. *New Phytol* 153:317–326
- Belnap J (2003) The world at your feet: desert biological soil crusts. *Front Ecol Environ* 1:181–189
- Belnap J (2006) The potential roles of biological soil crusts in dryland hydrologic cycles. *Hydrol Process* 20:3159–3178
- Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L (2018) *Stryer Biochemie*, 8. Auflage. Springer Spektrum, Berlin
- Bertsch A (1966a) CO<sub>2</sub>-Gaswechsel und Wasserhaushalt der Aerophilen Grünalge *Apatococcus lobatus* CO<sub>2</sub>-Exchange and water relations in the aerophilic green-alga *Apatococcus lobatus*. *Planta* 70:46–72
- Bertsch A (1966b) CO<sub>2</sub>-Gaswechsel und Wasserhaushalt der Aerophilen Grünalge *Apatococcus lobatus*. *Planta* 70:46–72. doi: 10.1007/

- BF00539910
- Bilger W (2014) Desiccation-induced quenching of chlorophyll fluorescence in cryptogams. In: Demmig-Adams B, Garab G, Ill WA, Govindjee (eds) *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 409–420
- Bilger W, Björkman O (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth Res* 25:173–185
- Bilger W, Björkman O (1991) Temperature dependence of violaxanthin de-epoxidation and non-photochemical fluorescence quenching in intact leaves of *Gossypium hirsutum* L. and *Malva parviflora* L. *Planta* 184:226–234. doi: 10.1007/BF00197951
- Bilger W, Björkman O, Thayer SS (1989) Light-induced spectral absorbance changes in relation to photosynthesis and the epoxidation state of xanthophyll cycle components in cotton leaves. *Plant Physiol* 91:542–551
- Billi D, Potts M (2002) Life and death of dried prokaryotes. *Res Microbiol* 153:7–12
- Bisson MA, Kirst GO (1995) Osmotic acclimation and turgor pressure regulation in algae. *Naturwissenschaften* 82:461–471
- Björkman O (1981) Responses to different quantum flux densities. In: *Physiological plant ecology I*. Springer Dordrecht, Netherlands, pp 57–107
- Blunt JW, Copp BR, Hu W-P (2009) Marine natural products. *Nat Prod Rep* 26:170–244
- Boardman NT (1977) Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annu Rev Plant Physiol* 28:355–377
- Brechener (ed) (2001) *Kompaktlexikon der Biologie. 1: A bis Fotom*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Germany
- Brennicke A, Schopfer P (2010) Die Zelle als energetisches System. In: *Pflanzenphysiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp 47–70
- Brown TE, Richardson FL (1968) The effect of growth environment on the physiology of algae: light intensity. *J Phycol* 4:38–54
- Bubrick P, Galun M, Frensdorff A (1984) Observations on free living *Trebouxia* (de Puymaly) and *Pseudotrebouxia* (Archibald), and evidence that both symbionts from *Xanthoria parietina* (L. TH. FR.) can be found free living in nature. *New Phytol* 97:455–462
- Büdel B, Lange OL (1991) Water status of green and blue-green phycobionts in lichen thalli after hydration by water vapor uptake: do they become turgid? *Bot Acta* 104:361–366. doi: 10.1111/j.1438-8677.1991.tb00242.x
- Bültmann H (2012) The lichen syntaxa in the checklist of higher syntaxa of European overview and what we can do with them. *Ann Bot* 2:11–18
- Cabrita MT, Vale C, Rauter AP (2010) Halogenated compounds from marine algae. *Mar Drugs* 8:2301–2317
- Cakmak I (2000) Tansley Review No. 111 Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol* 146:185–205
- Calatayud A, Deltoro VI, Barreno E, Valle Tascon S del (1997) Changes in in vivo chlorophyll fluorescence quenching in lichen thalli as a function of water content and suggestion of zeaxanthin associated photoprotection. *Physiol Plant* 101:93–102
- Campbell D, Hurry V, Clarke AK, Gustafsson P, Öquist G (1998) Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:667–683
- Cannone N, Corinti T, Malfasi F, Gerola P, Vianelli A, Zaccara S, Convey P, Guglielmin M (2017) Moss survival through in situ cryptobiosis after six centuries of glacier burial. *Sci Rep* 7:4438
- Casper-Lindley C, Björkman O (1998) Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments. *Photosynth Res* 56:277–289. doi: 10.1023/A:1006037516479
- Chadd HE, Newman J, Mann NH, Carr NG (1996) Identification of iron Superoxide dismutase and a copper/zinc Superoxide dismutase enzyme activity within the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH 7803. *FEMS Microbiol Lett* 138:161–165. doi: 10.1016/0378-1097(96)00096-1
- Chance B, Lees H, Postgate JR (1972) The meaning of “reversed electron flow” and “high energy electron” in biochemistry. *Nature* 238:330
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot* 103:551–560
- Colica G, Li H, Rossi F, De Philippis R, Liu Y (2015) Differentiation of the characteristics of excreted extracellular polysaccharides reveals the heterogeneous primary succession of induced biological soil crusts. *J Appl Phycol* 27:1935–1944
- Coughlan SJ, Schreiber U (1984) The differential effects of short-time glutaraldehyde treatments on light-induced thylakoid membrane conformational changes, proton pumping and electron transport properties. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* 767:606–617. doi: 10.1016/0005-2728(84)90062-8

- Courtin F, Deme D, Virion A, Michot JL, Pommier J, Numez J (1982) The role of lactoperoxidase H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compounds in the catalysis of thyroglobulin iodination and thyroid hormone synthesis. *Eur J Biochem* 124:603–609
- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM (1992) Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 54:579–599
- Cser K, Vass I (2007) Radiative and non-radiative charge recombination pathways in Photosystem II studied by thermoluminescence and chlorophyll fluorescence in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Biochim Biophys Acta BBA-Bioenerg* 1767:233–243
- Czeczuga B (1985) Carotenoids in sixty-six representatives of the Pteridophyta. *Biochem Syst Ecol* 13:221–230. doi: 10.1016/0305-1978(85)90030-4
- Da Silva JF, Williams RJP (2001) The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom
- Dailland OR, Bernollin A, Josset M, Fifield KL (2009) Potential of lichens for monitoring iodine<sup>129</sup> and chlorine<sup>36</sup>. *J Radioanal Nucl Chem* 281:241–245. doi: 10.1007/s10967-009-0110-y
- Dauwe R, Holliday JA, Aitken SN, Mansfield SD (2012) Metabolic dynamics during autumn cold acclimation within and among populations of Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *New Phytol* 194:192–205
- Davies CW (1938) 397. The extent of dissociation of salts in water. Part VIII. An equation for the mean ionic activity coefficient of an electrolyte in water, and a revision of the dissociation constants of some sulphates. *J Chem Soc Resumed* 2093–2098
- de La Torre R, Sancho LG, Horneck G, de los Rios A, Wierzechos J, Olsoon-Francis K, S. Cockell CS, Rettberg P, Berger T, de Vera JPP, Ott S, Frias JM, Melendi PG, Lucas MM, Reina M, Pintado A, Demets R (2010) Survival of lichens and bacteria exposed to outer space conditions—results of the Lithopanspermia experiments. *Icarus* 208:735–748
- De Vera J-P, Horneck G, Rettberg P, Ott S (2002) The potential of the lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space—I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. *Int J Astrobiol* 1:285–293
- De Vera J-P, Horneck G, Rettberg P, Ott S (2004) In the context of panspermia: may lichens serve as shuttles for their bionts in space? In: Proceedings of The Third European Workshop on Exo-Astrobiology, 18 - 20 Nov. 2003, Madrid, Spain. ESA Publication Division, Noordwijk, pp 197–198
- Debye P, Huckel E (1923) The interionic attraction theory of deviations from ideal behavior in solution. *Z Phys* 24:185
- Deltoro VI, Calatayud A, Gimeno C, Abadia A, Barreno E (1998a) Changes in chlorophyll a fluorescence, photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation and xanthophyll cycle interconversions during dehydration in desiccation-tolerant and intolerant liverworts. *Planta* 207:224–228. doi: 10.1007/s004250050476
- Deltoro VI, Calatayud A, Gimeno C, Barreno E (1998b) Water relations, chlorophyll fluorescence, and membrane permeability during desiccation in bryophytes from xeric, mesic, and hydric environments. *Can J Bot* 76:1923–1929. doi: 10.1139/b98-167
- Dembitsky VM (2017) The multiple properties of some of the lichenized ascomycetes: biological activity and active metabolites. In: Shukla V, Kumar S, Kumar N (eds) *Plant Adaptation Strategies in Changing Environment*. Springer Singapore, Singapore, pp 201–234
- Demmig-Adams B (1990) Zeaxanthin-associated energy dissipation and the susceptibility of various organisms to light stress. In: *Current research in Photosynthesis*. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp 1317–1324
- Demmig-Adams B (1998) Survey of thermal energy dissipation and pigment composition in sun and shade leaves. *Plant Cell Physiol* 39:474–482
- Demmig-Adams B, Adams III W (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Biol* 43:599–626
- Demmig-Adams B, Adams W, Green T, Czygan F-C, Lange OL (1990a) Differences in the susceptibility to light stress in two lichens forming a phycosymbiodeme, one partner possessing and one lacking the xanthophyll cycle. *Oecologia* 84:451–456
- Demmig-Adams B, Adams WW (1996) Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* 198:460–470
- Demmig-Adams B, Adams WW, Czygan F-C, Schreiber U, Lange OL (1990b) Differences in the capacity for radiationless energy dissipation in the photochemical apparatus of green and blue-green algal lichens associated with differences in carotenoid composition. *Planta* 180:582–589
- Demmig-Adams B, Adams WW, Heber U, Neimanis S, Krüger A, Czygan F-C, Bilger W, Björkman O (1990c) Inhibition of zeaxanthin formation and of rapid changes in radiationless energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts. *Plant Physiol* 92:293–301
- Demmig-Adams B, Cohu CM, Muller O, Adams WW (2012) Modulation of photosynthetic energy



- conversion efficiency in nature: from seconds to seasons. *Photosynth Res* 113:75–88
- Demmig-Adams B, Garab G, Adams III W, Govindjee U (2014) Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 503–529
- De Vera J-PP (2005) Grenzen des Überlebens: Flechten als Modellsystem für das Potential von Adaptationsmechanismen eines Symbioseorganismus unter Extrembedingungen. Dissertation, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, Germany
- Duckett JG, Pressel S (2018) The evolution of the stomatal apparatus: intercellular spaces and sporophyte water relations in bryophytes—two ignored dimensions. *Phil Trans R Soc B* 373:20160498
- El Bissati K, Delphin E, Murata N, Etienne AL, Kririlovskaya D (2000) Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: involvement of two different mechanisms. *Biochim Biophys Acta BBA-Bioenerg* 1457:229–242
- Erdmann W, Kaczmarek L (2017) Tardigrades in space research - past and future. *Orig Life Evol Biospheres* 47:545–553. doi: 10.1007/s11084-016-9522-1
- Falkowski PG (1980) Light-shade adaptation in marine phytoplankton. In: Primary productivity in the sea. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp 99–119
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In: Sustainable agriculture. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp 153–188
- Fernández-Marín B, Balaguer L, Esteban R, Beverril JM, Gracia-Plazaola (2009) Dark induction of the photoprotective xanthophyll cycle in response to dehydration. *J Plant Physiol* 166:1734–1744. doi: 10.1016/j.jplph.2009.04.019
- Fernández-Marín B, Becerril J, García-Plazaola J (2010) Unravelling the roles of desiccation-induced xanthophyll cycle activity in darkness: a case study in *Lobaria pulmonaria*. *Planta* 231:1335–1342
- Fernández-Marín B, Kranner I, Sebastián MS, Artetxe U, Laza JM, Vilas JL, Pritchard HW, Nadajarna J, Miguez F, Becerril JM, García-Plazaola JI (2013) Evidence for the absence of enzymatic reactions in the glassy state. A case study of xanthophyll cycle pigments in the desiccation-tolerant moss *Syntrichia ruralis*. *J Exp Bot* 64:3033–3043
- Fernández-Marín B, Míguez F, Becerril J, García-Plazaola J (2011a) Dehydration-mediated activation of the xanthophyll cycle in darkness: is it related to desiccation tolerance? *Planta* 234:579
- Fernández-Marín B, Míguez F, Becerril JM, García-Plazaola JI (2011b) Activation of violaxanthin cycle in darkness is a common response to different abiotic stresses: a case study in *Pelvetia canaliculata*. *BMC Plant Biol* 11:181
- Fernández Marín B, Neuner G, Kuprian E, Laz, JM, García Plazaola JI, Verhoeven A. (2018), First evidence of freezing tolerance in a resurrection plant: insights into molecular mobility and zeaxanthin synthesis in the dark. *Physiol Plantarum*, 163: 472-489. doi:10.1111/ppl.12694
- Fierro C, López-Cristoffanini C, Meynard A, Lovazzano C, Castaneda F, Guajardo E, Contreras-Porcía L (2017) Expression profile of desiccation tolerance factors in intertidal seaweed species during the tidal cycle. *Planta* 245:1149–1164. doi: 10.1007/s00425-017-2673-0
- Gao S, Gu W, Xiong Q, Xie X, Li J, Chen W, Pan G, Wang G (2015) Desiccation enhances phosphorylation of PSII and affects the distribution of protein complexes in the thylakoid membrane. *Physiol Plant* 153:492–502
- Gargas A, DePriest PT, Grube M, Tehler A (1995) Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* 268:1492
- Gargas E (1971) “Sun-shade” adaptation in microbenthic algae from the Øresund. *Ophelia* 9:107–112
- Gasulla F, Barreno E, Parages ML, Camara J, Jimenez C, Dörmann Pm Bartels D (2016) The role of phospholipase D and MAPK signaling cascades in the adaptation of lichen microalgae to desiccation: changes in membrane lipids and phosphoproteome. *Plant Cell Physiol* 57:1908–1920
- Gauslaa Y, Solhaug KA (2004) Photoinhibition in lichens depends on cortical characteristics and hydration. *The Lichenologist* 36:133–143. doi: 10.1017/S0024282904014045
- Georgieva K, Sziget Z, Sarvari E, Gaspar L, Maslenkova L, Peeva V, Peli E, Tuba Z (2007) Photosynthetic activity of homoiochlorophyllous desiccation tolerant plant *Haberlea rhodopensis* during dehydration and rehydration. *Planta* 225:955
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48:909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Gilmour DJ, Hipkins MF, Boney AD (1984) The effect of osmotic and ionic stress on the primary processes of photosynthesis in *Dunaliella tertiolecta*. *J Exp Bot* 35:18–27
- Gitzendanner MA, Soltis PS, Wong GK, Ruhfel BR, Soltis DE (2018) Plastid phylogenomic analysis of green plants: a billion years of evolutionary history. *Am J Bot* 105:291–301

- Givnish T (1988) Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective. *Funct Plant Biol* 15:63–92
- Gradinaru CC, Kennis JT, Papagiannakis E, van Stokkum IHM, Cogdell RJ, Fleming GR, Niederman RA, van Grondelle R (2001) An unusual pathway of excitation energy deactivation in carotenoids: singlet-to-triplet conversion on an ultrafast timescale in a photosynthetic antenna. *Proc Natl Acad Sci* 98:2364–2369
- Green TGA, Kilian E, Lange OL (1991) *Pseudocyphellaria dissimilis*: a desiccation-sensitive, highly shade-adapted lichen from New Zealand. *Oecologia* 85:498–503. doi: 10.1007/BF00323761
- Guidetti R, Altiero T, Rebecchi L (2011) On dormancy strategies in tardigrades. *J Insect Physiol* 57:567–576
- Gururani MA, Venkatesh J, Tran LSP (2015) Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. *Mol Plant* 8:1304–1320
- Gustavs L, Eggert A, Michalik D, Karsten U (2010) Physiological and biochemical responses of green microalgae from different habitats to osmotic and matrix stress. *Protoplasma* 243:3–14. doi: 10.1007/s00709-009-0060-9
- Hakala M, Tuominen I, Keränen M, Tyystjärvi T, Tyystjärvi E (2005) Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of photosystem II. *Biochim Biophys Acta BBA-Bioenerg* 1706:68–80
- Hakala Yatkin M, Sarvikas P, Paturi P, Mäntysaari M, Mattila H, Tyystjärvi T, Nedbal L, Tyystjärvi E (2011) Magnetic field protects plants against high light by slowing down production of singlet oxygen. *Physiol Plant* 142:26–34
- Harholt J, Moestrup Ø, Ulvskov P (2016) Why plants were terrestrial from the beginning. *Trends Plant Sci* 21:96–101
- Harwood JL, Guschina IA (2009) The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochim* 91:679–684
- Hauck M (2008) Metal homeostasis in *Hypogymnia physodes* is controlled by lichen substances. *Environ Pollut* 153:304–308. doi: 10.1016/j.envpol.2007.08.023
- Hauck M, Huneck S (2007) Lichen Substances Affect Metal Adsorption in *Hypogymnia physodes*. *J Chem Ecol* 33:219–223. doi: 10.1007/s10886-006-9225-6
- Hauck M, Jürgens S-R, Willenbruch K, Huneck S, Leuschner C (2008) Dissociation and metal-binding characteristics of yellow lichen substances suggest a relationship with site preferences of lichens. *Ann Bot* 103:13–22
- Havaux M, Dall'Osto L, Bassi R (2007) Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in *Arabidopsis* leaves and functions independent of binding to PSII antennae. *Plant Physiol* 145:1506–1520
- Heber U (2008) Photoprotection of green plants: a mechanism of ultra-fast thermal energy dissipation in desiccated lichens. *Planta* 228:641–650. doi: 10.1007/s00425-008-0766-5
- Heber U (2012) Conservation and dissipation of light energy in desiccation-tolerant photoautotrophs, two sides of the same coin. *Photosynth Res* 113:5–13
- Heber U, Azarkovich M, Shuvalov V (2007a) Activation of mechanisms of photoprotection by desiccation and by light: poikilohydric photoautotrophs. *J Exp Bot* 58:2745–2759
- Heber U, Azarkovich M, Shuvalov V (2007b) Activation of mechanisms of photoprotection by desiccation and by light: poikilohydric photoautotrophs. *J Exp Bot* 58:2745–2759
- Heber U, Bilger W, Bligny R, Lange OL (2000) Phototolerance of lichens, mosses and higher plants in an alpine environment: analysis of photoreactions. *Planta* 211:770–780. doi: 10.1007/s004250000356
- Heber U, Bilger W, Shuvalov VA (2006) Thermal energy dissipation in reaction centres and in the antenna of photosystem II protects desiccated poikilohydric mosses against photo-oxidation. *J Exp Bot* 57:2993–3006
- Heber U, Bilger W, Türk R, Lange OL (2010) Photoprotection of reaction centres in photosynthetic organisms: mechanisms of thermal energy dissipation in desiccated thalli of the lichen *Lobaria pulmonaria*. *New Phytol* 185:459–470. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03064.x
- Herms DA, Mattson WJ (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *Q Rev Biol* 67:283–335
- Hideg É, Spetea C, Vass I (1994) Singlet oxygen and free radical production during acceptor- and donor-side-induced photoinhibition: Studies with spin trapping EPR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta BBA-Bioenerg* 1186:143–152
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci* 6:431–438
- Holt NE, Zigmantas D, Valkunas L, Li XP, Niyogi KK, Fleming GR (2005) Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science* 307:433–436
- Holzinger A, Karsten U (2013) Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms. *Front Plant Sci* 4:. doi: 10.3389/fpls.2013.00327
- Honegger R (1998) The lichen symbiosis—what is so spectacular about it? *The Lichenologist* 30:193–212. doi: 10.1006/lich.1998.0140
- Horton P, Ruban A (2004) Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: pho-

- tosynthesis and photoprotection. *J Exp Bot* 56:365–373
- Horton P, Ruban A, Walters R (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu Rev Plant Biol* 47:655–684
- Jegerschöld C, Styring S (1996) Spectroscopic characterization of intermediate steps involved in donor-side-induced photoinhibition of photosystem II. *Biochemistry (Mosc)* 35:7794–7801
- Johnson G, Young A, Scholes J, Horton P (1993) The dissipation of excess excitation energy in British plant species. *Plant Cell Environ* 16:673–679
- Jung J, Kim H (1990) The chromophores as endogenous sensitizers involved in the photogeneration of singlet oxygen in spinach thylakoids. *Photochem Photobiol* 52:1003–1009
- Kaiser WM, Heber U (1981) Photosynthesis under osmotic stress. *Planta* 153:423–429
- Karsten U, Herburger K, Holzinger A (2014) Dehydration, temperature, and light tolerance in members of the aeroterrestrial green algal genus *Interfilum* (Streptophyta) from biogeographically different temperate soils. *J Phycol* 50:804–816
- Kato Y, Sakamoto W (2009) Protein quality control in chloroplasts: a current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle. *J Biochem (Tokyo)* 146:463–469
- Keng FS-L, Phang S-M, Rahman NA, Leedham EC, Hughes C, Robinson AD, Harris NRP, Pyle JA, Sturges WT (2013) Volatile halocarbon emissions by three tropical brown seaweeds under different irradiances. *J Appl Phycol* 25:1377–1386. doi: 10.1007/s10811-013-9990-x
- Kenrick P, Crane PR (1997) The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389:33
- Keren N, Berg A, Van Kan PJ, Levanon H, Ohad I (1997) Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow. *Proc Natl Acad Sci* 94:1579–1584
- Keren N, Gong H, Ohad I (1995) Oscillations of reaction center II-D1 protein degradation in vivo induced by repetitive light flashes: Correlation between the level of RCII-QB and protein degradation in low light. *J Biol Chem* 270:806–814
- Keren N, Krieger-Liszkay A (2011) Photoinhibition: molecular mechanisms and physiological significance. *Physiol Plant* 142:1–5
- Keren N, Ohad I, Rutherford AW, Drepper F, Krieger-Liszkay A (2000) Inhibition of Photosystem II activity by saturating single turnover flashes in calcium-depleted and active Photosystem II. *Photosynth Res* 63:209–216
- Kikawada T (2018) Life in no water: The extreme desiccation tolerance, anhydrobiosis in the african midge and its cultured cell line. *Cryobiology* 81:229
- Kirk KL (1991) Biochemistry of inorganic fluoride. In: *Biochemistry of the elemental halogens and inorganic halides*. Springer, Dordrecht, Netherlands pp 19–68
- Komura M, Yamagishi A, Shibata Y, Iwasaki Im Itoh S (2010) Mechanism of strong quenching of photosystem II chlorophyll fluorescence under drought stress in a lichen, *Physciella melanchnla*, studied by subpicosecond fluorescence spectroscopy. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* 1797:331–338. doi: 10.1016/j.bba-bio.2009.11.007
- Kono M, Tanabe H, Ohmura Y, Satta Y, Terai Y (2017) Physical contact and carbon transfer between a lichen-forming *Trebouxia* alga and a novel Alphaproteobacterium. *Microbiology* 163:678–691
- Kosugi M, Arita M, Shizuma R, Mariyama Y, Kashino Y, Koike H, Satoh K (2009) Responses to desiccation stress in lichens are different from those in their photobionts. *Plant Cell Physiol* 50:879–888
- Kosugi M, Miyake H, Yamakawa H, Shiabata Y, Miyazawa A, Sugimura T, Satoh K, Itoh S, Kashino Y (2013) Arabitol provided by lichenous fungi enhances ability to dissipate excess light energy in a symbiotic green alga under desiccation. *Plant Cell Physiol* 54:1316–1325
- Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel F (2006) World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol Z* 15:259–263. doi: 10.1127/0941-2948/2006/0130
- Krämer P, Wilhelm C, Wild A, Mörschel E, Rhiel E (1988) Ultrastructure and freeze-fracture studies of the thylakoids of *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae). *Protoplasma* 147:170–177
- Krause GH, Jahns P (2004) Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: characterization and function. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds) *Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 463–495
- Krause GH, Weis E (1984) Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. *Photosynth Res* 5:139–157
- Kress E, Jahns P (2017) The dynamics of energy dissipation and xanthophyll conversion in *Arabidopsis* indicate an indirect photoprotective role of zeaxanthin in slowly inducible and relaxing components of non-photochemical quenching of excitation energy. *Front Plant Sci* 8:2094. doi: 10.3389/fpls.2017.02094
- Krieger A, Rutherford AW, Vass I, Hideg É (1998) Relationship between activity, D1 loss, and Mn binding in photoinhibition of photosystem II. *Biochemistry (Mosc)* 37:16262–16269

- Krieger A, Weis E (1993) The role of calcium in the pH-dependent control of photosystem II. *Photosynth Res* 37:117–130
- Küpper FC (2015) Iodine in seaweeds—two centuries of research. In: Springer Handbook of Marine Biotechnology. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp 591–596
- Küpper FC, Carpenter LJ, Leblanc C, Toyama C, Uchida Y, Maskrey BH, Robinson J, Verhaeghe EF, Malin G, Luther GW, Kroneck PMH, Kloareg B, Meyer-Klaucke W, Muramatsu Y, Megson IL, Potin P, Feiters MC (2013) In vivo speciation studies and antioxidant properties of bromine in *Laminaria digitata* reinforce the significance of iodine accumulation for kelps. *J Exp Bot* 64:2653–2664
- Küpper FC, Carpenter LJ, McFiggans GB, Palmer CJ, Maite TJ, Boneberg EM, Woitsch S, Weiller M, Abela R, Grolimund D, Potin P, Butler A, Luther GW, Kroneck P, Meyer-Klaucke W, Feiters MC (2008) Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *Proc Natl Acad Sci* 105:6954–6958
- Küpper FC, Leblanc C, Meyer-Klaucke W, Potin P, Feiters MC (2014) Different speciation for bromine in brown and red algae, revealed by in vivo X-ray absorption spectroscopic studies. *J Phycol* 50:652–664. doi: 10.1111/jpy.12199
- Küpper FC, Schweigert N, Ar Gall E, Legendre J-M, Vilter H, Kloareg B (1998) Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta* 207:163–171. doi: 10.1007/s004250050469
- Küpper H, Šetlík I, Spiller M, Küpper FC, Prášil O (2002) Heavy metal induced inhibition of photosynthesis: Targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. *J Phycol* 38:429–441
- Kylin H (1930) Über das Vorkommen von Jodiden, Bromiden und Jodidoxidasen bei den Meeresalgen. *Hoppe-Seyler' Z Für Physiol Chem* 186:50–84
- Lange O, Kilian E (1985) Reaktivierung der Photosynthese trockener Flechten durch Wasserdampfaufnahme aus dem Luftraum: artspezifisch unterschiedliches Verhalten. *Flora* 176:7–23
- Lange O, Meyer A, Zellner H, Heber U (1994) Photosynthesis and water relations of lichen soil crusts: field measurements in the coastal fog zone of the Namib Desert. *Funct Ecol* 253–264
- Lange OL, Bilger W, Rimke S, Schreiber U (1989) Chlorophyll fluorescence of lichens containing green and blue-green algae during hydration by water vapor uptake and by addition of liquid water. *Bot Acta* 102:306–313. doi: 10.1111/j.1438-8677.1989.tb00110.x
- Leblanc C, Colin C, Cosse A, Delage L, La Barre S, Morin P, Fiévet B, Voiseux C, Ambroise Y, Verhaeghe E, Amouroux D, Donard O, Tessier E, Potin P (2006) Iodine transfers in the coastal marine environment: the key role of brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases. *Facets Environ Nucl Toxicol* 88:1773–1785. doi: 10.1016/j.biochi.2006.09.001
- Lebold TP, Yeow EK, Steer RP (2004) Fluorescence quenching of the S1 and S2 states of zinc meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin by halide ions. *Photochem Photobiol Sci* 3:160–166
- Leedham Elvidge EC, Phang S-M, Sturges WT, Malin G (2015) The effect of desiccation on the emission of volatile bromocarbons from two common temperate macroalgae. *Biogeosciences* 12:387–398. doi: 10.5194/bg-12-387-2015
- Lehninger AL, Peters G, Neubert D (1987) *Prinzipien der Biochemie*. W. de Gruyter, Berlin, Germany
- Leunenberger M, Morris J, Chan A, Leonelli L, Niyogi KK, Fleming GR (2017) Distinguishing characteristics in the regulations of carotenoid dependent non-photochemical quenching in light harvesting plants. UC Berkeley Previously Published Works. Peer reviewed.
- Li X-P, Müller-Moulé P, Gilmore AM, Niyogi KK (2002) PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proc Natl Acad Sci* 99:15222–15227
- Liang Y, Sarkany N, Cui Y (2009) Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett* 31:1043–1049
- Liao P-N, Holleboom C-P, Wilk L, Hühlbrandt W, Walla PJ (2010) Correlation of Car S1 Chl with Chl Car S1 energy transfer supports the excitonic model in quenched light harvesting complex II. *J Phys Chem B* 114:15650–15655
- Lindberg B, Misiorny A, Wachtmeister C (1955) Studies on the chemistry of lichens. *Acta Chem. Scand.* 7: 591-595
- Lovelock CE, Jackson AE, Melick DR, Seppelt RD (1995) Reversible photoinhibition in Antarctic moss during freezing and thawing. *Plant Physiol* 109:955–961
- Lutzoni F, Miadlikowska J (2009) Lichens. *Curr Biol* 19:R502–R503
- Lutzoni F, Pagel M, Reeb V (2001) Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. *Nature* 411:937
- MacFarlane J, Kershaw K (1985) Some aspects of carbohydrate metabolism in lichens. *Lichen Physiol Cell Biol Plenum Press NY* 1–8
- Maksimov E, Schmitt F-J, Tsoraev G, Ryabova AV, Friedrich T, Paschenko VZ (2014) Fluorescence quenching in the lichen *Peltigera apthosa* due to desiccation. *Plant Physiol Biochem* 81:67–73
- Malasarn D, Kropat J, Hsieh SI, Finazzi G, Casero D,

- Loo JA, Pellegrini M, Wollman F-A, Merchant SS (2013) Zinc deficiency impacts CO<sub>2</sub> assimilation and disrupts copper homeostasis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 288:10672–10683
- McEvoy 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. doi: 10.1007/s11557-006-0514-9
- Melis A (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends Plant Sci* 4:130–135
- Meyer MT, McCormick AJ, Griffiths H (2016) Will an algal CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism work in higher plants? *Curr Opin Plant Biol* 31:181–188
- Miyake H, Komura M, Itoh S, Kosugi M, Kashino Y, Satoh K, Shibata Y, (2011) Multiple dissipation components of excess light energy in dry lichen revealed by ultrafast fluorescence study at 5 K. *Photosynth Res* 110:39. doi: 10.1007/s11120-011-9691-8
- Molnár K, Farkas (2014) Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift Für Naturforschung C* 65:157. doi: 10.1515/znc-2010-3-401
- Moore CA, Okuda RK (1999) Marine bromoperoxidases—chemoenzymatic applications. *Biol-Chem Interface Tribute Koji Nakanishi* 43
- Moya I, Silvestri M, Vallon O, Cinque G, Bassi R (2001) Time-resolved fluorescence analysis of the photosystem II antenna proteins in detergent micelles and liposomes. *Biochemistry (Mosc)* 40:12552–12561
- Mukhtar A, Garty J, Galun M (1994) Does the lichen alga *Trebouxia* occur free-living in nature: further immunological evidence. *Symbiosis Phila PaUSA*
- Müller MG, Lambrev P, Reus M, Wientjes E, Croce R, Holzwarth AR (2010) Singlet energy dissipation in the Photosystem II light harvesting complex does not involve energy transfer to carotenoids. *ChemPhysChem* 11:1289–1296
- Müller P, Li X-P, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125:1558–1566
- Mullineaux CW, Pascal AA, Horton P, Holzwarth AR (1993) Excitation-energy quenching in aggregates of the LHC II chlorophyll-protein complex: a time-resolved fluorescence study. *Biochim Biophys Acta BBA-Bioenerg* 1141:23–28
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25:239–250
- Murata N, Allakhverdiev SI, Nishiyama Y (2012) The mechanism of photoinhibition in vivo: re-evaluation of the roles of catalase, -tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport. *Biochim Biophys Acta BBA-Bioenerg* 1817:1127–1133
- Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim Biophys Acta BBA-Bioenerg* 1767:414–421
- Murphy J, Moreno M, Naverrete V (2014) Which produces more Starch? A shade plant or a sun plant?
- Nash TH (ed) (2002) Lichen flora of the greater Sonoran Desert region. *Lichens unlimited*, Arizona State University, Tempe, Arizona, United States
- Nedbalová L, Mihál M, Kvíderová J, Procházková L, ezanka T, Elster J (2017) Identity, ecology and ecophysiology of planktic green algae dominating in ice-covered lakes on James Ross Island (northeastern Antarctic Peninsula). *Extremophiles* 21:187–200
- Neuman Y (2006) Cryptobiosis: a new theoretical perspective. *Prog Biophys Mol Biol* 92:258–267
- Nguyen K-H, Chollet-Krugler M, Gouault N, Tomasi S (2013) UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Nat Prod Rep* 30:1490–1508
- Nicholls DG, Ferguson SJ (2002) *Bioenergetics* 3, 3rd ed. Academic Press, San Diego, California, United States
- Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N (2011) Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiol Plant* 142:35–46
- Nitschke U, Stengel DB (2014) Iodine contributes to osmotic acclimatisation in the kelp *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Planta* 239:521–530. doi: 10.1007/s00425-013-1992-z
- Niyogi KK (2000) Safety valves for photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 3:455–460. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00113-8
- Niyogi KK, Bjorkman O, Grossman AR (1997) *Chlamydomonas xanthophyll* cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching. *Plant Cell* 9:1369–1380
- Niyogi KK, Truong TB (2013) Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. *Physiol Metab* 16:307–314. doi: 10.1016/j.pbi.2013.03.011
- Nozaki H, Maruyama S, Matsuzaki M, Nakada T, Kato S, Misawa K (2009) Phylogenetic positions of Glaucophyta, green plants (Archaeplastida) and Haptophyta (Chromalveolata) as deduced from slowly evolving nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol* 53:872–880. doi: 10.1016/j.ympev.2009.08.015
- O'Brien PJ (2000) Peroxidases. *Chem Biol Interact* 129:113–139

- Ohad I, Berg A, Berkowicz SM, Kaplan A, Keren N (2011) Photoinactivation of photosystem II: is there more than one way to skin a cat? *Physiol Plant* 142:79–86. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01466.x
- Oliver MJ, Tuba Z, Mishler BD (2000) The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecol* 151:85–100
- Omar H. (2002) Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. *Int Biodeterior Biodegrad* 50:95–100. doi: 10.1016/S0964-8305(02)00048-3
- Öquist G, Anderson JM, McCaffery S, Chow W (1992) Mechanistic differences in photoinhibition of sun and shade plants. *Planta* 188:422–431
- Ott S, Ders UE, Jahns H (1997) Vegetation of the rock-alvar of Gotland. II. Microclimate of lichen-rich habitats. *Nova Hedwig* 64:87–102
- Ott S, Elders U, Jahns H (1996) Vegetation of the rock-alvar of Gotland. I. Microhabitats and succession. *Nova Hedwig* 63:433–470
- Pampurova S, Van Dijck P (2014) The desiccation tolerant secrets of *Selaginella lepidophylla*: What we have learned so far? *Plant Physiol Biochem* 80:285–290
- Pascal AA, Liu Z, Broess K, van Oort B, van Amerongen H, Wang C, Horton P, Robert B, Chang W, Ruban A (2005) Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting. *Nature* 436:134
- Paul C, Pohnert G (2011) Production and role of volatile halogenated compounds from marine algae. *Nat Prod Rep* 28:186–195
- Peters S, Mundree SG, Thomson JA, Farrant JM, Keller F (2007) Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. *J Exp Bot* 58:1947–1956
- Phinney NH, Solhaug KA, Gauslaa Y (2018) Rapid resurrection of chlorolichens in humid air: specific thallus mass drives rehydration and reactivation kinetics. *Environ Exp Bot* 148:184–191. doi: 10.1016/j.envexpbot.2018.01.009
- Pinnola A, Dall'Osto L, Gerotto C, Morosinotto T, Bassi R, Alboresi A (2013) Zeaxanthin binds to light-harvesting complex stress-related protein to enhance nonphotochemical Quenching in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 25:3519. doi: 10.1105/tpc.113.114538
- Popper ZA, Michel G, Hervé C, Domozych DS, Willets WGT, Tuohy MG, Kloareg B, Stengel DB (2011) Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annu Rev Plant Biol* 62:567–590
- Potts M (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* 58:755–805
- Potts M (2001) Desiccation tolerance: a simple process? *Trends Microbiol* 9:553–559. doi: 10.1016/S0966-842X(01)02231-4
- Potts M, Slaughter SM, Hunneke F-U, Garst JF, Helm RF (2005) Desiccation tolerance of prokaryotes: application of principles to human cells. *Integr Comp Biol* 45:800–809
- Proctor MCF (2010) Recovery rates of chlorophyll-fluorescence parameters in desiccation-tolerant plants: fitted logistic curves as a versatile and robust source of comparative data. *Plant Growth Regul* 62:233–240. doi: 10.1007/s10725-010-9456-y
- Proctor MCF, Oliver MJ, Wood AJ, Alpert P, Stark LR, Cleavitt NL, Mishler BD (2007) Desiccation-tolerance in bryophytes: a review. *The Bryologist* 110:595–621. doi: 10.1639/0007-2745(2007)110[595:DI-BAR]2.0.CO;2
- Raanan H, Oren N, Treves H, Keren N, Ohad I, Berkowicz SM, Hagemann M, Koch M, Shotland Y, Kaplan A (2016) Towards clarifying what distinguishes cyanobacteria able to resurrect after desiccation from those that cannot: the photosynthetic aspect. *Biochim Biophys Acta BBA-Bioenerg* 1857:715–722
- Regelsberger G, Jakopitsch C, Plasser L (2003), Hydroperoxidases in oxygenic phototrophic organelles and organisms: A comparison of chloroplasts and cyanobacteria. In: *Plant Peroxidases*, Acosta M, Rodriguez-Lopez JN, Pedrefio MA eds, University of Murcia, Murcia, Spain pp 77–85
- Reichert D, Gröger S, Hackel C (2017) New insights into the interaction of proteins and disaccharides—The effect of pH and concentration. *Biopolymers* 107:39–45
- Richardson DH (1975) Vanishing lichens: Their history, biology and importance. David & Charles, Exeter, Devon, United Kingdom
- Roach T, Krieger-Liszkay A (2012) The role of the PsbS protein in the protection of photosystems I and II against high light in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg* 1817:2158–2165. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.09.011
- Robert B (ed) (2016) *Artificial Photosynthesis*. Elsevier Science, New York City, United States
- Ruban AV (2016) Nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching: Mechanism and effectiveness in protecting plants from photodamage. *Plant Physiol* 170:1903. doi: 10.1104/pp.15.01935
- Ruban AV, Berera R, Illoaia C, van Stokkum IHM, Kennis JTM, Pascal AA, van Amerongen H, Robert B, Horton P, van Grondelle R (2007) Identification of a mechanism of photoprotective energy

- dissipation in higher plants. *Nature* 450:575
- Ruban AV, Johnson MP, Duffy CDP (2012) The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Photosyst II* 1817:167–181. doi: 10.1016/j.bbabi.2011.04.007
- Ruhfel BR, Gitzendanner MA, Soltis PS, Soltis DE, Burleigh JG (2014) From algae to angiosperms—inferring the phylogeny of green plants (Viridiplantae) from 360 plastid genomes. *BMC Evol Biol* 14:23
- Saha SK, Moane S, Murray P (2013) Effect of macro- and micro-nutrient limitation on superoxide dismutase activities and carotenoid levels in microalga *Dunaliella salina* CCAP 19/18. *Bioreour Technol* 147:23–28. doi: 10.1016/j.biortech.2013.08.022
- Santabarbara S, Neverov K, Garlaschi F, Zucchelli G, Jennings RC (2001) Involvement of uncoupled antenna chlorophylls in photoinhibition in thylakoids. *FEBS Lett* 491:109–113
- Sass L, Spetea C, Máté Z, Nagy F, Vass I (1997) Repair of UV-B induced damage of Photosystem II via de novo synthesis of the D1 and D2 reaction centre subunits in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth Res* 54:55–62
- Scherhag R, Blüthgen J, Lauer W (1977) *Klimatologie*, 9., verb. Aufl. Westermann, Braunschweig, Germany
- Schobert B (1977) Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants? *J Theor Biol* 68:17–26
- Schörle A (2017) Regulation von Photosystem II bei osmotischem Stress in *Trebouxia asymmetrica* und *Chlorella vulgaris*. Bachelorarbeit, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Germany
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* 10:51–62
- Schwoerbel J, Brendelberger H (2013) *Einführung in die Limnologie*, 10. Auflage. Springer Spektrum, Berlin Heidelberg
- Singh S, Ambastha V, Levine A, Sopory SK, Yadava PK, Tripathy BC, Tiwari BS (2015) Anhydrobiosis and programmed cell death in plants: commonalities and differences. *Curr Plant Biol* 2:12–20
- Šklubalov Z, Zatloukal Z (2010) The relationship between osmolality and osmolality of infusion solutions of monosaccharides. *J Pharm Sci Res* 2:545–8
- Slavov C, Reus M, Holzwarth AR (2013) Two different mechanisms cooperate in the desiccation-induced excited state quenching in *Parmelia* lichen. *J Phys Chem B* 117:11326–11336. doi: 10.1021/jp402881f
- Solhaug KA, Gauslaa Y (2001) Acetone rinsing—a method for testing ecological and physiological roles of secondary compounds in living lichens. *Symbiosis-Rehovot* 30:301–316
- Solhaug KA, Larsson P, Gauslaa Y (2010) Light screening in lichen cortices can be quantified by chlorophyll fluorescence techniques for both reflecting and absorbing pigments. *Planta* 231:1003–1011. doi: 10.1007/s00425-010-1103-3
- Solhaug KA, Lind M, Nybakken L, Gauslaa Y (2009) Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia physodes*. *Flora - Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 204:40–48. doi: 10.1016/j.flora.2007.12.002
- Solovchenko AE, Merzlyak MN (2008) Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants. *Russ J Plant Physiol* 55:719. doi: 10.1134/S1021443708060010
- Sorokin C, Krauss RW (1958) The Effects of light intensity on the growth rates of green algae. *Plant Physiol* 33:109
- Sperry JS (2003) Evolution of water transport and xylem structure. *Int J Plant Sci* 164:S115–S127
- Starr RC, Zeikus JA (1993) UTEX—the culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 list of cultures. *J Phycol* 29:1–106
- Stitt M, Hurry V (2002) A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* 5:199–206
- Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Qiang S, Goltsev V (2010) Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. 16th Eur Bioenerg Conf 2010 1797:1313–1326. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.03.008
- Streng W, Huber H, Carstensen J (1978) Relationship between osmolality and osmolarity. *J Pharm Sci* 67:384–386
- Strimbeck GR, Schaberg PG, Fossdal CG, Schröder WP, Kjellsen TD (2015) Extreme low temperature tolerance in woody plants. *Front Plant Sci* 6:884
- Stuhlfauth T, Scheuermann R, Fock HP (1990) Light energy dissipation under water stress conditions: contribution of reassimilation and evidence for additional processes. *Plant Physiol* 92:1053–1061
- Sun L, Fang L, Zhang Z, Chang X, Penny D, Zhong B (2016) Chloroplast phylogenomic inference of green algae relationships. *Sci Rep* 6:20528. doi: 10.1038/srep20528
- Szilard A, Sass L, Hideg E, Vass I (2005) Photoinactivation of photosystem II by flashing light. *Photosynth Res* 84:15–20

- Takahashi S, Milward SE, Yamori W, Evans JR, Hillier W, Badger MR (2010) The solar action spectrum of photosystem II damage. *Plant Physiol.* doi: 10.1104/pp.110.155747
- Treves H, Raanan H, Kedem I, Murik O, Keren N, Zer H, Berkowicz SM, Norici A, Shotland Y, Ohad I, Kaplan A (2016) The mechanisms whereby the green alga *Chlorella ohadii*, isolated from desert soil crust, exhibits unparalleled photodamage resistance. *New Phytol* 210:1229–1243. doi: 10.1111/nph.13870
- Tschermak-Woess E (1978) *Myrmecia reticulata* as a phycobiont and free-living Trebouxia – the problem of *Stenocybe septata*. *The Lichenologist* 10:69–79
- Tunnacliffe A, de Castro AG, Manzanera M (2001) Anhydrobiotic engineering of bacterial and mammalian cells: is intracellular trehalose sufficient? *Cryobiology* 43:124–132
- Tyystjärvi E (2008) Photoinhibition of Photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Role Manganese Photosyst II* 252:361–376. doi: 10.1016/j.ccr.2007.08.021
- Tyystjärvi E, King N, Hakala M, Aro E-M (1999) Artificial quenchers of chlorophyll fluorescence do not protect against photoinhibition. *J Photochem Photobiol B* 48:142–147
- Van Pée K-H (1996) Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50:375–399
- Van Peè K-H (2001) Microbial biosynthesis of halo-metabolites. *Arch Microbiol* 175:250–258
- Vass I (2011) Role of charge recombination processes in photodamage and photoprotection of the photosystem II complex. *Physiol Plant* 142:6–16. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01454.x
- Vass I, Cser K (2009) Janus-faced charge recombinations in photosystem II photoinhibition. *Trends Plant Sci* 14:200–205
- Vass I, Styring S, Hundal T, Koivuniemi A, Aro E, Anderson B (1992) Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced  $Q_A$  species promote chlorophyll triplet formation. *Proc Natl Acad Sci* 89:1408–1412
- Veerman J, Vasil'ev S, Paton GD, Ramanauskas J, Bruce D (2007) Photoprotection in the lichen *Parmelia sulcata*: the origins of desiccation-induced fluorescence quenching. *Plant Physiol* 145:997. doi: 10.1104/pp.107.106872
- Venturi S, Donati FM, Venturi A, Venturi M (2000) Environmental iodine deficiency: A challenge to the evolution of terrestrial life? *Thyroid* 10:727–729
- Verhoeven A, García-Plazaola JI, Fernández-Marín B (2017a) Shared mechanisms of photoprotection in photosynthetic organisms tolerant to desiccation or to low temperature. *Environ Exp Bot.* doi: 10.1016/j.envexpbot.2017.09.012
- Verhoeven A, García-Plazaola JI, Fernández-Marín B (2017b) Shared mechanisms of photoprotection in photosynthetic organisms tolerant to desiccation or to low temperature. *Environ Exp Bot.* doi: 10.1016/j.envexpbot.2017.09.012
- Vertucci CW, Farrant JM (1995) Acquisition and loss of desiccation tolerance. *Seed Dev Germination* 237–271
- Volland S, Bayer E, Baumgartner V, Andosch A, Lütz C, Sima E, Lütz-Meindl U (2014) Rescue of heavy metal effects on cell physiology of the algal model system *Micrasterias* by divalent ions. *J Plant Physiol* 171:154–163. doi: 10.1016/j.jplph.2013.10.002
- Wagner C, Molitor IM, König GM (2008) Critical view on the monochlorodimedone assay utilized to detect haloperoxidase activity. *Phytochemistry* 69:323–332
- Wahidin S, Idris A, Shaleh SRM (2013) The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresour Technol* 129:7–11
- Wang H, Jin JY (2005) Photosynthetic rate, chlorophyll fluorescence parameters, and lipid peroxidation of maize leaves as affected by zinc deficiency. *Photosynthetica* 43:591–596. doi: 10.1007/s11099-005-0092-0
- Weronika E, Łukasz K (2017) Tardigrades in space research-past and future. *Orig Life Evol Biospheres* 47:545–553
- Wieners PC, Mudimu O, Bilger W (2012) Desiccation-induced non-radiative dissipation in isolated green lichen algae. *Photosynth Res* 113:239–247. doi: 10.1007/s11120-012-9771-4
- Wieners PC, Bilger W, Gauslaa Y (2018a) Carbon-based secondary compounds in the lichen *Hypogymnia physodes* deter detritivorous woodlice. *Fungal Ecol* 31:54–58. doi: 10.1016/j.funeco.2017.11.002
- Wieners PC, Mudimu O, Bilger W (2018b) Survey of the occurrence of desiccation-induced quenching of basal fluorescence in 28 species of green microalgae. *Planta*. doi: 10.1007/s00425-018-2925-7
- Willert DJ von, Matyssek R, Herppich W (1995) *Experimentelle Pflanzenökologie: Grundlagen und Anwendungen ; 33 Tabellen.* Thieme, Stuttgart
- Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:1517–1529
- Wink M (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64:3–19
- Winter JM, Moore BS (2009) Exploring the chemistry and biology of vanadium-dependent haloperoxi-



- 
- dases. *J Biol Chem* 284:18577–18581
- Wood AJ (2007) The nature and distribution of vegetative desiccation-tolerance in hornworts, liverworts and mosses. *The Bryologist* 110:163–177. doi: 10.1639/0007-2745(2007)110[163:IEFI-B]2.0.CO;2
- Wright JC (2001) Cryptobiosis 300 years on from van Leeuwenhoek: what have we learned about tardigrades? *Zool Anz- J Comp Zool* 240:563–582
- Wuthirak T, Kongnual R, Buapet P (2016) Desiccation tolerance and underlying mechanisms for the recovery of the photosynthetic efficiency in the tropical intertidal seagrasses *Halophila ovalis* and *Thalassia hemprichii*. *Bot Mar* 59:387–396
- Xiong L, Zhu J (2002) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ* 25:131–139
- Yamakawa H, Fukushima Y, Itoh S, Heber U (2012) Three different mechanisms of energy dissipation of a desiccation-tolerant moss serve one common purpose: to protect reaction centres against photo-oxidation. *J Exp Bot* 63:3765–3775
- Yamakawa H, van Stokkum IHM, Heber U, Itoh S (2018) Mechanisms of drought-induced dissipation of excitation energy in sun- and shade-adapted drought-tolerant mosses studied by fluorescence yield change and global and target analysis of fluorescence decay kinetics. *Photosynth Res* 135:285–298. doi: 10.1007/s11120-017-0465-9
- Yamamoto HY, Kamite L (1972) The effects of dithiothreitol on violaxanthin de-epoxidation and absorbance changes in the 500-nm region. *Biochim Biophys Acta BBA-Bioenerg* 267:538–543
- Yamori W, Shikanai T (2016) Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth. *Annu Rev Plant Biol* 67:81–106
- Yanykin D., Khorobrykh AA, Mamedov MD, Klimov VV (2016) Trehalose protects Mn-depleted photosystem II preparations against the donor-side photoinhibition. *J Photochem Photobiol B* 164:236–243. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.09.027
- Zatloukal Z (2009) Conversion between osmolality and osmolarity of infusion solutions. *Sci Pharm* 77:817–826
- Zavitsas AA (2001) Properties of water solutions of electrolytes and nonelectrolytes. *J Phys Chem B* 105:7805–7817
- Zhu J-K (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* 6:66–71. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01838-0
- Zwiazek JJ, Renault S, Croser C, Hansen J, Beck E (2001) Biochemical and biophysical changes in relation to cold hardiness. In: *Conifer cold hardiness*. Springer, pp 165–186

## 7. Zusammenfassung / Abstract

### Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die austrocknungsinduzierte Chlorophyllfluoreszenzlöschung ( $q_{des}$ ) bei aeroterrestrischen Grünalgen untersucht. Es wurden Verfahren entwickelt um  $q_{des}$  vergleichbar zu messen. Es wurde gezeigt, dass  $q_{des}$  eine Schutzfunktion gegen Photoinhibition zukommt und dass es sich dabei um einen bei aeroterrestrischen Algen weit verbreitetes Phänomen handelt.  $q_{des}$  kann durch die Lichtbedingungen während Kultur und Austrocknung, Arabitol, Jod und Zink sowie den Einsatz von Nigericin, einem Protonophor, und DDT, einem Inhibitor für die Violaxanthindeepoxidase, manipuliert werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass  $q_{des}$  mehrere verschiedene Mechanismen zugrunde liegen, von denen einige vom Xanthophyll-Zyklus unabhängig sind. Auch wenn es Ähnlichkeiten zwischen osmotischem Stress und Austrocknung an der Luft gibt, so unterscheidet sich das Verhalten der Chlorophyllfluoreszenz bei den untersuchten Algen deutlich zwischen diesen beiden abiotischen Stressfaktoren.

### Abstract

Objective of this doctoral thesis was to examine the desiccation-induced quenching of chlorophyll fluorescence ( $q_{des}$ ) of aero-terrestrial green algae. Methods have been developed to comparably measure  $q_{des}$ . It has been demonstrated that  $q_{des}$  is attached to a protective function against photo inhibition and this being a widespread phenomenon among aero-terrestrial algae.  $q_{des}$  can be manipulated by the light conditions during culture and desiccation, by arbutol, iodine and zinc as well as by the use of nigericin, a protonophor, and DDT, an inhibitor for violaxanthin deepoxidase. The results suggest that  $q_{des}$  is based on various different mechanisms some of them being independent from the xanthophyll cycle. Although similarities existing between osmotic stress and desiccation in open air the behaviour of chlorophyll fluorescence of the examined algae is significantly differing between these two abiotic stress factors.

---

## 8. Anhang: Weitere im Rahmen der Promotion durchgeführte Forschungsarbeiten

Über das das eigentliche Thema dieser Promotion Die Rolle der durch Austrocknung induzierten Grundfluoreszenzlöschung als Lichtschutzmechanismus in Grünalgen hinausgehend fanden auch weitere Forschungsarbeiten statt, deren Ergebnisse zum besseren Verständnis von Mikroalgen, deren Ökologie und Physiologie, und der von Flechten als Holobiont, der auf mannigfaltige Weise mit seiner Umwelt interagiert, beitragen können. Diese Arbeiten seien an dieser Stelle in Kürze dargestellt:

### 8.1 Entwicklung mathematischer Modelle zu Quantifizierung der maximalen Wachstumsraten von Mikroalgen in Flüssigkultur

Die sehr dynamische und artspezifische Reaktion von Mikroalgen auf die Wachstumsbedingungen im Allgemeinen und das Zusammenspiel von Lichtintensität und der Verfügbarkeit von Nährstoffen im Besonderen war auch Gegenstand eines weiteren Projektes, das eher am Rande des eigentlichen Themas dieser Arbeit stattfand.

Nichtsdestoweniger kann die Arbeit von Göthlich et al. (liegt als Manuskript vor) auch in Bezug zu den von mir durchgeführten Kulturexperimenten gesehen werden:

Es ging darum, das Wachstum von Mikroalgen unter verschiedenen Kulturbedingungen zu erfassen, um es dann mit mathematischen Modellen simulieren zu können (Greenwell et al. 2009). Dies ist insbesondere für die Planung und den Betrieb von biotechnologischen Anlagen zur Produktion von Mikroalgen bzw. deren Inhaltsstoffen

von Bedeutung, aber bietet natürlich auch neue Einsichten in die Ökologie dieser Organismen unter natürlichen Bedingungen, etwa was das Konkurrenzverhalten verschiedener Arten untereinander und ihre jeweiligen ökologischen Nischen mit ihren verschiedenen biotischen und abiotischen Faktoren angeht. Dazu war es unter anderem nötig, die tatsächlichen maximalen Wachstumsraten der untersuchten Algen (*M. salina*) zu messen. Dies bot die Gelegenheit, das Spektrum der Wachstumsbedingungen unter denen *M. salina* im Rahmen der dieser Dissertation zugrundeliegenden Experimente untersucht wurde, zu erweitern. So konnte etwa das Ergebnis, dass man *M. salina* ohne Zweifel als eine „Sonnen-Alge“ bezeichnen kann, auf diese Weise unabhängig vom experimentellen Aufbau verifiziert werden.

Der wichtigste Aspekt dieser Zusammenarbeit aber war wohl ohne Zweifel die Entwicklung eines mathematisch tragfähigen Ansatzes zur genauen Bestimmung der tatsächlichen maximalen Wachstumsrate zu jedem Zeitpunkt eines Kulturexperimentes, sowie die Optimierung des Kulturexperimentes selbst. Ohne diese wären eine präzise Bestimmung der maximalen Wachstumsraten unter verschiedenen Kulturbedingungen nicht möglich gewesen.

## 8.2 Fraßschutz-Wirkung sekundärer Flechteninhaltsstoffe bei *Hypogymnia physodes*

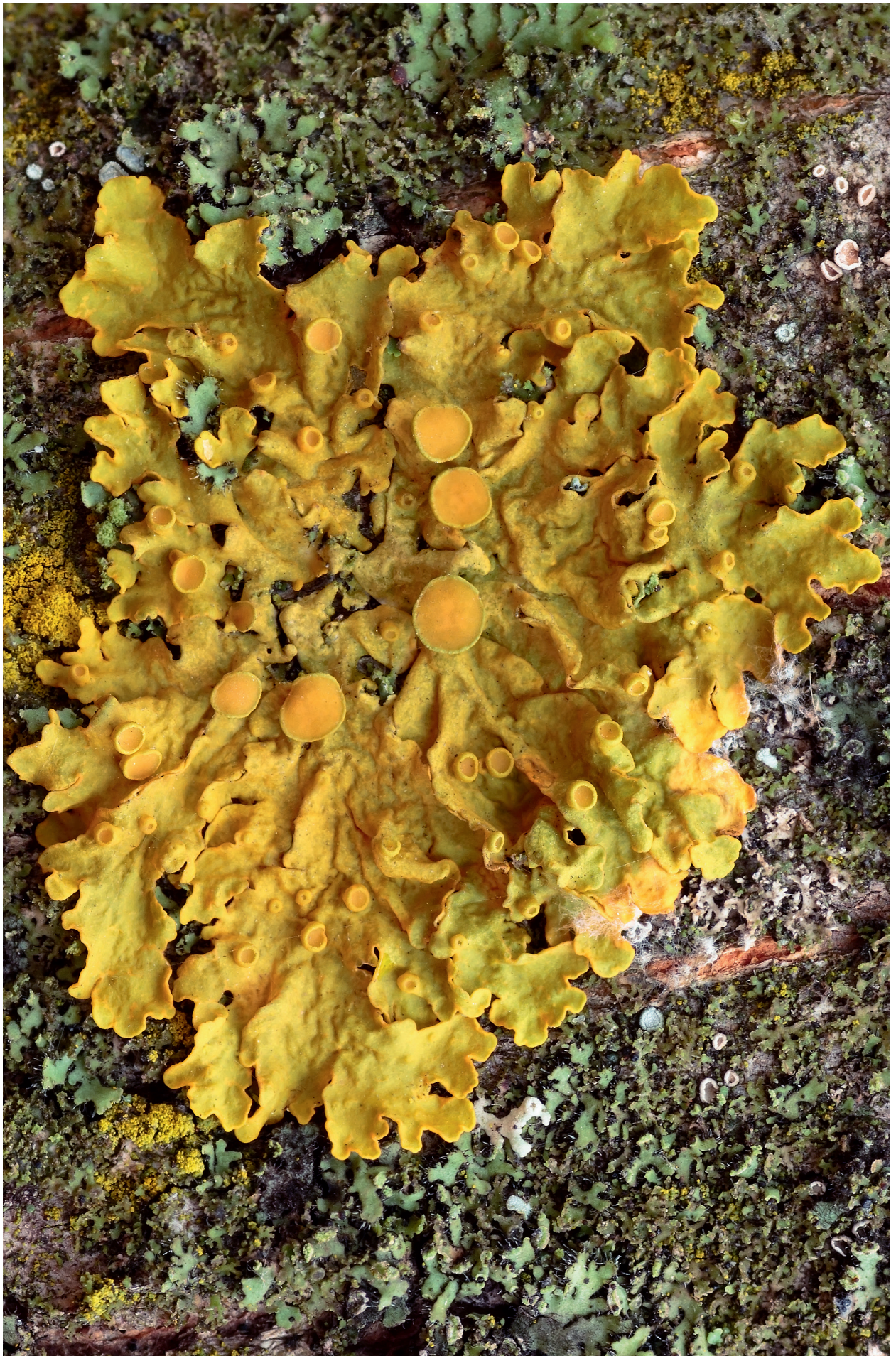
Im Rahmen dieser Arbeit wurden vorrangig isolierte Photobionten untersucht. Dafür sprachen vor allem praktische Gründe, wie bereits an anderer Stelle ausführlich dargelegt worden ist. Natürlich ist ein solches Vorgehen ausgesprochen artifiziell, da eine Flechte in ihrer Summe mehr ist als nur Alge und Pilz. Viele der sekundären Flechteninhaltsstoffe werden nur im Rahmen der Flechtensymbiose gebildet (Molnár 2014), denen bei einem intakten Flechtenthallus neben zahlreichen anderen Funktionen auch eine wichtige Rolle beim Schutz der Algen vor Sonnenstrahlung (im sichtbaren wie im UV-Bereich) zukommt (Gauslaa and McEvoy 2005; McEvoy et al. 2006; Nguyen et al. 2013).

Diese auf Kohlenstoff basierenden sekundären Flechteninhaltsstoffe (carbon based secondary compounds, kurz CBSCs) werden extrazellulär in den Flechtenthallus, genauer, den oberen Cortex eingelagert, was es erlaubt, diese zerstörungsfrei mit Aceton herauszuwaschen, solange sich die Flechte dabei in Kryptobiose befindet, was einzigartige experimentelle Herangehensweisen erlaubt. Warum die Flechte im Zustand der Kryptobiose nicht vom Aceton geschädigt wird, ist nicht vollständig geklärt, wahrscheinlich ist Aceton nicht in der Lage die Zellwände zu durchdringen, solange die Flechte ausgetrocknet ist, aber dieses Phänomen ist sehr gut belegt (Solhaug and Gauslaa 2001; Carniel et al. 2017).

CBSCs haben für die Flechte aber noch andere Funktionen als den Schutz vor UV-Strahlung (Solhaug et al. 2009): Im Rahmen einer Unterrichtsveranstaltung wurde über Jahre hinweg von den Studierenden

ein Experiment durchgeführt, bei dem die Wirkung einer Behandlung von Thallus-Stücken von *Hypogymnia physodes* mit Aceton auf das Fressverhalten von *Porcellio scaber* untersucht und ausgewertet wurde. Ausgehend von diesem experimentellen Ansatz wurde dann die Rolle von CBSCs als potentielle Fraßschutz-Substanzen näher betrachtet. Dabei zeigte sich, dass es eine sehr gute negative Korrelation zwischen dem Gehalt an CBSCs im Flechtenthallus und dem Fraß von *P. scaber* an diesen Flechten gibt, was eine Fraßschutzfunktion dieser Substanzen nahelegt (Wieners et al. 2018a).

Es ist bei sekundären Metaboliten nicht ungewöhnlich, dass ein und dieselbe Substanz gleichzeitig verschiedene Funktionen für einen Organismus haben kann (Wink 2003). Dabei ist es nicht immer einfach zu beurteilen, wie wichtig eine bestimmte Funktion, die ein sekundärer Metabolit theoretisch erfüllen könnte, dann auch konkret für diesen Organismus ist. So kommt etwa Carotinoiden oftmals eine wichtige Rolle als Lichtschutzpigmenten zu, aber diese Funktion ist bei farbigen Blütenblättern sicherlich im Vergleich zur Schaufunktion für Bestäuber nur wenig relevant. Da aber Fraß durch Arthropoden und andere Tiere für Flechten unter natürlichen Umständen ein wesentlicher biotischer Umweltfaktor ist (Richardson 1975; Gerson and Seaward 1977; Gauslaa 2005; Pöykkö et al. 2005; Nybakken et al. 2010), dürfte die Fraßschutzwirkung von CBSCs auch im Freiland von erheblicher ökologischer Bedeutung für *H. physodes* sein. Da CBSCs bei Flechten weit verbreitet sind (Asplund and Wardle 2013), ist es wahrscheinlich, dass diese Ergebnisse auch auf andere Arten von Flechten, wie Herbivoren, übertragen werden können.



*Xanthoria parietina*

## Modelling lipid production in *Microchloropsis salina*

Lena Göthlich\*, Paul Christian Wieners\*\*, Markus Pahlow\*\*\*,

(liegt als Manuskript vor)

### 1 Introduction

Microalgae are increasingly in the focus of both science and industry for the production of biomass for e.g. biofuels or aquaculture feed, or for extracting valuable substances such as carotenes, vitamins and omega-3 fatty acids. Microalgae do not require arable land and significantly less fresh water than land plants, particularly if marine species are used. And annual areal oil yields are 14210 times that of palm oil (Mata et al., 2010). Yet microalgae cultivation on a commercial scale still faces considerable challenges, primarily achieving long-term culture stability and nancial viability (Brennan and Owende, 2010; Williams and Laurens, 2010).

In the current study, the algal species *Microchloropsis salina* (Fawley et al., 2015, formerly *Nannochloropsis salina*) is investigated. It is known for a high content of the essential fatty acid eicosapentaenoic acid (EPA), which is used as both a human food supplement and an important ingredient in aquaculture feed (Leu and Boussiba, 2014). Furthermore, *N. salina* contains

high amounts of neutral lipids (triacylglycerol, TAG), which can serve as a basis for bio-diesel. Other algae generally produce starch and related compounds as basic energy resources and only switch to lipid production under stress (Vitova et al., 2015; Hu et al., 2008). This means that high lipid content commonly concurs with very low growth rates. In contrast with other groups, Eustigmatophytes such as *Microchloropsis* are unable to produce polyglucans in the first place (Hildebrand et al., 2013), hence their lipid content is always comparatively high, even under non-stress conditions.

This makes them a promising candidate for microalgal biofuel production, although there is considerable doubt as to whether microalgal biofuels can be commercially viable and energetically sustainable (Kenny and Flynn, 2017). To date, commercially viable algae production facilities are those that produce low-volume high-value products such as pigments. Yet a combined production of high-value products such as protein for livestock feed with bulk chemicals such as biofuel appears attainable (Williams and

\* Plant Cell Physiology and Biotechnology, Botanical Institute and Botanical Garden at Christian Albrechts University Kiel, Am Botanischen Garten 5, 24118 Kiel, Germany  
l.goethlich@bot.uni-kiel.de, Tel. 0431 880-5275

\*\* Ecophysiology of Plants, Botanical Institute and Botanical Garden at Christian Albrechts University Kiel, Am Botanischen Garten 5, 24118 Kiel, Germany

\*\*\* Biogeochemical Modelling, RD Biogeochemistry at GEOMAR Helmholtz Centre for Ocean Research Kiel, Düsternbrooker Weg 20, 24105 Kiel, Germany

---

Laurens, 2010). Since *M. salina* also produces even more valuable pigments such as violaxanthin and vaucheraxanthin, a suitable combination of products could probably be found.

Optimal conditions for high yield and stability of the respective algae cultures are frequently determined in purely experimental studies. A hitherto underused resource in advancing microalgae biotechnology (Greenwell et al., 2010) are numerical models of microalgae cultivation systems. Particularly for achieving stable high-yield lipid production, in-depth understanding of lipid synthesis in microalgae is essential. Lipid synthesis in *M. salina*, particularly of triacylglycerol (TAG), increases considerably under stress conditions such as nitrogen deprivation. While the cellular adaptations at the onset of increased TAG synthesis following N starvation have recently been identified (Simionato et al., 2013), the physiological and ecological benefits of TAG accumulation are still unclear.

This study aims to

(1) understand the mechanisms behind lipid production in the marine heterokont *M. salina*, and for this purpose we construct a mechanistic model of lipid synthesis in *M. salina*, and to

(2) provide an optimality-based adaptive model that can be used in microalgae cultivation. Our model is based on the optimality-based model of phytoplankton growth by Pahlow et al. (Pahlow et al., 2013). Optimality-based models simulate the adaptive behaviour of microalgae under varying conditions as opposed to using fixed parameters. Since culture conditions particularly in open raceway ponds are constantly varying, a useful model need to be accordingly flexible.

Compared to standard mechanistic models, optimality-based models have been shown to fit various data sets better, while having fewer parameters to be adjusted (Smith et al., 2011), which suggests a high degree of predictive ability.

The present model's basic assumption is that all biomass is active and fuels cellular processes, i.e. that the velocity of biochemical processes is proportional to the respective cellular compartment. E.g. nitrogen (in enzymes in the chloroplast) fuels carbon fixation, and growth is proportional to cellular carbon content. However, accumulated TAG in microalgae does not contribute to growth and thus the model cannot accurately simulate the growth of *M. salina* or related species that accumulate large amounts of lipids. In consequence, the original model requires a separate lipid compartment, which is developed in the current study.

Subsequently, the model could be used for:

(1) Increase of the range of conditions to which the (model) algae are exposed and narrow down the range of promising conditions to be employed in laboratory experiments: High productivity, particularly in outdoor cultivation, requires initial experiments to determine optimal growth parameters for given external conditions such as natural light and temperature. Such experiments can be greatly reduced or even avoided by the use of a mechanistic adaptive model of microalgae growth (Kenny and Flynn, 2015).

(2) Support for the process of upscaling to larger/outdoor cultures, which commonly presents a major bottleneck in algae cultivation. Commonly, algae used for open pond cultures are species that grow in environments in which most contaminating or-

---

ganisms cannot survive, such as *Spirulina* and *Dunaliella salina*, which grow in highly alkaline and highly saline water, respectively. Neither of these species is suitable for lipid production, for which *Microchloropsis salina* is a promising candidate: its lipid content can reach 70% of dry weight and it produces significant amounts of lipids also under non-stress conditions (Homann et al., 2010). Since *M. salina* does not grow under harsh conditions that impair contamination, other means to achieve culture stability are needed. Most algae cultivation systems operate with excess nutrients, thereby excluding nutrient limitation but also increasing the risk of contamination by creating favourable conditions for undesired competing algae. Stability may hence be increased by reducing nutrient load. This in turn requires precise control of nutrient input, which can be achieved by an adaptive system of automated process control, such as those commonly used in cultivation of heterotrophic cells for high productivity and stability (Frahm et al., 2003). Recently, Schaum et al. (Schaum et al., 2017) used the Droop (Droop, 1973) model to control *Chlorella sorokinana* biomass in a chemostat using a feedforward-feedback control strategy. The proposed model could serve as a basis for automated process control in microalgal lipid production

To construct and validate the model, sufficient data are necessary, which include measurements of dissolved nutrients, particular nitrogen and carbon as well as chlorophyll and lipid content. One such dataset was available (Homann, 2010), of *M. salina* in a turbidostat culture, i.e. in steady-state conditions. For the model to simulate the dynamic behaviour, a corresponding dataset was needed, and hence the respective

experiment conducted: *M. salina* was grown in batch culture under different light intensities for 25 days to gain insight into the dynamics of chlorophyll and lipid content as well as the basic growth parameters: Light intensities were chosen to approximate light limitation, light saturation and photo-inhibition (Simionato et al., 2011). Ambient temperature was 25° C, which has been shown to be optimal for lipid production in a closely related species, *N. oculata* (Converti et al., 2009).

Nitrogen limitation is known to increase lipid content in various microalgae including *Microchloropsis* (Rodol et al., 2009). Hence, in batch culture, lipid content is expected to increase once nutrients are depleted. Also, with higher light intensity, higher lipid content is expected due to higher rates of carbon-fixation. This assumes that part of the assimilated carbon is used as storage lipids, i.e. lipids serve as a carbon storage that, at the resupply of nitrogen, can be quickly accessed and assembled into cellular components such as proteins to re-establish growth, or degraded to fuel respiration (Flynn et al., 1993). Another possible benefit of TAG accumulation is that lipid synthesis might serve as an electron valve to alleviate the pressure of over-reduction downstream of photosystem II (Hu et al., 2008; Li et al., 2012; Marchin et al., 2017), under conditions where PS II activity is faster than carbonfixation, e.g., due to nitrogen shortage.

## 2 Experiment

The experiment was designed to compare growth and biomass composition at 3 different light intensities with 3 replicates each in a batch culture. 5 l-Schott bottles (DURAN GL 45 5000ml, DWK Life Sciences GmbH,



Wertheim, Germany) were filled with 3 l of F/2 medium (Guillard and Ryther, 1962; Guillard, 1975) in sterile filtered Baltic Sea water each (882  $\mu\text{mol N}^{-1}$  and 43  $\mu\text{mol P}^{-1}$ , all necessary chemicals were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and inoculated with 150 ml (5 % v=v) of a dense *M. salina* suspension that had been starved of nutrients for several weeks. The bottles were put on magnetic stirrers (set to 300 rpm) in a climate chamber (25° C, 90% humidity, 16/8 hour light/dark cycle) and continuously bubbled with ambient air (approx. 0:01m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>) through glass gas distribution tubes. Light intensities were 1410  $\mu\text{mol photons m}^{-2}$ , 280  $\mu\text{mol photons m}^{-2}$ , 90  $\mu\text{mol photons m}^{-2}$ , approximating photoinhibition, light saturation and light limitation, respectively. Cultures were grown for 25 days, with samples taken 3 times per week. The sampling process was conducted as follows: The bottles were gently stirred, opened under a clean bench, 100 ml taken from each bottle into pre-weighted 50ml Greiner sterile centrifuge tubes (Greiner-bio-one Cellstar 50 ml, Greiner GmbH, Kremsmünster, Austria) and another 15 ml into 15 ml Greiner sterile centrifuge tubes (Greiner-bio-one Cellstar 15 ml, Greiner GmbH, Kremsmünster, Austria) for pigment analysis. Subsequently, the tubes were centrifuged at 1774 g (4600 rpm) for 15 min (Beckmann Avanti J-2, Beckmann Coulter Cooperation, Brea, United States), the medium was decanted and part of it collected in a 15 ml sterile Greiner tube for analysis of dissolved nutrients. Then the tubes were partly refilled with distilled water, the contents of the two tubes per bottle were combined and centrifuged again at 1774 g for 12 min. The water was decanted, the tubes re-sealed, frozen at -20° C and later

freeze-dried.

Freeze-dried biomass was used for determining biomass (by weighing) and samples were taken for fatty acid analysis and C/N analysis. Fatty acids were extracted using a solvent mixture of chloroform / dichloromethane / methanol  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1:1 v/v/v) and esterified with toluene and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1%) in methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Content and composition was then determined from fatty acid methyl esters (FAME) via gas chromatography. C and N content was measured using a Eurovector EA3000 Elemental Analyser. The samples were combusted at 1000° C and the gaseous sample was separated over a GC column.

Dissolved inorganic nutrients were measured in a Seal Analytical AA3 segmented flow analyser (Seal Analytical Ltd., Southampton, GB).

For pigment analysis, samples were extracted with 30% (v/v) 30 mM Tris-buffer at pH 7.8, 70% (v/v) acetone and analysed via HPLC as described by Nichelmann et al. (Nichelmann et al., 2016).

### 3 Model

The optimality-based phytoplankton model by Pahlow et al. (Pahlow et al., 2013) is built on the assumption that algae allocate their internal resources in the form of nitrogen, phosphorus and carbon to maximise net growth rate. It was developed for marine phytoplankton using laboratory data of several marine algae.

All non-structural N, P and C in the original model are assumed to be part of active compounds that fuel or catalyse reactions. Therefore, an increased content of, e.g., N in a compartment is synonymous with increa-

Parameter	Unit	Turbidostat culture	Batch culture
light intensity	$\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-2}$	200	1410, 280, 90
medium	- - -	2 x f/2 in	f/2 in sterile filtered
		artificial sea water	Baltic Sea water
nitrate concentration	$\mu\text{molN}^{-1}$	75, 150, 300, 600, 1800	882
temperature	$^{\circ}\text{C}$	21	25
light/dark cycle	hours	24/0	16/8
biomass density	$\text{mg}^{-1}$	18	variable

Table 1: Experimental parameters.

sed potential metabolic rates in that compartment. Cellular C, N, P and chlorophyll dynamically adjust to ambient conditions so as to maximise growth rate  $\mu$ , which is defined as the difference between the rate of carbon fixation  $V^C$  and respiration  $R$ :

$$\mu = V^C - R \quad (1)$$

Carbonfixation is a function of light availability and internal N in the form of the nitrogen cell quota  $Q^N$ , i.e. the cellular N to C ratio (see Pahlow et al. (Pahlow et al., 2013) for details). Respiration  $R$  is fuelled by chlorophyll maintenance and nitrogen uptake:

$$R = R^{chl} + f^N V^N \quad (2)$$

where  $N$  is the cost of N acquisition. See table 2 for a list of the model's variables and parameters.

### 3.1 Modifications to include lipid synthesis

To include lipid synthesis and storage, lipids are introduced into the chain model as an inactive carbon compartment, so that total carbon  $C$  is comprised of active carbon  $C_a$  and lipid carbon  $C_L$ :

$$C = C_a + C_L \quad (3)$$

$C_L$  is the only model compartment that does not contribute to growth or any other process, it is purely a carbon storage compartment. Hence, growth is no longer proportional to total  $C$ , but to  $C_a$ . This changes Equation 1 to:

$$\mu = (\tilde{V}^C - \tilde{R}) (1 - QL) \quad (4)$$

where  $Q_L$  is the lipid quota  $C_L/C$  and tilde accents denote variables and parameters relative to active carbon  $C_a$ .

Table 2: Symbol denitions and units

	Symbol	Units	Definition
Parameters	$A_0$	$\text{m}^3 \text{mol}^{-1} \text{d}^{-1}$	potential nutrient anity
	$f^{Chl}$	$\text{m}^2 \text{E}^{-1} \text{mol gChl}^{-1}$	Chl-specific light absorption coecient
	$f^E, f^N$	$\text{mol gChl}^{-1}$	cost of photosynthesis coecient
	$Q_S^N, Q_S^P$	$\text{mol mol}^{-1}$	cost of DIN uptake
	$R_M^{Chl}$	$\text{mol mol}^{-1}$	subsistence N, P quota
	$V_0^C, V_0^N, V_0^P$	$\text{d}^{-1}$	cost of Chl maintenance
			$\text{mol mol}^{-1} \text{d}^{-1}$
Variables	$f_V$	---	fraction of QN allocated for nutrient acquisition
	$I$	$\text{E m}^{-2} \text{d}^{-1}$	irradiance
	$L_d$	---	day length as a fraction of 24 h
	$\mu$	$\text{d}^{-1}$	net growth rate
	$Q^N, Q^P$	$\text{mol mol}^{-1}$	N:C, P:C ratio (N, P quota)
	$Q^L$	$\text{mol mol}^{-1} \text{l}$	lipid quota
	$Q_S^N$	$\text{mol mol}^{-1}$	partial N quota bound in structural protein
	$R$	$\text{d}^{-1}$	respiration
	$R^{Chl}$	$\text{d}^{-1}$	cost of photosynthesis
	$S^I$	---	degree of light saturation
	$\theta, \hat{\theta}$	$\text{gChl mol}^{-1}$	whole-cell, chloroplast Chl:C ratio
	$V^C, V^N, V^P$	$\text{mol mol}^{-1} \text{d}^{-1}$	whole-cell C, N, P acquisition rates
	$V_{\max}^N, V_{\max}^P$	$\text{mol mol}^{-1} \text{d}^{-1}$	maximum N, P assimilation rates
	$V_T^N$	$\text{mol mol}^{-1} \text{d}^{-1}$	total N acquisition rate
	$\hat{V}^N, \hat{V}^P$	$\text{mol mol}^{-1} \text{d}^{-1}$	N, P uptake rates
	$\hat{V}_*^N, \hat{V}_*^P,$	$\text{mol mol}^{-1} \text{d}^{-1}$	potential N, P assimilation rates
	$\hat{V}_T^N$	$\text{mol mol}^{-1} \text{d}^{-1}$	local <sup>a</sup> total N acquisition rate

<sup>a</sup>relative to the respective compartment

The rate of lipid synthesis  $V^L$  is the fraction  $f_L$  of net carbon fixation  $V^C$  that is used as storage carbon in the lipid compartment:

$$V^L = V^C f_L \quad (5)$$

The rate of change of  $Q^L$  is:

$$Q^L = V^L / C - V^C / C \times Q^L = V^C / C \times (f_L - Q^L) = \mu \times (f_L - Q^L) \quad (6)$$

At steady state, a good fit can be achieved with:

$$f_L = Q^L_{max} (1 - Q^N / Q^N_{max}) \quad (7)$$

The introduction of storage carbon also changes all equations involving  $Q^N$ , because all assimilated nitrogen enters the active part of the cell, but part ( $Q^L$ ) of the assimilated carbon enters the storage lipid compartment and is hence not active. Consequently,  $\tilde{Q}^N$ , i.e. relative to active carbon, is calculated as:

$$\tilde{Q}^N = Q^N (1 - Q^L)^{-1} \quad (8)$$

This inclusion of a lipid compartment with no immediate use for the organism presents a deviation from the original model's basic assumption that every cellular compartment has a defined function that serves to optimise growth. Lipid storage does not optimise instantaneous growth but indeed reduces it, yet serves as an energy storage for future growth. This is a temporal separation between the compartmentalisation of resources and their eventual use, something which has not formerly been included in this model. It is also a classic mechanistic approach inside an otherwise optimality-based model.

Figure 1 shows a simplified sketch of the main model compartments and allocation pathways including the storage lipid part. Depending on light and nutritive conditions, resources are allocated: Under N replete, light limited conditions, chlorophyll is increa-

sed, and  $C^L$  storage (oil droplet in Figure 1) is very low. Within the nutrient uptake compartment, assimilation is increased at the expense of uptake sites. Under high light, N limiting conditions, C is stored in lipids, chlorophyll content is reduced and within the nutrient uptake compartment, uptake sites are increased at the expense of assimilation.

To simulate steady-state growth, a dataset of *M. salina* in a turbidostat was used (Homann, 2010; Homann et al., 2010). Cultures were kept in a photobioreactor at a constant biomass concentration (of  $0.18 \pm 0.02 \text{ mg}^{-1}$ ) owing to a feed-back loop that led to diluting the suspension of microorganisms with fresh medium if necessary. To assess the impact of nitrogen limitation on lipid production, different levels of nitrate concentrations were used in the media: 75, 150, 300, 600 and  $1800 \mu\text{molN L}^{-1}$ , respectively. Phosphate levels were  $90 \mu\text{molP L}^{-1}$  for all

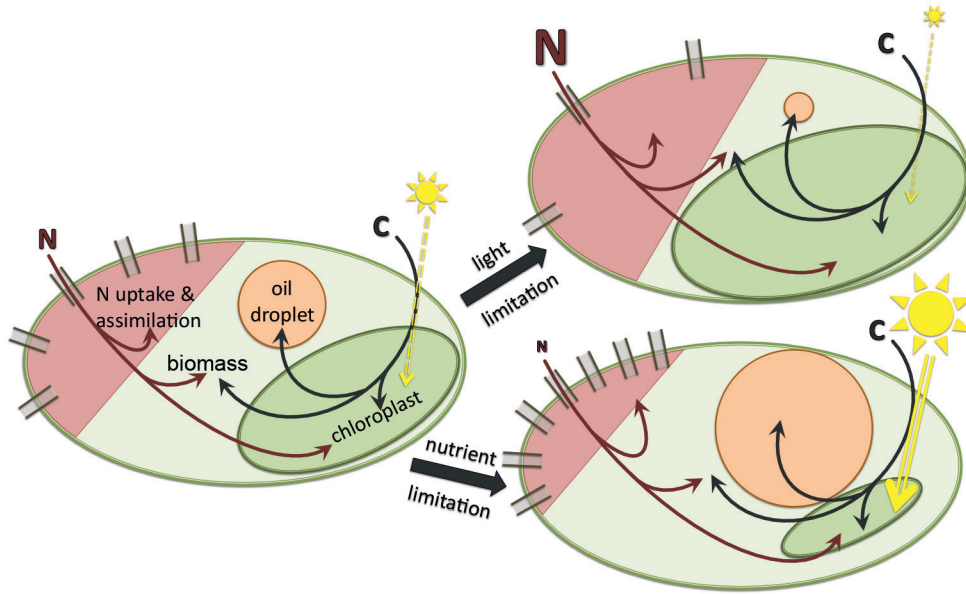


Figure 1: Alga in the Pahlow et al. (Pahlow et al., 2013) model (simplified). Nitrogen (N) and carbon (C) are allocated between cellular compartments: N uptake and assimilation (red, N only), active biomass (N and C), chloroplast (N and C) and oil droplet (C only, to be included). Resources are allocated according to ambient conditions: light limitation leads to chlorophyll increase (top right), nutrient limitation leads to oil increase (bottom right); P pathways omitted for clarity, for details see text.

treatments. Light intensity inside the cultures was continuously at 100 E, ambient temperature was 21° C. For further details see Homann et al. (Homann et al., 2010).

For model-data comparison, the following variables were used: N/C quota  $Q^N$ , biomass carbon C, chlorophyll to C ratio, lipid quota  $Q^L$ , nitrate  $\text{NO}_3$  (batch cultures only), and growth rate, (steady-state cultures only). The model was optimised for both datasets simultaneously, using the built-in MatLab function `fmincon` and pre-dened parameter ranges. Parameters used for optimisation are listed in Table 4, together with the parameter value resulting from the optimisation. Parameters were optimised with respect to the cost function dened as:

$$f_{\text{cost}} = \sum_{i=1}^m \left( \frac{\mathbf{x}_i - \hat{\mathbf{x}}_i}{w_{\mathbf{x}}} \right)^2 + \sum_{i=1}^n \left( \frac{\mathbf{y}_i - \hat{\mathbf{y}}_i}{w_{\mathbf{y}}} \right)^2, \quad \mathbf{x} \in [Q^N, C, \theta, Q^L, \text{NO}_3], \quad \mathbf{y} \in [Q^N, \mu, \theta, Q^L]$$

where  $\mathbf{x}$  and  $\mathbf{y}$  represent vectors of observations for the batch and steady-state cultures, respectively,  $\hat{\mathbf{x}}$  and  $\hat{\mathbf{y}}$  are corresponding model predictions,  $m$  is the number of sampling days in the batch-culture experiment,  $n$  the number of nitrate levels in the continuous-culture experiments,  $w_{\mathbf{x}}$  and  $w_{\mathbf{y}}$  are inverse weight-factors (Table 3), and the averaging was done over all data types.

For the steady-state simulations, the model was initially run to equilibrium without the lipid compartment. Subsequently, the lipid compartment was calculated according to Equation 7 as was the corresponding active carbon compartment, the model was then run to equilibrium again and these two steps repeated until the results converged. This typically took 5-6 recursions. The batch experiment data show clear signs of photoinhibition (see Figure 3d), i.e. POC is higher under medium light than under high light. The model does not

originally account for photoinhibition, so the maximum possible C fixation rate was lowered in the batch simulations from its original

value of 5 d<sup>-1</sup> to 0.8 d<sup>-1</sup> and 1.2 d<sup>-1</sup> for high light and medium light intensity, respectively.

Table 3: Weight factors for the cost function in Eq. (9).

$w_{QN} = 0.04$	$w_C = 4 \times 10^4$	$w_\theta = .06$	$w_{QL} = 1$	$w_{NO_3} = 400$	batch culture
$w_{QN} = 0.02$	$w_\mu = 0.1$	$w_\theta = 0.03$	$w_{QL} = 0.5$		steady-state cultures

Since the model was initialised with the initial conditions from the data and the model did not reach steady state, the initial conditions are expected to have a strong influence on the model results for the batch cultures. Hence, the corresponding residuals should carry less weight, so the inverse weight factors have been doubled for the batch culture experiment.

Table 4: Model parameters.

Symbol	Parameter	Unit	Value
$A_0$	potential nutrient affinity	m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	0.025
$\alpha$	chl-specific light absorption coefficient	m <sup>2</sup> E <sup>-1</sup> mol (g Chl) <sup>-1</sup>	0.53
$Q_S^N$	subsistence N quota	mol mol <sup>-1</sup>	0.018
$Q_0^P$	subsistence P quota	mol mol <sup>-1</sup>	0.0017
$Q_{max}^L$	maximum lipid C quota	mol mol <sup>-1</sup>	0.73
$r_D$	daylength parameter	---	0.52
$\int^{Chl}$	cost of chlorophyll synthesis	mol C (g Chl) <sup>-1</sup>	0.85
$\int^N$	cost of N assimilation	mol C (mol N) <sup>-1</sup>	0.93

Since light availability inside the cultures changes with chlorophyll content, self-shading was accounted for using the Beer-Lambert law. The culture volume was divided into 18 layers in the shape of hollow cylinders, for which the available light was calculated separately using an extinction coefficient of 16 m<sup>2</sup>; g; chl<sup>-1</sup>:

$$I_n = I_0; e(-c_e x c x d)$$

where  $I_n$  is the light intensity of a given layer,  $I_0$  is the light intensity outside the bottle,  $c_e$  is the extinction coefficient,  $c$  is the chlorophyll

concentration and  $d$  is the path length.

POC and lipid content were measured separately as C content per dry weight and total fatty acids (TFA) per dry weight, respectively. Conversion to storage lipid C, i.e. the fraction of POC stored in lipids, was calculated from the average C content of storage lipids, 76% (w/w), which could be confirmed for the fatty acids determined in the samples (data not shown. See also Geider and La Roche (Geider and La Roche, 2002). Since original TFA per dry weight was up to 77% (w/w), leading to 58% of total biomass being carbon, and C content was around 56% of

dry weight, this led to inconsistent results with more than 100% of C being storage lipids (data not shown).

In consequence, we assume a constant active carbon quota of 30% (gC g DW<sup>-1</sup>), assuming that the major change in cellular C is due to fatty acid accumulation and depletion, respectively. Storage lipid was calculated as the difference between total POC and the assumed active carbon quota. Measured TFA was not taken into account, as we suspect that the inconsistencies originate from the TFA data.

## 4 Results

### 4.1 Experiment

The batch culture experiment resulted in a complete dataset usable for constructing a lipid compartment inside the Pahlow et al. (Pahlow et al., 2013) chain model.

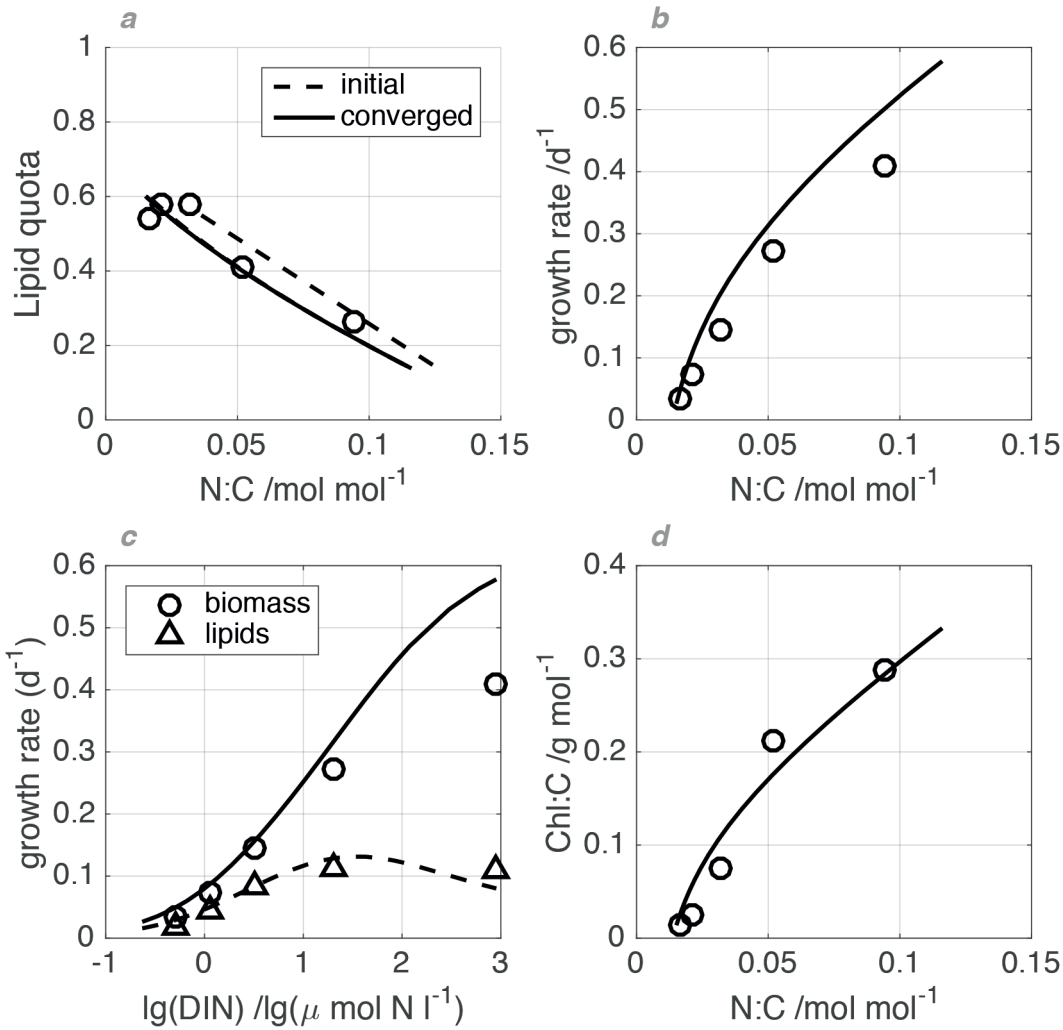
At the beginning of the experiment, the cultures were nitrogen-depleted and their N:C quota  $Q^N$  was near its minimum (Figure 3a). Upon re-feeding with nitrate, uptake of available DIN started immediately and intracellular nitrogen (PON) as well as  $Q^N$  increased rapidly (Figure 3b, c). POC increase was significantly slower, but continued past DIN exhaustion until a minimum N:C was reached (Figure 3d). Lipid content decreased initially and only increased well after DIN was depleted (Figure 3f). As expected, chlorophyll content was highest in the low light treatment and lowest under high light (Figure 3e). Chlorophyll increased with increasing  $Q^N$  and decreased over time, i.e. with decreasing  $Q^N$  and increasing optical density. Other than chlorophyll, differences in measured bulk properties between light intensities were rat-

her small. POC and lipid content were highest under medium light and slightly lower at both high and low light levels, strongly suggesting photoinhibition under high light. Accordingly,  $Q^N$  was lowest under medium light.

The model captures the characteristics of both the steady-state and dynamic growth of *M. salina*, including lipid synthesis. For high  $Q^N$ , the model tends to overestimate growth rates (see Figure 2 b, c and Figure 3 d, respectively). Generally, a good fit is achieved with a single parameter set for both data sets.

The turbidostat data show a clear relationship between  $Q^N$  and  $Q^L$ , which allowed for the development of Equation 7. Without the newly added lipid compartment, the model would significantly overestimate growth rates at low  $Q^N$  (not shown), which is due to the original model's basic assumption that all carbon is active. Adding the inactive lipid compartment, which is larger under N limitation and therefore has a stronger influence on model behaviour under low  $Q^N$ , decreases modelled growth rates at low  $Q^N$  and hence allows for a good fit to the turbidostat data. To simulate dynamic model behaviour, a corresponding data set was needed, hence the batch experiment was run. *M. salina* was cultivated under three different light intensities for 25 days. The necessary data could all be used, but some mass balance issues could not be resolved (for details, see discussion).

For both datasets, growth rate is overestimated for high  $Q^N$ . In the batch culture, this is most pronounced for the medium and high light treatments. Since light limits growth rate in the model for the low light treatment, but growth rate is only marginally higher for medium light and lower for the high



**Figure 2:** Steady-state data and simulations: Symbols denote data points, lines are model simulations. Data points represent equilibrium values for cultures under different nitrogen availabilities.

light treatments, we attribute this response to photo-inhibition. Since photo-inhibition is not described by the model, maximum C acquisition rate was simply lowered in the high and medium irradiance treatments in order to mimic the effect of photo-inhibition. However, in the steady-state experiment, light intensities were identical across treatments, thus photo-inhibition does not explain the model-data discrepancy in this case.

## 5 Discussion

We developed a model of algal lipid production to both help understand the physio-

logical role of neutral lipid accumulation in microalgae and to provide a model for use in computer-controlled microalgae production. The available steady-state data set was used to develop the steady-state equation for  $f_L$ , i.e. the fraction of carbon stored as lipids (Equation 7). The newly produced dynamic data set was then used to develop the corresponding dynamic equations (4 and 6).

The low light data were used to calibrate the model, while the other two light intensities were used for model validation. Whereas all N ends up in PON in the model, some N was apparently not accounted for in the experiment. This might indicate some problems



---

with the DIN and/or PON determinations at the beginning of the experiment, since initial DIN was not measured but calculated from the media recipe. Problems are also apparent in the erratic behaviour of DIN and PON under high light during the first three days of the experiment: PON build-up is much larger than DIN draw-down from day 0 to day 1 and vice versa from day 1 to day 2. These mass-balance problems cannot be resolved by our model analysis. However, for the N:C quota  $Q^N$ , which governs much of the model behaviour, the fit is quite good, as it is for the lipid quota, which is the main focus of this study.

POC and lipid content were measured separately and did not match (see model description for details). Since we suspect that the inconsistencies originate from the measured lipid content, we assumed a constant active carbon quota of 30% (gC g DW<sup>-1</sup>) and re-calculated storage lipid as the difference between total measured POC and the assumed active carbon quota. Since carbohydrate content in *Microchloropsis* barely responds to N starvation, this seemed a reasonable assumption (Recht et al., 2012). The chosen value of active carbon is in line with the results from Homann et al. (Homann, 2010), where active carbon quotas spanned 30-40%, calculated from total C and lipid C per biomass.

With the inclusion of a simple representation of photoinhibition in the model, a single parameter set is sufficient to capture the algae's behaviour under very different conditions. This supports the underlying assumption used to design model, namely that the algae simply store away part of their C fixation in the form of lipids. If lipid accumulation was a means to reduce electron overflow downs-

stream of photosystem II, we would expect higher growth rates and lipid accumulation with increasing light intensity, contrary to our observations of lower growth rates and lipid accumulation under high light intensity.

Lipid accumulation has formerly been shown to alleviate electron overflow from radiation stress due to PS I being unable to keep up with the rates of PS II and thus preventing photodamage in the alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Li et al., 2012) and in vascular plants (Marchin et al., 2017). If the same mechanism applied to *M. salina*, lipid content should be highest under high light, which is indeed not the case. In the current data set, lipid content is in fact lower under high light than under medium light. One possible explanation for the different findings are the different light levels: *C. reinhardtii* in the experiment by Li et al. (Li et al., 2012) was grown under 70-80  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-2}$ , whereas in the current dataset, light intensities were considerably higher (280 and 1410  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-2}$ , respectively). Thus, photo-inhibition is likely more intense, leading to a stronger reduction in photosynthesis.

Additionally, Simionato et al. (Simionato et al., 2013) found a decrease in linear electron flow in N-starved *M. salina*, owing to a reduced PS II/PS I ratio (from ~1 to ~0.6) as the D1 protein in PS II is most strongly affected by N limitation. This finding suggests very low levels of operational PS II in the high-light treatment of the current experiment, as the high light intensities already lead to low chlorophyll concentration. In combination with photoinhibition, which further reduces electron flow from PS II, electron overflow from PS II is likely not an issue for *M. salina*.

In summary, lipid accumulation in *M. sa-*

---

*lina* is likely simply a way of storing energy for future growth. *Microchloropsis* can initiate growth very quickly after starvation compared to other microalgae, i.e. there is hardly a lag phase before the exponential phase. (see also Flynn et al. (Flynn et al., 1993) in comparison with e.g. *Isochrysis galbana*, Flynn et al. (Flynn et al., 1994)).

Interest in and commercial use of microalgae is growing, yet the possible benefit of numerical models to improve algae cultivation is still rarely explored. Gharagozloo et al. (Gharagozloo et al., 2014) used a simple empirical model of *M. salina* and *Nannochloropsis granulata* in a computational fluid dynamics (CFD) model to both select the best strain for outdoor cultivation and improve their pond design to optimise productivity. Their model was based on total biomass with no distinction in composition with regard to nutrients or storage molecules, but allowed for the identification of growth-limiting environmental factors, thus showing possible ways for pond improvement with regard to size and location.

The model presented in the current study, combined with CFD, if necessary, could serve the same purpose. The information on biomass composition is relevant particularly for algal biofuel production, where a high lipid content is key, but also when cultivating algae for aquaculture feed, since *M. salina*'s ability to produce omega-3 fatty acids makes it valuable for aquaculture. Recently, Schaum et al. (Schaum et al., 2017) monitored and controlled *Chlorella sorokiniana* in a photobioreactor, using a control scheme based on the Droop model. They were able to both accurately track the algal biomass and compensate for artificial perturbations by dynamically adjusting the dilution

rate. This kind of computer-controlled algae production has so far only been applied on a laboratory scale, but if applied to outdoor cultures, might help regulate cultures in accordance with physical variability due to outdoor conditions. The model presented in the current study is much more complex, but its original optimal-allocation version is equivalent to the Droop model (Pahlow et al., 2013), which in turn was used by Schaum et al. (Schaum et al., 2017). When monitoring a particular biomass composition, which might either indicate non-optimal environmental factors or be the desired product, such as high-lipid-biomass, the corresponding model needs to incorporate that distinction.

## 6 Conclusion

A model of lipid synthesis and storage in the microalga *M. salina* was developed based on the optimality-based Pahlow et al. (Pahlow et al., 2013) phytoplankton model. Both steady-state and batch data of *M. salina* were used to construct and calibrate the model. A satisfactory fit was achieved. The model could be used to (1) optimise culture conditions by running multiple simulations prior to inoculating the culture; (2) facilitate upscaling and (3) possibly serve as a basis for computer-controlled algae production.

## Acknowledgements

The authors thank R. Schulz for providing lab and ocean space and for his continuous support. Financial support via the Cluster of Excellence 80 "The Future Ocean", grant CP1325, is gratefully acknowledged. The authors are thankful for access to the core facilities of the BiMo/LMB of the CAU.

## References

- Brennan, L., and P. Owende. 2010. Biofuels from microalgae{A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:557{577.
- Converti, A., A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego, and M. Del Borghi. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48:1146{1151.
- Droop, M. 1973. Some thoughts on nutrient limitation in algae. *Journal of Phycology* 9:264{272.
- Fawley, M. W., I. Jameson, and K. P. Fawley. 2015. The phylogeny of the genus *Nannochloropsis* (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), with descriptions of *N. australis* sp. nov. and *Microchloropsis* gen. nov. *Phycologia* 54:545{552.
- Flynn, K., K. Davidson, and J. Leftley. 1993. Carbon-nitrogen relations during batch growth of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) under alternating light and dark. *Journal of Applied Phycology* 5:465{475.
- Flynn, K., K. Davidson, and J. Leftley. 1994. Carbon-nitrogen relations at whole-cell and free-amino-acid levels during batch growth of *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) under conditions of alternating light and dark. *Marine Biology* 118:229{237.
- Frahm, B., P. Lane, H. M arkl, and R. P ortner. 2003. Improvement of a mammalian cell culture process by adaptive, model-based dialysis fed-batch cultivation and suppression of apoptosis. *Bioprocess and biosystems engineering* 26:1{10.
- Geider, R., and J. La Roche. 2002. Redfield revisited: variability in the N:P ratio of phytoplankton and its biochemical basis. *European Journal of Phycology* 37:1{17.
- Gharagozloo, P. E., J. L. Drewry, A. M. Collins, T. A. Dempster, C. Y. Choi, and S. C. James. 2014. Analysis and modeling of *Nannochloropsis* growth in lab, greenhouse, and raceway experiments. *Journal of applied phycology* 26:2303{2314.
- Greenwell, H., L. Laurens, R. Shields, R. Lovitt, and K. Flynn. 2010. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society Interface* 7:703{726.
- Guillard, R. R., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Pages 29{60 in *Culture of marine invertebrate animals*. Springer.
- Guillard, R. R., and J. H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian journal of microbiology* 8:229{239.
- Hildebrand, M., R. M. Abbriano, J. E. Polle, J. C. Traller, E. M. Trentacoste, S. R. Smith, and A. K. Davis. 2013. Metabolic and cellular organization in evolutionarily diverse microalgae as related to biofuels production. *Current opinion in chemical biology* 17:506{514.
- Homann, M., 2010. Physiologische Untersuchungen parameterinduzierter Adaptionsantworten von *Nannochloropsis salina* in turbidostatischen Prozessen und deren biotechnologischer Potentiale. Ph.D. thesis, Christian-Albrechts Universität at Kiel.
- Homann, M., K. Marxen, R. Schulz, and K. Vanselow. 2010. TFA and EPA productivities of *Nannochloropsis salina* influenced by temperature and nitrate stimuli in turbidostatic controlled experiments. *Marine Drugs* 8:2526{2545.
- Hu, Q., M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, and A. Darzins. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54:621{639.
- Kenny, P., and K. J. Flynn. 2015. In silico optimization for production of biomass and biofuel feedstocks from microalgae. *Journal of applied phycology* 27:33{48.
- Kenny, P., and K. J. Flynn. 2017. Physiology limits commercially viable phototrophic production of microalgal biofuels. *Journal of applied phycology* 29:2713{2727.
- Leu, S., and S. Boussiba. 2014. Advances in the production of high-value products by microalgae. *Industrial Biotechnology* 10:169{183.
- Li, X., E. R. Moellering, B. Liu, C. Johnny, M. Fedewa, B. B. Sears, M.-H. Kuo, and C. Benning. 2012. A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The plant cell* 24:4670{4686.
- Marchin, R. M., T. L. Turnbull, A. I. Deheinzelin, and M. A. Adams. 2017. Does triacylglycerol (TAG) serve a photoprotective function in plant leaves? An examination of leaf lipids under shading and drought. *Physiologia plantarum* .
- Mata, T. M., A. A. Martins, and N. S. Caetano. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217{232.
- Nichelmann, L., M. Schulze, W. B. Herppich, and W. Bilger. 2016. A simple indicator for nondestructive estimation of the violaxanthin cycle pigment content in leaves. *Photosynthesis research* 128:183{193.
- Pahlow, M., H. Dietze, and A. Oschlies. 2013. Optimality-based model of phytoplankton growth and diazotrophy. *Marine Ecology Progress Series*

- 
- ries 489:1{16. Recht, L., A. Zarka, and S. Bousiba. 2012. Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. *Applied microbiology and biotechnology* 94:1495{1503.
- Rodol, L., G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, and M. R. Tredici. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering* 102:100{112.
- Schaum, A., H. Weisbarth, and T. Meurer. 2017. Robust adaptive feedforward output-feedback tracking control for microalgae cultures. *IFAC-PapersOnLine* 50:12667{12672.
- Simionato, D., M. A. Block, N. La Rocca, J. Jouhet, E. Marechal, G. Finazzi, and T. Morosinotto. 2013. The Response of *Nannochloropsis gaditana* to Nitrogen Starvation Includes De Novo Biosynthesis of Triacylglycerols, a Decrease of Chloroplast Galactolipids, and Reorganization of the Photosynthetic Apparatus. *Eukaryotic cell* 12:665{676.
- Simionato, D., E. Sforza, E. C. Carpinelli, A. Bertucco, G. M. Giacometti, and T. Morosinotto. 2011. Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: effects on lipids accumulation. *Bioresource technology* 102:6026{6032.
- Smith, S. L., M. Pahlow, A. Merico, and K. W. Wirtz. 2011. Optimality-based modeling of planktonic organisms. *Limnology and Oceanography* 56:2080{2094.
- Vitova, M., K. Bisova, S. Kawano, and V. Zachleder. 2015. Accumulation of energy reserves in algae: from cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnology advances* 33:1204{ 1218.
- Williams, P. J. I. B., and L. M. Laurens. 2010. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science* 3:554{590.



*Xanthoria parietina*

## Carbon-based secondary compounds in the lichen *Hypogymnia physodes* deter detritivorous woodlice

Paul Christian Wieners<sup>a</sup>, Wolfgang Bilger<sup>a</sup>, Yngvar Gauslaa<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Christian-Albrechts-University, Botanisches Institut, Abt. Ökophysiologie der Pflanzen, Am Botanischen Garten 3-9, D-24118 Kiel, Germany

<sup>b</sup> Faculty of Environmental Sciences and Natural Resource Management, Norwegian University of Life Sciences, P.O. Box 5003, NO-1432 Ås, Norway

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 May 2017

Received in revised form

14 October 2017

Accepted 2 November 2017

Corresponding Editor: Peter D. Crittenden

#### Keywords:

Carbon-based secondary compounds

Chemical defense

Grazing preference

*Hypogymnia physodes*

Isopods

Lichenivory

Lichens

Macrodetritivores

*Porcellio scaber*

Woodlouse

### ABSTRACT

Woodlice are not widely recognized as lichen-feeding invertebrates. We sought to discover whether the woodlouse, *Porcellio scaber*, could feed on the lichen *Hypogymnia physodes* and if the lichen carbon-based secondary compounds CBSCs would reduce grazing. We cut lichen thalli in two pieces, one was non-destructively rinsed in acetone to remove CBSCs; the other served as a control. Both pieces were fed to woodlice in a choice experiment. The CBSC concentration of individual thalli ranged from 3 to 19%. The woodlice grazed all pieces, but preferred the acetone-rinsed pieces, depending on the amount of CBSCs present in the non-extracted counterpart. The woodlice were not deterred from feeding on samples with CBSC concentrations 5%, which corresponded to natural contents in shade-adapted thalli. This suggested that *P. scaber* tolerates this amount of compounds at least in the short-term. In conclusion, *P. scaber* can feed on *H. physodes*, but CBSCs deter them from feeding.

© 2017 Elsevier Ltd and British Mycological Society.  
All rights reserved.

## 1. Introduction

Lichens are well defended against generalist herbivores by carbon-based secondary compounds (CBSCs) also called lichen compounds (Gauslaa, 2005; Pöykkö et al., 2005; Cernajova and Svoboda, 2014). Such compounds are particularly abundant in lichens from oligotrophic, N-deficient habitats. In contrast, most Nfixing cyanolichens are deficient in CBSCs (Gauslaa, 2005), but may produce N-based defence compounds such as microcystins (e.g. Kaasalainen et al., 2012).

A unique feature of lichens is that a

major part of their CBSC pools can be extracted non-destructively by 100% acetone from living, desiccated lichens (Solhaug and Gauslaa, 2001; Candotto Carniel et al., 2017) without affecting N and P contents or other intracellular compounds (Pöykkö et al., 2005; Asplund and Wardle, 2013). This is because lichen CBSCs are deposited outside fungal hyphae, and because 100% acetone is unable to penetrate through dry cell walls, and so does not enter the living parts of desiccated tissues. Our selected lichen, *Hypogymnia physodes*, has high total mean CBSC concentration (often >9% of dry matter, DM; Solhaug et al., 2009). Its major me-

---

dullary CBSCs are physodalic and physodic acids, which may reach a concentration of >20% of DM. The minor CBSCs (<1% of DM) are the medullary protocetraric acid and the cortical atranorin/chloroatranorin (Solhaug et al., 2009). Woodlice, isopod crustaceans belonging to the mainly terrestrial suborder Oniscidea, are among the most abundant macrodetritivores in temperate forests (Zuo et al., 2014).

These invertebrates are common in shaded parts of forests with dead wood (Topp et al., 2006; Purchart et al., 2013). While some species have developed trachea-like lungs, most have gills and therefore depend on high air humidity. Thus they live a hidden and nocturnal life, but are seen during moist cloudy weather on e.g. the lower part of epiphytecovered tree trunks inside forests. There, they often hide underneath bark pieces, lichen and bryophyte mats during daylight hours (Y. Gauslaa, pers. obs.). Being detritivores, woodlice eat fungal tissues and algae (Crowther et al., 2011; Crowther and A'Bear, 2012; A'Bear et al., 2014). However, apart from a few anecdotal reports on lichen feeding (Richardson, 1975, p 154, Gerson and Seaward, 1977), they have not been considered among the lichen feeding invertebrates.

In the present study we used the woodlouse species *Porcellio scaber*, a common macroarthropod in temperate forests, also in the more nutrient poor oak and pine forests (De Smedt et al., 2016) where *H. physodes* is abundant. It is the most common woodlouse in Norway, being found in drier sites (Sutton, 1972), and is particularly common at forest edges (De Smedt et al., 2016). Our aim was to test whether *P. scaber* avoids *H. physodes* thalli with high CBSC concentrati-

ons as do lichenivorous gastropods, insects and mammals (Gauslaa, 2005; Poykkö et al., 2005; Nybakken et al., 2010). We also aimed to quantify the minimum CBSC concentration needed to deter woodlice grazing.

## 2. Materials and methods

*H. physodes* was collected 5 August 2016 from all sides of *Picea abies* trunks at and near north-facing forest edges bordering an agricultural landscape in southeastern Norway, Akershus, 59°39'43" N, 10°50'40" E, 140 m a.s.l. Here, the studied woodlouse was often seen on the ground in humid weather (Y. Gauslaa, pers. obs.). Solhaug et al. (2009) have documented a strong positive relationship between diffuse light and CBSC content in *H. physodes*. To ensure a variation in CBSC concentration in our experimental thalli, we sampled lichens from forest edges with substantial smallscale variation in the open sky exposure and thus a high variation in diffuse light. Thalli were air dried at room temperature, taken to Kiel, Germany, and within 5 d stored at -18° C until the start of experiments. The first experiment was conducted September 6-20, 2016, the second comprised a sequence of trials done during a university teaching course from mid-October 2016 to early February 2017.

The woodlouse used in both experiments, *P. scaber*, was originally collected under stones in the Botanical Garden of the Christian-Albrechts-University, Kiel, N Germany 54°20'46.76" N, 10°60'58'23" E, 21 m above sea level, and a population maintained since 2011 in a terrarium where they were fed with food for fish (Pond Sticks, Tetra GmbH, Melle, Germany).

Air-dried frozen thalli of *H. physodes* were cut into two similar-sized pieces of roughly 110 mg (70-190 mg; min-max size for individual pieces) and weighed (AW224, Sartorius, Göttingen, Germany; accuracy  $\pm 0.1$  mg). Two slightly different extraction protocols were used for the lichens used in the two experiments. The first experiment employed the extraction protocol of Solhaug et al. (2009). One piece from each pair was rinsed 4 times in 10 ml acetone for 30 min each. In the second experiment the thalli were extracted twice in 10 ml acetone for 20 min.

After extraction, thalli were reweighed; the non-extracted piece from each thallus was the control. Each of these rinsed-control pairs was fixed with white cotton thread onto a filter paper (diameter 90 mm) and put into a Petri dish. After thoroughly moistening the filter paper and the lichen thalli with distilled water, we added five woodlice in each Petri dish. The Petri dishes were closed and stored in a dark room at 23° C for 24 h. A Petri dish with five woodlice and the extracted and control portion of the lichen sample is shown before (Fig.1A) and after 24h grazing (Fig.1B). The lichen pieces at the end of the experiment were oven-dried at 60° C to constant mass and weighed again. Grazing was estimated as mg grazed dry matter (DM)  $d^{-1}$  for each lichen piece, and is an estimate of the total grazing by the five woodlice individuals. Grazing preference (%) for the extracted piece of each thallus pair was computed as  $(\text{rinsed } DM_{\text{grazed}} \times 100) / (\text{rinsed } DM_{\text{grazed}} + \text{control } DM_{\text{grazed}})$ .

In the first experiment, the extracts of each extraction step for each thallus were pooled in a Falcon tube (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). After evaporation of the

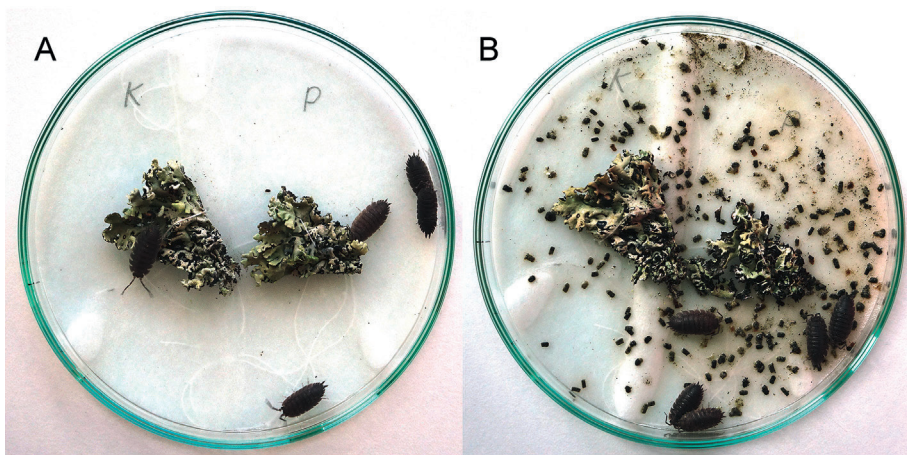
acetone, the residue was dissolved in 40 ml methanol (HPLC grade, Roth, Karlsruhe, Germany). After appropriate dilution, the absorbance of the solutions was determined with a spectrophotometer (Uvikon 922, Kontron Instruments, Milano, Italy).

To compare the effects of the different times and the slightly different extraction protocols, we used one-way ANOVAs for: (1) the percent extracted CBSCs; (2) grazed mass of controls; (3) grazed mass of extracted thalli; and (4) grazing preference of extracted thalli, after checking homoscedasticity and normality. The two last parameters were log-transformed to meet the ANOVA requirements. We used a linear multiple regression model for predicting grazed biomass after extracting the CBSCs. Explanatory variables were percent extracted CBSCs and grazed biomass of control pieces. In the text, means  $\pm 1$  standard error are given; error bars in Figs show 1 standard deviation. We ran all statistical analyses in SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA).

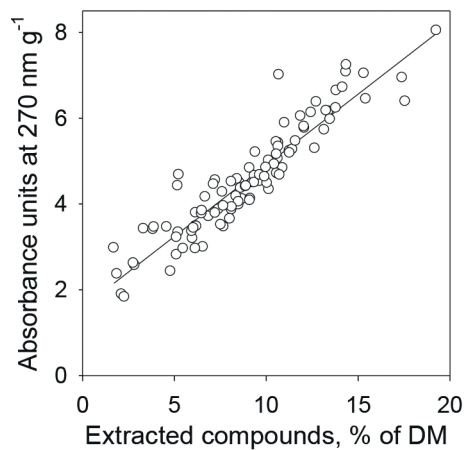
### 3. Results

The greater grazing of extracted versus control lichen pieces was evident by eye in many of the trials (Fig. 1). The distribution of the feces often indicated a longer time spent by the woodlice near the extracted piece. The woodlice fed on all lichen layers, but particularly on the upper cortex, the photobiont layer and the upper part of the medulla (Fig. 1B). More than 88% of the 311 pairs in both experiments had more grazing in rinsed pieces than in controls. However, every control thallus from both experiments had some grazing, even those with the highest CBSC concentrations (total range in grazing of con-

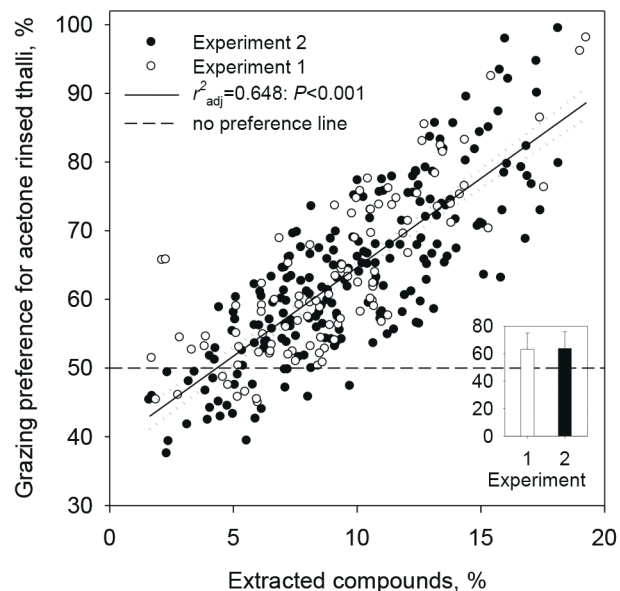




**Fig. 1.** Photos of the same Petri dish with the lichen *Hypogymnia physodes* at the start (A) and the end (B) of 24 h grazing by five specimens of the woodlouse species *Porcellio scaber*. The Petri dish shows a pair of an acetone-rinsed (the piece at the right side of the dish) and a control piece (at left side) of one *H. physodes* thallus.



**Fig. 2.** The relationship between absorbance units measured at 270 nm per dry mass (DM) and the weighed mass loss in percent of DM during acetone-extraction of lichen carbon-based secondary compounds ( $r^2_{adj} = 0.864$ ;  $P < 0.001$ ;  $n = 100$ ).



**Fig. 3.** The relationship between the grazing preference for CBSC-deficient *Hypogymnia physodes* thalli and the extracted CBSCs. Grazing preference was recorded after 24 h grazing by five specimens of the woodlouse species *Porcellio scaber*. The solid line shows the regression line, the dotted lines show 95% confidence intervals, and the hatched line shows the no-preference line. Filled and open symbols represent two separate experiments done in the same way, but separated in time and run by different persons. The insert shows the overall mean grazing preference for CBSC-deficient thalli in each of these two experiments, vertical bars show 1 standard deviation.

trols: 0.3–38.1 mg d<sup>-1</sup>).

The close relationship between the absorbance units at 270 nm per DM and the percent extracted material ( $r^2_{adj} = 0.864$ ;  $P < 0.001$ ; Fig. 2) supported the view that the

percent mass loss during rinsing represented the CBSC concentration in the lichens. The CBSC concentration varied substantially between experimental pairs (total range: 1.6–19.3%;  $n = 310$ ). The percent extracted

material from extracted pieces did not significantly differ between the two experiments (ANOVA; data not shown); the total mean extraction was  $9.6 \pm 0.2\%$  of DM. The thalli used in the first experiment were slightly, but significantly ( $P < 0.001$ ) larger (total thallus size including both pieces:  $246.2 \pm 4.6$  mg) than those used in the second experiment ( $218.2 \pm 1.1$  mg). However, there were no significant correlations between thallus size and percent extraction, either between thallus size and consumed DM of extracted pieces or with respect to control pieces. For these reasons, the two experiments were combined in the plots and statistical analyses.

The mean grazing preference for acetone-rinsed thalli was  $63.6 \pm 0.7\%$  ( $n = 310$ ; total range 37.5-99.4%) with no difference between the two experiments (Fig. 3; insert). Grazing preference increased significantly with the percent extracted compounds (Fig. 3). The regression line crossed the 50% grazing preference at approximately 4.3% CBSC-concentration, implying that CBSC concentrations lower than approximately 4e5% are insufficient to deter the woodlouse *P. scaber*. The total grazed biomass for both pieces combined in each pair did not significantly change with extracted compounds (linear regression analysis;  $r^2$  adj - 0.007;  $P = 0.069$ ).

The grazed DM of control pieces (total mean  $18.8 \pm 0.4$  mg DM  $d^{-1}$ ;  $n = 310$ ; equivalent to  $3.8$  mg  $d^{-1}$  woodlouse $^{-1}$ ) did not differ between the two experiments (Fig. 4A; insert), but declined significantly with increasing CBSC concentration from approximately  $30$  mg  $d^{-1}$  ( $= 6$  mg  $d^{-1}$  woodlouse $^{-1}$ ) at the lowest natural CBSC concentration to just 1-2 mg  $d^{-1}$  in the samples with the highest

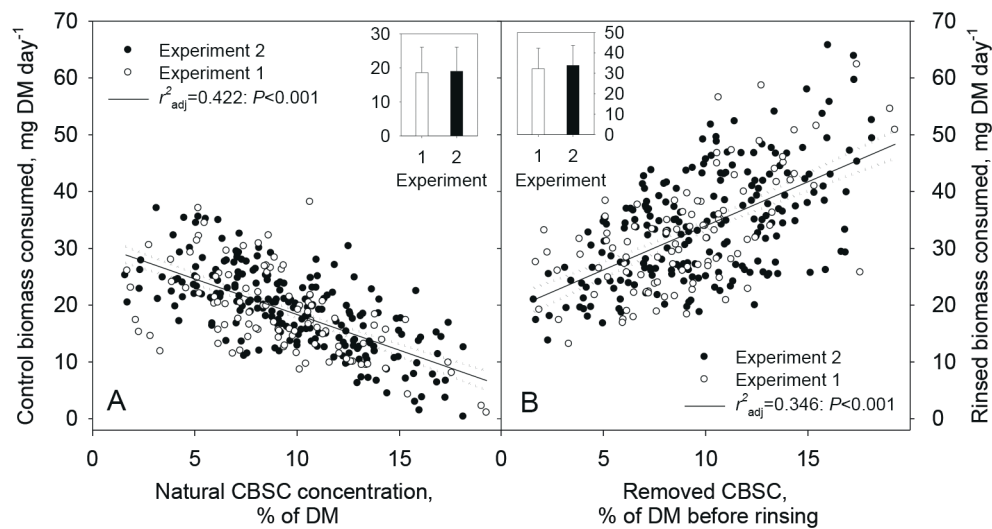
CBSC concentration of 19% (Fig. 4A). As for the grazing preference (Fig. 3), grazed DM of lichens (Fig. 4A, B) showed completely overlapping ranges and variation between thalli used in the two experiments.

The grazed DM of acetone-rinsed pieces with hardly any CBSCs left (total mean  $33.3 \pm 0.6$  mg DM  $d^{-1}$  -  $6.7$  mg  $d^{-1}$  woodlouse $^{-1}$ ) was at similar levels in both experiments (Fig. 4B; insert). Grazing of rinsed lichens strongly increased in those samples that had contained a high CBSC concentration before extraction (Fig. 4B). The regression between rinsed DM consumed and percent CBSC before rinsing (Fig. 4B) was significantly improved after adding grazed biomass of the control counterpart as an additional explanatory parameter in a multiple regression model (Table 1). This was done because the grazed DM of controls and of extracted pieces were just weakly correlated ( $r = -0.234$ ); the low variance inflation factors (VIF; Table 1) showed that multicollinearity was not a problem in the multiple regression. For the extracted thalli that had the lowest CBSC concentration before extraction (Fig. 4B), grazing was at a similar level (ca.  $30$  mg  $d^{-1}$  -  $6$  mg  $d^{-1}$  woodlouse $^{-1}$ ) as in the control pieces with the lowest natural compound concentration (Fig. 4A). This was consistent with the lack of preference (Fig. 3) at low concentrations of CBSCs. With increasing removal of CBSCs, grazing by the five woodlice increased to ca.  $50$  mg  $d^{-1}$  even for the thalli that had the highest CBSC concentration (19%) before the start (Fig. 4B), equivalent to a consumption of  $10$  mg  $d^{-1}$  woodlouse $^{-1}$ .

## 4. Discussion

This study confirms the old and often forgotten experiments of Stahl (1904) who showed that woodlice actually grazed lichens after their CBSCs had been reduced by a sodium carbonate solution treatment. An acetone extraction is better than the

soda solution extraction because acetone causes less damage to the lichen (Solhaug and Gauslaa, 2001, 2004). The CBSCs in *H. physodes* are not highly detrimental to woodlice as these compounds do not reduce grazing preference unless the total concentration is higher than 4-5% (Fig. 3).



**Fig. 4.** The relationships between (A) the consumed dry mass of control thalli and their concentration of CBSC, and (B) between the consumed dry mass of acetone-rinsed pieces and the concentration of CBSC that had been removed by the rinsing. Each pair of control and rinsed pieces of *Hypogymnia physodes* had been served to five specimens of the woodlouse species *Porcellio scaber* for 24 h. The solid line shows the regression line; the dotted lines show 95% confidence intervals. Filled and open symbols represent two separate experiments done in the same way, but separated in time and run by different persons. The inserts show the overall mean grazed DM in control thalli (insert in A) and the overall mean grazed DM in CBSC-deficient thalli (insert in B) in each of these two experiments, vertical bars show 1 standard deviation.

**Table 1**

Multiple regression model for the grazed lichen biomass in extracted lichen pieces using (1) the CBSC concentration prior to extraction and (2) the grazed biomass of their control counterparts as explanatory variables. Grazed lichen biomass in extracted lichen pieces =  $7.475 + 0.355 * \text{grazed control biomass} + 1.997 * \% \text{ extracted CBSC}$ ; ( $r^2 \text{ adj} = 0.383$ ;  $P < 0.001$ ;  $n = 310$ ).

	Coefficient $\pm$ 1SE	T	P	VIF
Constant	7.475 $\pm$ 2.761	2.707	0.007	
Grazed control biomass	0.355 $\pm$ 0.080	4.420	<0.001	1.735
% extracted CBSC	1.997 $\pm$ 0.155	12.893	<0.001	1.735

VIF: Variance inflation factor.

This is consistent with a quantitative rather than a qualitative defense (e.g. Smilanich et al., 2016). The natural concentration in thalli collected from interior parts of shaded spruce forests (6.7%; see Solhaug et al., 2009) is just slightly above this limit, implying a risk for lichens growing in the shade to be consumed by woodlice.

We consider the DM loss during acetone rinsing to be a good estimate of total CBSC concentration in *H. physodes* for the following reasons: (1) In an HPLC-study of CBSCs in *H. physodes* from five nearby habitats, the mean concentration was  $9.5 \pm 0.4\%$  (n = 75; with a total range of 3.6-20.8%) (Solhaug et al., 2009). These values correspond well with the mass loss measured after our extraction ( $9.6 \pm 0.2\%$ ; 1.6-19.3%; n = 310). (2) There is a strong, positive relationship between the absorbance of extracts at 270 nm per DM and percent reduction in DM after the efficient acetone rinsing (Fig. 2). (3) Other studies have shown that extraction protocols similar to ours extract nearly all medullary CBSCs present (>97%) in *H. physodes* from intact, unground lichen material (McEvoy et al., 2006; Asplund et al., 2015). Because medullary CBSCs in general represent a much stronger herbivore defense than cortical compounds, which function mainly as solar radiation screens (as reviewed by Solhaug and Gauslaa, 2012), the reduced extraction of the minor cortical CBSCs (McEvoy et al., 2006) is unlikely to influence the grazing preference.

It is remarkable that *P. scaber* consistently ate, to some extent, even control thalli with high CBSC concentration (Fig. 4A), despite being known to discriminate between diets made up with different microbe species (Ihnen and Zimmer, 2008) or diets with and with-

hout cadmium addition (Zidar et al., 2005). One interpretation is that there is a balance between the fodder quality and deterrence in woodlice feeding on CBSC-containing *H. physodes*. The strong increase in grazing of acetone-rinsed CBSC (Fig. 4B) is consistent with a hypothesis that investment by the lichen in CBSC-production increases in thalli with the highest nutrition quality. Future experiments should investigate this aspect.

An unusually diverse microflora is associated with the cuticle of the hindgut of *P. scaber* (Kostanjsek et al., 2002) and this may help to degrade toxic CBSCs. Oxidation of phenolics in the gut of *P. scaber* appears mainly due to the endosymbiotic bacteria of the hepatopancreas (Zimmer, 1999). Indeed, CBSC-degrading microbes have been isolated from the digestive organs of specialized lichenivores such as reindeer (Sundset et al., 2008, 2010).

Woodlice may contribute to the lack of *H. physodes* on shaded lower trunks in broadleaved deciduous stands. *P. scaber* prefers habitats with subneutral soil pH-ranges (VanStraalen and Verhoef, 1997), and declines with acidification (Zimmer and Topp, 1997). *H. physodes* is uncommon on trunks of trees growing in subneutral soils, but is more common on trunks on acidic soils. This is consistent with woodlouse-exclusion of *H. physodes* on lower parts of trees. Woodlice populations are predicted to increase with global warming (David and Handa, 2010) with possible more serious effects on lichens in the future.

In forests, a substantial biomass of epiphytic lichens falls to the ground as litter (Esseen, 1985; Knops et al., 1996; Berryman and McCune, 2006; Caldiz and Brunet, 2006). Epiphytic lichen litter thus feeds a de-

---

composer community (Asplund and Wardle, 2017). Consumption and decomposition of *H. physodes* litter on the forest floor is fast, and acetone rinsing of the lichen litter speeds up decomposition rates (Asplund et al., 2013; Asplund and Wardle, 2013). Detrivores may thus contribute to rapid nutrient cycling by decomposing litter from epiphytic lichen communities. Considering the high woodlice feeding also of lichens rich in CBSCs (Fig. 4), macroinvertebrates likely affect lichen litter pools on the forest floor.

Hyvärinen et al. (2000) found that somatic parts of *H. physodes* have lower concentration of CBSCs than soralia which increase in abundance as thalli grow. The lack of relationship between sampled thallus size and CBSC concentration in our data set, suggests that all studied specimens had reached the mature reproductive stage.

In conclusion, the macrodetritivorous woodlouse *P. scaber* responded like other lichenivorous organisms by increasing their

lichen consumption after non-destructive extraction of lichen CBSCs with acetone. However, their preference for CBSC-deficient lichens was lower than that of earlier studied lichen-feeding specialists. *H. physodes* from shade-adapted habitats had a lower CBSC concentration than that required to deter the woodlouse, suggesting that woodlice could be important consumers of lichens on the lower parts of tree trunks.

### **Acknowledgments**

We thank Dr. Marko Rohlfs for pointing out woodlice as test organisms. We are grateful to the students who did the measurements in experiment 2 during their course “biol 106 Ecology and Evolution” in winter semester 2016/17. Thanks also to Knut Asbjørn Solhaug for preparing Fig. 1 and to four anonymous reviewers for useful and constructive comments.

## References

- A'Bear, A.D., Boddy, L., Kandeler, E., Ruess, L., Jones, T.H., 2014. Effects of isopod population density on woodland decomposer microbial community function. *Soil Biol. Biochem.* 77, 112-120.
- Asplund, J., Bokhorst, S., Kardol, P., Wardle, D.A., 2015. Removal of secondary compounds increases invertebrate abundance in lichens. *Fungal Ecol.* 18, 18-25.
- Asplund, J., Bokhorst, S., Wardle, D.A., 2013. Secondary compounds can reduce the soil micro-arthropod effect on lichen decomposition. *Soil Biol. Biochem.* 66, 10-16.
- Asplund, J., Wardle, D.A., 2013. The impact of secondary compounds and functional characteristics on lichen palatability and decomposition. *J. Ecol.* 101, 689-700.
- Asplund, J., Wardle, D.A., 2017. How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. *Biol. Rev.* 92, 1720-1738.
- Berryman, S., McCune, B., 2006. Estimating epiphytic macrolichen biomass from topography, stand structure and lichen community data. *J. Veg. Sci.* 17, 157-170.
- Caldiz, M.S., Brunet, J., 2006. Litterfall of epiphytic macrolichens in *Nothofagus* forests of northern Patagonia, Argentina: relation to stand age and precipitation. *Austral Ecology* 31, 301-309.
- Candotto Carniel, F., Pellegrini, E., Bove, F., Crosera, M., Adami, G., Nali, C., Lorenzini, G., Tretiach, M., 2017. Acetone washing for the removal of lichen substances affects membrane permeability. *Lichenologist* 49, 387-395.
- Cernajova, I., Svoboda, D., 2014. Lichen compounds of common epiphytic Parmeliaceae species deter gastropods both in laboratory and in Central European temperate forests. *Fungal Ecol.* 11, 8-16.
- Crowther, T.W., A'Bear, A.D., 2012. Impacts of grazing soil fauna on decomposer fungi are species-specific and density-dependent. *Fungal Ecol.* 5, 277-281.
- Crowther, T.W., Jones, T.H., Boddy, L., 2011. Species-specific effects of grazing invertebrates on mycelial emergence and growth from woody resources into soil. *Fungal Ecol.* 4, 333-341.
- David, J.F., Handa, I.T., 2010. The ecology of saprophagous macroarthropods (millipedes, woodlice) in the context of global change. *Biol. Rev.* 85, 881-895.
- De Smedt, P., Wuyts, K., Baeten, L., De Schrijver, A., Proesmans, W., De Frenne, P., Ampoorter, E., Remy, E., Gijbels, M., Hermy, M., Bonte, D., Verheyen, K., 2016. Complementary distribution patterns of arthropod detritivores (woodlice and millipedes) along forest edge-to-interior gradients. *Insect Conservation Divers.* 9, 456-469.
- Esseen, P.A., 1985. Litter fall of epiphytic macrolichens in two *Picea abies* forests in Sweden. *Can. J. Bot.* 63, 980-987.
- Gauslaa, Y., 2005. Lichen palatability depends on investments in herbivore defence. *Oecologia* 143, 94-105.
- Gerson, U., Seaward, M.R.D., 1977. Lichen-invertebrate associations. In: Seaward, M.R.D. (Ed.), *Lichen Ecology*. Academic Press, London, pp. 69-119.
- Hyvärinen, M., Koopmann, R., Hormi, O., Tuomi, J., 2000. Phenols in reproductive and somatic structures of lichens: a case of optimal defence? *Oikos* 91, 371-375.
- Ihnen, K., Zimmer, M., 2008. Selective consumption and digestion of litter microbes by *Porcellio scaber* (Isopoda : Oniscidea). *Pedobiologia* 51, 335-342.
- Kaasalainen, U., Fewer, D.P., Jokela, J., Wahlsten, M., Sivonen, K., Rikkinen, J., 2012. Cyanobacteria produce a high variety of hepatotoxic peptides in lichen symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5886-5891.
- Knops, J.M.H., Nash III, T.H., Schlesinger, W.H., 1996. The influence of epiphytic lichens on the nutrient cycling of an oak woodland. *Ecol. Monogr.* 66, 159-179.
- Kostanjsek, R., Strus, J., Avgustin, G., 2002. Genetic diversity of bacteria associated with the hindgut of the terrestrial crustacean *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Fems Microbiol. Ecol.* 40, 171-179.
- McEvoy, M., Nybakken, L., Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., 2006. UV triggers the synthesis of the widely distributed secondary compound usnic acid. *Mycol. Prog.* 5, 221-229.
- Nybakken, L., Helmersen, A.M., Gauslaa, Y., Selås, V., 2010. Secondary compounds restrain lichen feeding by bank voles (*Myodes glareolus*). *J. Chem. Ecol.* 36, 298-304.
- Purchart, L., Tuf, I.H., Hula, V., Suchomel, J., 2013. Arthropod assemblages in Norway spruce monocultures during a forest cycle - a multi-taxa approach. *For. Ecol. Manag.* 306, 42-51.
- Pöykkö, H., Hyvärinen, M., Backor, M., 2005. Removal of lichen secondary metabolites affects food choice and survival of lichenivorous moth larvae. *Ecology* 86, 2623-2632.
- Richardson, D.H.S., 1975. *The Vanishing Lichens*. David & Charles, Newton.
- Smilanich, A.M., Fincher, R.M., Dyer, L.A., 2016. Does plant apparency matter? Thirty years of data provide limited support but reveal clear patterns of the effects of plant chemistry on herbivores. *New Phytol.* 210, 1044-1057.

- 
- Solhaug, K.A., Gauslaa, Y., 2001. Acetone rinsing - a method for testing ecological and physiological roles of secondary compounds in living lichens. *Symbiosis* 30, 301-315.
- 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., 2012. Secondary lichen compounds as protection against excess solar radiation and herbivores. *Prog. Bot.* 73, 283-304.
- Solhaug, K.A., Lind, M., Nybakken, L., Gauslaa, Y., 2009. Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia physodes*. *Flora* 204, 40-48.
- Stahl, G.E., 1904. Die Schutzmittel der Flechten gegen Tierfrass. Pages 357-375 Festschrift zum siebzigsten Geburtstag von Ernst Haeckel. Gustav Fischer, Jena.
- Sundset, M.A., Barboza, P.S., Green, T.K., Folkow, L.P., Blix, A.S., Mathiesen, S.D., 2010. Microbial degradation of usnic acid in the reindeer rumen. *Naturwissenschaften* 97, 273-278.
- Sundset, M.A., Kohn, A., Mathiesen, S.D., Præsteng, K.E., 2008. *Eubacterium rangiferina*, a novel usnic acid-resistant bacterium from the reindeer rumen. *Naturwissenschaften* 95, 741-749.
- Sutton, S., 1972. Woodlice. Pergamon Press, Oxford, New York.
- Topp, W., Kappes, H., Kulfan, J., Zach, P., 2006. Distribution pattern of woodlice (Isopoda) and millipedes (Diplopoda) in four primeval forests of the Western Carpathians (Central Slovakia). *Soil Biol. Biochem.* 38, 43-50.
- VanStraalen, N.M., Verhoef, H.A., 1997. The development of a bioindicator system for soil acidity based on arthropod pH preferences. *J. Appl. Ecol.* 34, 217-232.
- Zidar, P., Bozic, J., Strus, J., 2005. Behavioral response in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea) offered a choice of uncontaminated and cadmiumcontaminated food. *Ecotoxicology* 14, 493-502.
- Zimmer, M., 1999. The fate and effects of ingested hydrolyzable tannins in *Porcellio scaber*. *J. Chem. Ecol.* 25, 611-628.
- Zimmer, M., Topp, W., 1997. Does leaf litter quality influence population parameters of the common woodlouse, *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda)? *Biol. Fertil. Soils* 24, 435-441.
- Zuo, J., Fonck, M., van Hal, J., Cornelissen, J.H.C., Berg, M.P., 2014. Diversity of macrodetritivores in dead wood is influenced by tree species, decay stage and environment. *Soil Biol. Biochem.* 78, 288-297.

### 8.3 Literaturverzeichnis zum Anhang

- Asplund J, Wardle DA (2013) The impact of secondary compounds and functional characteristics on lichen palatability and decomposition. *J Ecol* 101:689–700
- Carniel FC, Pellegrini E, Bove F, Crosera M, Gianpiero A, Nali C, Lorenzini G, Tretiach M (2017) Acetone washing for the removal of lichen substances affects membrane permeability. *The Lichenologist* 49:387–395
- Gauslaa Y (2005) Lichen palatability depends on investments in herbivore defence. *Oecologia* 143:94–105
- Gauslaa Y, McEvoy M (2005) Seasonal changes in solar radiation drive acclimation of the sun-screening compound parietin in the lichen *Xanthoria parietina*. *Basic Appl Ecol* 6:75–82. doi: 10.1016/j.baae.2004.10.003
- Gerson U, Seaward MR (1977) Lichen-invertebrate associations. *Lichen Ecol* 69–119
- Greenwell H, Laurens L, Shields R, Lovitt RW, Flynn KJ (2009) Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J R Soc Interface* rsif20090322
- McEvoy 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. doi: 10.1007/s11557-006-0514-9
- Molnár K, Farkas (2014) Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift Für Naturforschung C* 65:157. doi: 10.1515/znc-2010-3-401
- Nguyen K-H, Chollet-Krugler M, Gouault N, Tomasi S (2013) UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Nat Prod Rep* 30:1490–1508
- Nybakken L, Helmersen A-M, Gauslaa Y, Selås V (2010) Lichen compounds restrain lichen feeding by bank voles (*Myodes glareolus*). *J Chem Ecol* 36:298–304
- Pöykkö H, Hyvärinen M, Ba kor M (2005) Removal of lichen secondary metabolites affects food choice and survival of lichenivorous moth larvae. *Ecology* 86:2623–2632
- Richardson DH (1975) Vanishing lichens: Their history, biology and importance. David & Charles, Exeter, Davon, United Kingdom
- Solhaug KA, Gauslaa Y (2001) Acetone rinsing—a method for testing ecological and physiological roles of secondary compounds in living lichens. *Symbiosis-Rehovot* 30:301–316
- Solhaug KA, Lind M, Nybakken L, Gauslaa Y (2009) Possible functional roles of cortical depsides and medullary depsidones in the foliose lichen *Hypogymnia physodes*. *Flora - Morphol Distrib Funct Ecol Plants* 204:40–48. doi: 10.1016/j.flora.2007.12.002
- Wieners PC, Bilger W, Gauslaa Y (2018a) Carbon-based secondary compounds in the lichen *Hypogymnia physodes* deter detritivorous woodlice. *Fungal Ecol* 31:54–58. doi: 10.1016/j.funeco.2017.11.002
- Wink M (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64:3–19



---

## Erklärung zur Dissertation

Name/Anschrift

Paul Christian Wieners

wohnhaft in: Behmweg 6

24159 Kiel

Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation mit dem Titel:

**„Die Rolle der durch Austrocknung induzierten Grundfluoreszenz-  
löschung als Lichtschutzmechanismus in Grünalgen“**

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind. Teile der Arbeit sind bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung eingereicht worden.

Ich versichere, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist.

Mir wurde ferner kein akademischer Grad entzogen.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

