

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

BILJKE U SVEMIRSKIM ISTRAŽIVANJIMA – KRATKI PREGLED
ASTROBOTANIKE

PLANTS IN SPACE EXPLORATION – A SHORT OVERVIEW
OF ASTROBOTANY

Seminarski rad

Ana Izabela Talanga Vasari

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec

Zagreb, 2019.

Sadržaj

1. Uvod.....	2
2. Istraživanja prije izgradnje Međunarodne svemirske postaje.....	3
3. Istraživanja na Međunarodnoj svemirskoj postaji	5
4. Učinak mikrogravitacije (svemirski uvjeti).....	6
4.1. Utjecaj mikrogravitacije na gravitropizam.....	6
4.2. Utjecaj mikrogravitacije na fototropizam.....	7
4.3. Utjecaj mikrogravitacije na građu stanične stjenke.....	8
4.4. Utjecaj mikrogravitacije na ekspresiju gena.....	9
5. Oprema za uzgoj biljaka u svemirskim uvjetima.....	11
6. Problemi pri uzgoju i istraživanju biljaka u svemirskim uvjetima.....	13
7. Primjena istraživanja biljaka na održavanje života u svemiru – projekt MELiSSA.....	14
8. Zaključak - biljke su spremne za rast u svemiru.....	16
9. Literatura.....	17
10. Sažetak.....	20
11. Summary.....	20

1. Uvod

Astrobiologija je grana prirodoslovnih znanosti koja nije sasvim nova, no manje je poznata u javnosti. Radi se o jednom velikom multidisciplinarnom području koje obuhvaća mnogo više nego li samo ime govori. U ovo područje prvenstveno pripadaju istraživanja koja doprinose mogućnosti produljenog boravka ljudi u svemiru, a potom i kolonizacije izvanzemaljskih područja. To uključuje široki raspon područja tehnologije koja se mora razviti u ovu svrhu, od optimalnog prijenosa materijala u svemir pa do mogućnosti samoodrživosti izvan Zemljine orbite. Astrobiologija se također bavi istraživanjem ranog postanka života na Zemlji i mogućnošću postojanja izvanzemaljskih oblika života.

S obzirom na to da su ljudi evoluirali u specifičnim uvjetima koji trenutno vladaju na Zemlji, mogućnost kolonizacije novih staništa ovisi o sposobnosti reprodukcije tih uvjeta. Dostupnost kisika, vode i hrane prilagođene ljudskim potrebama je temeljni uvjet za preživljavanje, no za sada nije pronađeno niti jedno mjesto izvan Zemljine atmosfere koje bi zadovoljavalo ovaj uvjet. Da bi se uopće došlo do udaljenih planeta, recimo Marsa, potrebni su dugački letovi tokom kojih astronauti na svemirskih letjelicama moraju biti opskrbljeni svim potrebnim stvarima za život, a slanje gotove hrane je logistički skoro nemoguće radi same težine i veličine tereta koje bi to stvorilo. Radi toga je nužno razviti zatvoreni skoro samodostatni sustava koji bi uz minimalni dodatak energije i manipulacije mogao osigurati kisik, vodu i hranu za astronaute.

Biljke kao fotosintetski organizmi mogu osigurati kisik za disanje, služiti kao hrana astronautima i sudjelovati u procesu reciklaže i stvaranju tla za daljnji uzgoj. One sačinjavaju važne komponente ciklusa dušika i ugljika na Zemlji pa je potrebno imati dobar uvid u njihovu fiziologiju prilikom uspostave sustava mikroba i biljaka koji bi u budućnosti služili za dobivanje hrane i kisika.

Istraživanja u sklopu astrobotanike mogu se svrstati u dvije skupine (Barker i Gilroy 2017). Prva su istraživanja bioloških procesa radi boljeg razumijevanja same biljne fiziologije, poput recimo gravitropizama u uvjetima mikrogravitacije. Druga su istraživanja u praktične svrhe, tj. primjena biljaka za uzdržavanje života u svemiru ali i kakav psihološki utjecaj ima prisutnosti biljaka na astronaute koji se dulje periode vremena nalaze u skućenim prostorima svemirskih postaja.

U ovom kratkom pregledu pokušala sam objediniti što više aspekata astrobotanike počevši sa grubom podjelom perioda istraživanja. Postoji mnogo istraživanja iz perioda prije

izgradnje Međunarodne svemirske postaje (eng. *International Space Station*, dalje se koristi kao ISS), no na njihovim zaključcima se temelje daljnja istraživanja, poglavito ona nakon izgradnje ISS. Iz toga razloga sam prikazala više rezultata novijih istraživanja podijeljenih prema najčešćim temama istraživanja. Također sam spomenula samu opremu koja se koristi za eksperimente i naposljetku prodiskutirala neke od problema sa kojima se susreću istraživanja u svemirskim uvjetima. Za kraj sam smatrala važnim prezentirati konačni konkretni rezultat desetljeća istraživanja, a to su modeli zatvorenih sustava za uzdržavanje života na dugim svemirskim putovanjima.

2. Istraživanja prije izgradnje Međunarodne svemirske postaje

U najranijim fazama svemirskih letova na biljkama se nisu radili eksperimenti radi istraživanja njih samih, već su bile korištene kao bioindikator utjecaja svemirskih uvjeta na živa bića općenito. Tokom trajanja projekta Apollo, serije američkih svemirskih misija na Mjesecu, eksperimenti su bili ograničeni na prenošenje sjemenki u svemir. Jedna od takvih je serija eksperimenata pod nazivom *Biostack* na letjelicama Gemini i Apollo 1972. godine, a imala je kao cilj ustanoviti biološke efekte zračenja. Korištene su između ostaloga i sjemenke kukuruza i uročnjaka *Arabidopsis thaliana* za motrenje i praćenje utjecaja kozmičkog zračenja na organizme i procjenu opasnosti zračenja za astronaute (Bücker 1974). Materijal je držan blizu vanjskog omotača letjelice i ustanovljeno je da dolazi do oštećenja stanica, ali i popravka ovisno o sposobnosti organizma da zamijeni oštećene stanice (Bücker 1974). U slijedećem pokusu *Biostack III*, obavljenom 1975. tijekom test projekta suradnje Apollo-Soyuz, promatranjem klijavosti sjemenja izloženoga zračenju ustanovljene su abnormalnosti rasta jednoga embrija kukuruza *Zea mays* (<https://ntrs.nasa.gov/search.jsp?R=19760016000>). Taj embrio bio je pogođen u centralnoj regiji ionizirajućim zračenjem jačine između 100-150 keV/ μm (izraženo jedinicama za linearni prijenos energije), što je manje od srednje doze koje su primili drugi embriji i sjemenke toga eksperimenta (Peterson 1977). Tokom slijedećih desetljeća nizom eksperimenata to je opetovano potvrđeno, tako da je zaključeno kako dolazi do određenih mutacija tokom izlaganja zračenju (Paul i sur. 2013).

Astronaut Stu Roosa je tokom misije Apolla 14, 1971. godine na Mjesec ponio nekoliko stotina sjemenki bora, javora, američkog likvidambara, obalne sekvoje i duglazije (četinjača). Nažalost tokom povratka na Zemlju i dekontaminacije došlo je do nesreće, naime posude sa sjemenkama su pukle tokom dekontaminacije i smatralo se da sjemenje više nije vijabilno. To

se međutim ispostavilo netočnim kada su sjemenke poslane kao dar na razne lokacije, na primjer u službenu rezidenciju predsjednika Sjedinjenih Američkih Država te su isklijale. Danas se drveće koje potječe iz tih sjemenki naziva „Moon trees“, mjesečevo drveće (slika 1), a nalazi se na mnogo lokacija u Sjedinjenim Američkim Državama. Na sjemenkama, a kasnije drveću nisu izvođeni nikakvi eksperimenti, štoviše ne postoji niti potpuni registar drveća niti lokacija (https://nssdc.gsfc.nasa.gov/planetary/lunar/moon_tree.html).



Slika 1: Fotografija jednoga od "Mjesečevog drveća"
(<https://www.wired.com/2011/02/moon-trees/>).

Već 1964. godine Myers u radu „*Use of algae for support of the human in space*“ (Myers, 1964) predstavlja ideju korištenja algi za uzdržavanje ljudi u svemiru. Myers alge prvenstveno vidi kao izvor kisika, ali i kao djelomičan izvor hrane. Izračunavanje biomase algi, produkcije kisika i potreba za svjetlom daju bazičnu teoriju dizajna sustava za uzdržavanje života koji se bazira na kompromisu minimalne mase i potrebe za energijom.

Ideja o korištenju biljaka i algi u zatvorenom sustavu, za održavanje života u svemiru testirana je u BIOS-3 eksperimentu (Gitelson i sur. 1976). Ideja je bila stvoriti zatvoreni kontrolirani sustav povezivanjem svih tehnoloških procesa nužnih za ljudske potrebe dok bi kontrolu nad sustavom preuzeli ljudi koji u njemu žive. U tu svrhu konstruiran je eksperimentalni prostor koji se sastojao od dva odjeljka – prostora za život i prostora za uzgoj hrane (fitotroni), te tri faze uzgoja tokom kojih se naizmjenično koristili fitotroni (uzgoj

pšenice i raznog povrća) i kultivatori za alge roda *Chlorella* (<http://www.ibp.ru/science/bios3.php>). Zaključak je bio da na mikrobnj i imunološkoj razini standardi za uzdržavanje života nisu bili zadovoljeni, a na ovakve eksperimente nastavljaju se kasnije istraživanja u okviru MELiSSA sustava.

3. Istraživanja na Međunarodnoj svemirskoj postaji

Lansiranjem prvog modula u nižu Zemljinu orbitu u studenom 1998. godine započinje gradnja prve internacionalne svemirske postaje koja 2000. godine dobiva prvu stalnu posadu. Unatoč tome što su već prije postojale modularne svemirske postaje sa trajnim posadama, period nakon izgradnje ISS-a se u astrobotanici smatra velikim iskorakom u smislu istraživanja ponajviše radi napretka tehnologije (Paul i sur. 2013). To zajedno s dugotrajnom prisutnosti u nižoj orbiti otvara mogućnost istraživanja finijih mehanizama metaboličkih odgovora biljaka jer omogućuje razlikovanje različitih stresora u svemiru izolacijom svakog pojedinačno.

„Space shuttle era“ kako ju nazivaju Paul i sur. (2013) vrlo je važan period za astobotaniku. Trajala je sve do 2011. kada je NASA objavila prekid misija, a umjesto svemirskog transportnog sistema (eng. *Space shuttle*) dostava na ISS se obavljala preko ruskoga Soyuz. Ova era obilježena je napretkom tehnologije, većom nosivosti teretnih raketa, boljom povezanosti i mogućnosti većega broja ponavljanja pokusa te dugotrajnije izlaganje biljaka svemirskim uvjetima za istraživanje rasta, razvoja, klijanja, biokemije i molekularne biologije biljaka (Slika 2). Radovi prethodnoga perioda predstavljaju veliki problem za ekstrapolaciju i usporedbu podataka radi nedovoljno razvijene opreme (De Micco i sur. 2014), stoga će u ostatku teksta većina obrađenih radova biti iz novijeg perioda.



Slika 2: Rast uročnjaka *Arabidopsis thaliana* na Međunarodnoj svemirskoj postaji. Lijeva slika prikazuje biljku koja je rasla na Zemlji, a desna biljku koja je rasla u laboratoriju na ISS (preuzeto iz Kittang i sur. 2013)

4. Učinak mikrogravitacije (svemirskih uvjeta) na biljke

Tokom svoje evolucije biljke su bile izložene nizu stresnih uvjeta koji se u manjoj ili većoj mjeri pojavljuju i u uvjetima rasta na svemirskim postajama poput izloženosti kozmičkom zračenju i nedostatne opskrbe plinovima, no jednome stresu nikada nisu bile izložene, a to je mikrogravitacija. Stoga je detaljno poznavanje gravitropizma biljaka i njihova uzorka rasta u nedostatku unilateralnog gravitacijskog vektora važna stavka astrobotanike (Vandenbrink i Kiss 2016), ali vrijedi i obrnuto, sami uvjeti mikrogravitacije idealni su za istraživanje gravitropizama (Kittang i sur. 2015).

4.1. Utjecaj mikrogravitacije na gravitropizam

Dugo se smatralo da posebne stanice za percepciju gravitacije u organima biljaka funkcioniraju na principu gravitacijskog utjecaja na sedimentaciju škroba u prisutnim amiloplastima, tzv. statolitima. To bi značilo da je u uvjetima mikrogravitacija sedimentacija ovih plastida nasumična. Međutim pronađeno je upravo suprotno, naime sedimentacija amiloplasta u protonemi mahovine *Ceratodon purpureus* u uvjetima mikrogravitacije nije nasumična, već organizirana. Kontrole na klinostatu, uređaju koji omogućuje kretanje uzoraka u svim smjerovima čime biljka biva izložena gravitaciji iz svih smjerova gubeći jednosmjerni vektor za rast, potvrdile su ovaj pronalazak (Kern i sur. 2001). Pretpostavlja se da se radi o utjecaju mikrotubula, koji i inače sudjeluju u orijentaciji staničnih organela, na raspored amiloplasta. Gravitacijska sila utječe na napetost niti mikrotubula povezanih na organele. Razlika napetosti mikrotubula u ovisnosti o poziciji organela na koje su vezani, naspram

gravitacijskog vektora regulira njihovu polimerizaciju i depolimerizaciju. Međutim pronađeno je da i u odsutnosti gravitacije dolazi do organiziranog razmještanja amiloplasta što indicira da gravitacija međudjeluje s nekim intrinzičnim faktorima u stanici te da kretanje amiloplasta nije regulirano samo vanjskim faktorima tj. gravitacijom (Kern i sur. 2001). Ovaj mehanizam može biti način na koji se osigurava ne-nasumični rast organa jer mikrotubuli, a uključeni su i aktinski filamenti (Perbal i Driss-Ecole 2001), kompenziraju nedostatak gravitacijske sile vlastitim kretanjem (Kern i sur. 2001).

4.2. Utjecaj mikrogravitacije na fototropizam

Uz istraživanje gravitropizma, usko je povezano i istraživanje fototropizma biljaka, jer su za uspostavu vertikalne osi rasta biljaka potrebni različiti geotropni i fototropni odgovori korijena i izdanka. Gravitropizam je u izdanku negativan dok je u korijenu pozitivan. Suprotno se događa kod fototropizma, naime izdanak raste prema svjetlosti, a korijen je negativno fototropan i to najviše kao odgovor na jednosmjerno plavo svjetlo. U fototropnom odgovoru sudjeluju fotoreceptori fitokromi A i B (Kiss i sur. 2012).

Crveno svjetlo pojačava zakrivljenost hipokotila klijanaca i smanjuje efekte gravitropizma, pa se može pretpostaviti da će u uvjetima mikrogravitacije fototropizam klijanaca biti mnogo više izražen, tj. očekuje se da će određeni fototropni odgovori biljaka biti izraženi tek kada se ukloni mnogo jači stimulus gravitacije (Kiss i sur. 2012). Izlaganjem uročnjaka *A. thaliana* s mutacijama u genima za različite fitokrome plavom i crvenom svjetlu pronađeno je da su hipokotili klijanaca pokazali pojačani pozitivan fototropni učinak pri crvenom osvjetljenju u uvjetima mikrogravitacije.

Pod utjecajem plavoga svjetla na Zemlji, hipokotili pokazuju jaki pozitivni fototropni odgovor, a isto se događa i u uvjetima mikrogravitacije. S druge strane, korijen na Zemlji pokazuje vrlo slabi negativan odgovor na plavo svjetlo, dok je u uvjetima mikrogravitacije taj odgovor vrlo jak. No taj jaki negativno fototropni odgovor na plavo svjetlo slabi povećanjem gravitacijske sile do jačine od 0,3 g (Kiss i sur. 2012)

Ti eksperimenti provedeni u uvjetima od 1 g do 0,1 g, pokazali su da već pri 0,3 g dolazi do smanjenja inicijalno primijećenoga povećanja pozitivnog fototropizma hipokotila pri crvenom svjetlu i jakog negativnog fototropizma korijena pri plavom svjetlu, ukazujući da

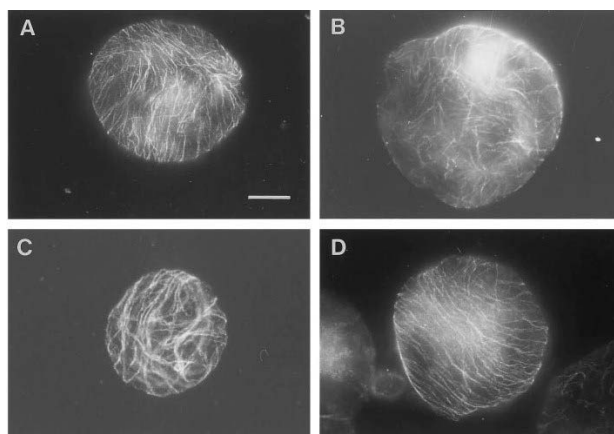
bi rast biljaka u gravitacijskom polju Marsa imao sličan mehanizam kao na Zemlji (Kiss 2014).

4.3. Utjecaj mikrogravitacije na građu stanične stjenke

Adaptacija biljaka na svemirske uvjete uključuje razlike u ekspresiji gena, a određeni dio tih promjena usmjeren je na remodeliranje stanične stjenke (Paul i sur. 2013). Stanična stjenka je glavna mehanička potpora biljnim stanicama stoga se očekuju određene promjene debljine i sastava u ovisnosti o jačini gravitacijske sile.

U uvjetima hipergravitacije povećava se debljina stanične stjenke uz povećanje količine celuloze, dok se u uvjetima mikrogravitacije rigidnost stanične stjenke smanjuje (Hoson i Soga 2003), također je pronađeno je da uvjeti mikrogravitacije mogu čak i stimulirati rast *A. thaliana* i riže (Hoson i Soga 2003). Razina celuloze, polisaharida matriksa i lignina bila je manja u hipokotilima *A. thaliana* izloženim uvjetima mikrogravitacije (Kittang Jost i sur. 2015).

Studije su pokazale da su stanice protoplasta *A. thaliana* mnogo osjetljivije na uvjete mikrogravitacije u odnosu na cjelovitu biljku. To su pokazali i pokušaji obnavljanja stanične stjenke nakon izlaganja kulture protoplasta uvjetima mikrogravitacije tokom 8-11 dana. Obnova stanične stjenke bila je mnogostruko sporija naspram kontrolnih stanica, a regenerirane stanice više nisu bile sposobne razviti se u zrele biljke (Kittang Jost i sur. 2015). Istraživanja orijentacije kortikalnih mikrotubula u uvjetima različite jačine gravitacijske sile pokazala su da dolazi do promjene u njihovoj orijentaciji u ovisnosti o jačini gravitacijske sile (slika 3). Naime protoplasti izloženi sili od 0 g pokazuju nasumični raspored kortikalnih mikrotubula naspram protoplasta izloženih silama od 1 g (uvjeti na Zemlji), 7 g, i 10 g čiji kortikalni mikrotubuli su linearno raspoređeni jedan naspram drugoga (Skagen i Iversen 2000). Analizom ekspresije gena nađeno je da se od gena vezanih uz remodeliranje stanične stjenke dodatno induciraju ekspanzinu srodni geni, ekstenzini, pektinaze i hitinaze (Kittang Jost i sur. 2015).



Slika 3: Orijehtacija kortikalnih mikrotubula u protoplastima nakon 48 sati izlaganja raznim jakostima sile teže: 1 g (A), 0 g (B), 7 g (C), 10 g (D) (preuzeto iz Skagen i Iversen 2000)

4.4. Utjecaj mikrogravitacije na ekspresiju gena

Usporedbom transkriptoma klijanaca i kulture stanica pronađeno je da nediferencirane stanice bolje detektiraju promjene asocirane sa svemirskim uvjetima tj. mikrogravitacijom naspram biljaka s intaktnim organima (Paul i sur. 2012). Klijanci i nediferencirana kultura stanica *A. thaliana* testirani su tokom paraboličnog leta (ovakvi letovi koriste se za kratkotrajnu indukciju bestežinskog stanja pomoću slobodnog pada) 2010. godine kao dio BRIC-16 serije eksperimenata NASA-e kojima je cilj bio istražiti ekspresiju gena i rast korijena uročnjaka *A. thaliana*. Usporedbom genske ekspresije klijanaca kontrole sa Zemlje i klijanaca izloženih mikrogravitaciji potonji su pokazali umjereni odgovor. Samo nekoliko gena je bilo do 7 puta jače eksprimirano, ali bez velike razlike u diferencijalnoj ekspresiji. Kulture nediferenciranih stanica su nasuprot tome pokazale velike razlike u ekspresiji i to najviše kod gena povezanih sa proteinima toplotnog šoka (eng. *Heat Shock Proteins*, odsada na dalje u tekstu HSP) i stresnim odgovorom, čiji transkripti su bili značajno jače eksprimirani u uzorcima stanica koje su bile izložene mikrogravitaciji tijekom leta.

Međutim nisu svi radovi jednoznačno ukazivali na povećanje ekspresije gena HSP (Paul i sur. 2013). Pronađeno je da pri duljem izlaganju uvjetima mikrogravitacije u stanicama protoplasta uročnjaka *A. thaliana* dolazi do indukcije gena HSP sustava, no pri kraćem izlaganju kao što su na primjer parabolični letovi i slobodni pad, stanice ne pokazuju razliku u ekspresiji ovih gena naspram kontrolnih stanica sa Zemlje (Zupanska i sur. 2013). To

implicira da je indukcija HSP dio kasnog odgovora prilikom adaptacije na uvjete mikrogravitacije.

I drugi radovi su pokazali da postoji razlika u ekspresiji gena biljaka izloženih svemirskim uvjetima u odnosu na kontrolne biljke. Praćenjem 1500 proteina u biljci *A. thaliana* ustanovljeno je 256 proteina u listu i 358 proteina u korijenu koji su različito eksprimirani naspram kontrolnih biljaka na Zemlji (Ferl i sur. 2015). To također dovodi do zaključka da postoji i razlika u indukciji gena na razini tkiva tijekom svemirskog leta (Ferl i sur. 2015).

U ruskom stakleniku za uzgoj biljaka „Lada“ na ISS-u od ožujka 2003. do travnja 2005. proveden je eksperiment uzgoja četiri generacije patuljastoga graška (slika 4). Biljke su prolazile cijeli ciklus razvoja bez gubitka reproduktivne sposobnosti i svaki put stvorile vijabilno sjeme (Sychev i sur. 2006). Genetičkom analizom i usporedbom sa biljkama koje su rasle na Zemlji utvrđeno je da nije došlo do kromosomskih niti genetičkih aberacija. Stoga je zaključeno da rast i izlaganje svemirskim uvjetima tijekom nekoliko generacija rasta u svemirskim uvjetima ne utječe na sposobnost rasta i reprodukcije biljaka (graška) (Sychev i sur. 2006).



Slika 4: Grašak uzgojen na ISS u stakleniku za uzgoj Lada (preuzeto iz Sychev i sur. 2006)

Istraživanja na biljkama koje se mogu koristiti za jelo rađena su između ostaloga i na japanskoj biljci mizuna, kultivaru *Brassicca rapa*. Biljke su 27 dana rasle na ISS-u u stakleniku za uzgoj Lada, a podatci su dobiveni analizom mRNA te su pokazali značajne razlike u ekspresiji gena naspram kontrole koja je rasla na Zemlji (Sugimoto i sur. 2014). Radilo se o 20 od 32 gena povezanih uz regulaciju oksidativnog stresa koji su u biljaka sa ISS-a bili jače eksprimirani ukazujući na stres. No, obećavajuća je bila činjenica da su biljke na svemirskoj postaji baš kao i biljke na Zemlji rasle i razvijale se normalno, što ukazuje da se nakon dugoročnog izlaganja mogu aklimatizirati na uvjete na svemirskoj postaji (Sugimoto i sur. 2014).

5. Oprema za uzgoj biljaka u svemirskim uvjetima

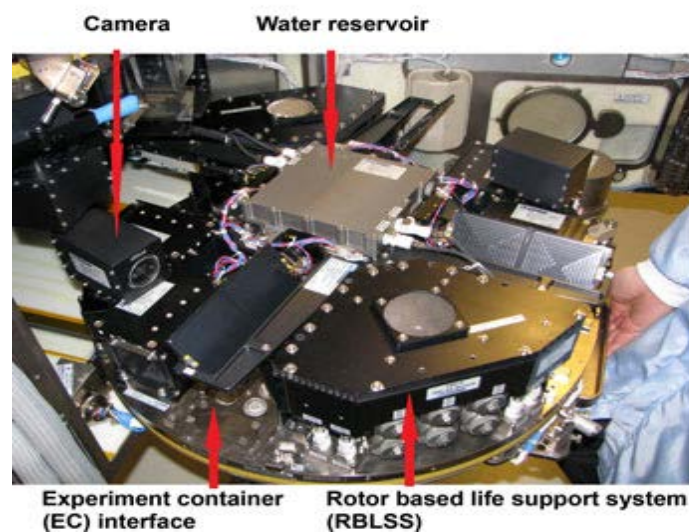
Lada je naziv za sistem staklenika koji je razvila Ruska svemirska agencija (), a sastoji se od kontrolnog modula i dva vegetativna za uzgoj biljaka radi usporedbe tretmana. Jedan od načina na koji se koristi ovaj sistem jest da se biljkama koje rastu u njemu regulira samo svjetlost, no ne i drugi parametri, pa rastu u zraku, temperaturi, vlazi i mikrogravitaciji tj. uvjetima koji vladaju u prostorima ISS-a u kojima žive i sami astronauti. Time se testira jesu li biljke koje rastu u takvim uvjetima sigurne za jelo astronautima, te se istražuju radi moguće mikrobne kontaminacije (https://www.nasa.gov/missions/science/f_lada.html)

NASA ima nekoliko razvijenih patenata za provođenje eksperimenata na svemirskoj postaji. Njihov ekvivalent spomenute ruske Lade je Sustav za napredna biološka istraživanja eng. *Advanced Biological Research System (ABRS)*, koji se sastoji od dvije komore za rast biljaka (https://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/news/wklysumm_week_of_jan21.html). Svaka komora je zatvoreni sistem koji neovisno kontrolira temperaturu, osvijetljenost i sastav plinova u unutrašnjosti.

Drugi tip opreme za izvođenje eksperimenata zove se zajedničkim imenom Biološka istraživanja u limenkama eng. *Biological Research in Canisters* (od sada na dalje u tekstu kao BRIC). Koristi se za testiranje malih bioloških uzoraka poput kalusa, klijanaca, mikroba i dr. koji se najčešće u Petrijevim zdjelicama stavljaju u aluminijske kutije ili cilindre (https://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/experiments/explorer/Investigation.html?id=697). Postoji nekoliko različitih verzija i adaptacija ovog sistema za razna istraživanja. Zajednička crta dizajna BRIC-60, BRIC-100 i BRIC-100VC je da se uzorci u Petrijevim zdjelicama različitih promjera slažu u aluminijski cilindar gdje se provodi

eksperiment. Unutra se održava konstantno svjetlo, a ovisno o verziji može se uzorkovati plinove iz zdjelica ili kontrolirati atmosferu u unutrašnjosti. Cilindri pod nazivom BRIC-PDFU (eng. *Petri Dish Fixation Unit*) koriste polikarbonatne blokove u koje se uliježu Petrijeve zdjelice s uzorcima te se sve zajedno drži u aluminijskim kutijama. Polikarbonatni blokovi omogućuju dodavanje hranjivih tvari ili otopine za fiksaciju uzoraka. Cilindri BRIC-LED imaju sličan dizajn samo s dodanim individualnim osvjetljenjem za svaku Petrijevu zdjelicu. Cijeli dizajn BRIC sistema minimalizira vrijeme koje astronauti moraju posvetiti eksperimentu.

Sistem koji je razvila Europska svemirska agencija (eng. European Space Agency od sada pa nadalje u tekstu kao ESA) zove se Europski modularni sistem za uzgoj bilja (eng. *European Modular Cultivation System*) i također se nalazi na ISS-u (slika 5). Dizajniran je za istraživanje i poboljšanje standardiziranih procedura uzgoja biljaka. Sastoji se od inkubatora sa dva centrifugalna rotora, a svaki rotor ima mjesta za četiri eksperimentalna kontejnera, dvije kamere, rezervoar za vodu i dva sistema za održavanje života. Postoji mogućnost nadodavanja opreme u ovisnosti o potrebama eksperimenta i tada se taj dio naziva EUE (Experiment Unique Equipment) i do sada su razvijena tri takva dodatka (Kittang i sur. 2013).



Slika 5: Europski sustav za uzgoj bilja (EMCS) izvana (preuzeto iz Kittang i sur. 2013)

Na Zemlji postoji identični model, EMCS-EM (Engineering Model) koji se koristi za tehničke varijacije, testiranja prije leta ili uzgoj kontrola. Nakon godina eksperimenata na ISS-u utvrđeno je da je uzgoj viših biljaka u svemirskim uvjetima moguć pod kontroliranim uvjetima na dulje vremenske periode (Kittang Jost i sur. 2015).

6. Problemi pri istraživanju i uzgoju biljaka u svemirskim uvjetima

Istraživanja rasta i razvoja biljaka u svemirskim uvjetima nailazi na niz problema koji počivaju na činjenici da se najčešće odvijaju u nižoj orbiti oko Zemlje. To znači da je pristup eksperimentalnom prostoru otežan kao i prilagođavanje procedure. Svaka sastavnica mora biti pomno isplanirana jer se ograničenja nalaze na svakom koraku počevši od mase instrumenata koji sudjeluju u eksperimentu, njihove veličine, trajanja misija (ili leta), te broja replika u eksperimentu. Također i činjenica da eksperiment ne obavljaju sami znanstvenici već se astronaute, koji već ionako imaju niz zadaća, podučava protokolu. Naravno ne smije se zanemariti niti sama cijena transportnih letova za dostavljanje opreme i eksperimenata na ISS.

Problem kod ranih eksperimenata bio je korištenje različitih protokola i vrsta biljaka što ne samo da otežava usporedbu eksperimentalnih podataka, već daje i oprečne rezultate (Paul i sur. 2013, Marker i Gilroy 2017). Problemi pri razlikovanju različitih odgovora na svemirske uvjete rezultati su i nedostatka adekvatne kontrole, naime za usporedbu su korištene kontrole uzgojene na Zemlji, no nije postojala 1 g kontrola na svemirskoj postaji (Paul i sur. 2013). Ali čak i kada postoji 1 g kontrola upozorava se na gradijent gravitacije koji se stvara u ovisnosti o udaljenosti uzorka od centra rotora što znači da su uzorci bili izloženi različitim jačinama sile. To se može riješiti povećanjem radijusa centrifuge no to ograničava veličina prostora na svemirskoj postaji (Vandenbrink i Kiss 2016).

Radi već gore spomenutih tehničkih problema broj radova koji se bavio istraživanjima na biljkama u svemirskim uvjetima rastao je vrlo sporo i bilo je potrebno određeno vrijeme da se ustanove standardni protokoli i modelni organizmi. Vrste biljaka koje se najčešće koriste su *A. thaliana* i *B. rapa* zato što su laboratorijski modelni organizmi, no imaju vrlo ograničenu praktičnu primjenu i malu biomasu. Za bioregenerativno održavanje života potrebna je velika biomasa, ali i veći genetski diverzitet radi utjecaja bolesti na monokulture (Vandenbrink i Kiss 2016). Također, Vandenbrink i Kiss (2016) upozoravaju na korištenje malog broja vrsta i ekotipova u eksperimentima. S obzirom na činjenicu da se neki ekotipovi *A. thaliana* jako razlikuju, npr. odgovori u korijenu mogu biti različiti i do 100% to dovodi u pitanje mogućnost ekstrapolacije podataka na druge vrste.

Ono što je također malih dimenzija jesu i staklenici koji se koriste za rast biljaka što ne samo ograničava količinu materijala već možda djelomično i pridonosi stresnom odgovoru induciranom u biljaka. Veličina kontejnera proizlazi iz samoga dizajna sistema za kultivaciju i dostupnosti prostora na postaji.

Vrijedi spomenuti još nekoliko problema koji zaostaju unatoč napretku tehnologije. Jedan od njih je nedostatak konvekcijskog strujanja zraka u staklenicima koji su trenutno u uporabi na ISS-u. To stvara jaki gradijent plinova, pa se dostupnost kisika svodi na brzinu difuzije što nije dovoljno za brzo rastuća tkiva poput korijena te dolazi do hipoksije (Barker i Gilroy 2017). U nedostatku ventilacije akumulira se etilen čija prisutnost ometa mikrosporogenezu i druge reproduktivne procese (De Micco i sur. 2014). Također postoji problem sa spremanjem uzoraka koji se javlja u eksperimentima ekspresije gena jer postoji period između kraja eksperimenta i očuvanja uzorka. Pokazano je da u vrste *A. thaliana* već unutar dvije minute dolazi do indukcije novih gena pod mehaničkom i svjetlosnom stimulacijom tijekom čuvanja uzoraka (Yano i sur. 2013), a preparacija materijala iz EMCS-a ovisno o tehničkim mogućnostima može trajati i do dva sata (Kittang Jost i sur. 2015).

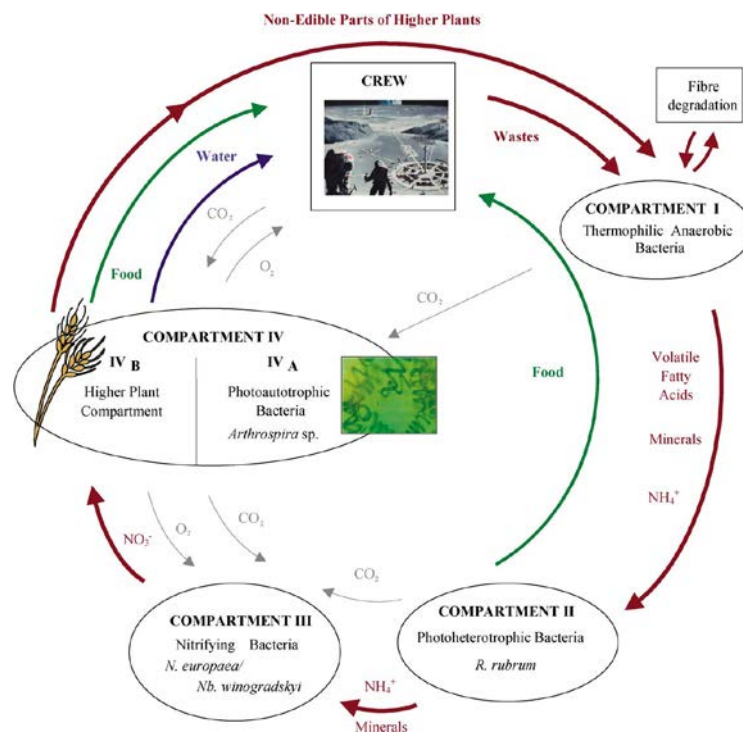
7. Primjena biljaka u sustavima za održavanje života u svemiru – projekt MELiSSA

U fazi razvoja nalazi se nekoliko bioregenerativnih sistema na kojima eksperimentiraju zemlje koje su slale module za izgradnju ISS. Američka NASA razvija CELLS (*Closed Ecological Life Support System*) koji za razliku od drugih uključuje i uzgoj domaćih životinja, a Japan razvija CEEF (*Closed Ecological Experimentation Facility*) (Hendrickx i sur. 2005).

Europska ESA razvija MELiSSA sustav za održavanje života. On kombinira aktivnost različitih organizama (mikrobne kulture, biljke i ljudska posada) za recikliranje plinovitih, tekućih i krutih otpadnih tvari (Lasseur i sur. 2010). Ideja se bazira na kruženju nutrijenata u stupcu vode jezera, posebice soda jezera kao što je na primjer Lake Bogovia u Keniji.

Sustav MELiSSA sastoji se od nekoliko odjeljaka unutar kojih se odvija niz reakcija razlaganja otpada i regeneracije esencijalnih tvari (slika 6). Kao izvor hrane je odabrana cijanobakterija *Arthrospira* sp. (poseban PCC8005 soj) radi visokoga sadržaja proteina, vitamina i esencijalnih masti. Uz odjeljak s cijanobakterijama kao izvorom hrane i za proizvodnju kisika koristi se i odjeljak s višim biljkama. Zatim slijedi odjeljak za reciklažu otpada gdje se u nekoliko koraka mikrobnom aktivnošću razgradi otpad. Likvefakcija (transformacija organskih polimera ekstracelularnim enzimima u monomere), a zatim acidogeneza (razlaganje monomera na intermedijarne produkte fermentacije) i metanogeneza (koja se u biti pokušava ograničiti da ne bi došlo do gubitka ugljika) su koraci koje obavljaju

mješovite kulture termofilnih anaerobnih bakterija. U slijedećem odjeljku se razgrađuju plinoviti otpadci i masne kiseline uz pomoć fotoheterotrofnih anaerobnih bakterija (izabran *Rhosospirillum rubrum*). Poseban odjeljak je potreban za nitrifikaciju amonijaka iz otpada u nitrate kako bi ga mogle koristiti biljke i cijanobakterije. Teorijski, a i u praksi ovaj sustav je isproban, no pojedine komponente nisu testirane na utjecaj mikrogravitacije i zračenja, tako da stabilnost sustava u svemirskim uvjetima još nije potvrđena (Hendrickx i sur. 2005).



Slika 6: Shema odjeljaka i njihovih uloga unutar MELiSSA (preuzeto iz Hendrickx i sur. 2005)

8. Zaključak - biljke su spremne za rast u svemiru

Dva glavna zaključka koja se mogu izvući iz sada već pola stoljeća istraživanja jesu, prvo, da biljke rastu u svemiru, ali da još ne znamo koliko efikasno, i drugo, da uvjeti tijekom svemirskih letova u biljkama uzrokuju široki raspon odgovora povezanih sa stresom (Barker i Gilroy 2017).

Unatoč indukciji stresnog odgovora, biljke su pokazale da su sposobne aklimatizirati se na te uvjete i nastaviti sa rastom. Međutim u tim pokusima one su rasle u izoliranim sustavima, a za uspostavu sustava za održavanje života tijekom dugačkih letova moraju se integrirati u veće bioregenerativne sustave. Takvi sustavi su za sada tek u ranom stadiju razvoja i nisu još testirani u svemirskim uvjetima.

S druge strane, poboljšanje tehnologije i veća učestalost kontakta između Zemlje i ISS-a otvara niz novih mogućnosti znanstvenim istraživanjima iz fiziologije i genetike biljaka. To će zauzvrat doprinijeti i efikasnijem korištenju biljaka za praktične svrhe u svemiru, te u konačnici omogućiti ljudima dulja izbjivanja i dalje letove za istraživanje svemira.

9. Literatura

- Barker, R., & Gilroy, S. (2017). Life in space isn't easy, even if you are green. *Biochemist*, 39(6), 10-13.
- Bücker, H. (1974). The Biostack experiments I and II aboard Apollo 16 and 17. *Life sciences and space research*, 12, 43-50.
- De Micco, V., De Pascale, S., Paradiso, R., & Aronne, G. (2014). Microgravity effects on different stages of higher plant life cycle and completion of the seed to seed cycle. *Plant Biology*, 16, 31-38.
- Ferl, R. J., Koh, J., Denison, F., & Paul, A. L. (2015). Spaceflight induces specific alterations in the proteomes of Arabidopsis. *Astrobiology*, 15(1), 32-56.
- Gitelson, I. I., Terskov, I. A., Kovrov, B. G., Sidko, F. Y., Lisovsky, G. M., Okladnikov, Y. N., ... & Rerberg, M. S. (1976). Life support system with autonomous control employing plant photosynthesis. *Acta Astronautica*, 3(9-10), 633-650.
- Hendrickx, L., De Wever, H., Hermans, V., Mastroleo, F., Morin, N., Wilmotte, A., ... & Mergeay, M. (2006). Microbial ecology of the closed artificial ecosystem MELiSSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative): reinventing and compartmentalizing the Earth's food and oxygen regeneration system for long-haul space exploration missions. *Research in microbiology*, 157(1), 77-86.
- Hoson, T.; Soga, K. (2003) New aspects of gravity responses in plant cells. *International Review of Cytology*, 229, 209–244.
- Jost, A. I., Hoson, T., & Iversen, T. H. (2015). The utilization of plant facilities on the international space station—the composition, growth, and development of plant cell walls under microgravity conditions. *Plants*, 4(1), 44-62.
- Kern, V. D., Smith, J. D., Schwuchow, J. M., & Sack, F. D. (2001). Amyloplasts that sediment in protonemata of the moss *Ceratodon purpureus* are nonrandomly distributed in microgravity. *Plant Physiology*, 125(4), 2085-2094.
- Kiss, J. Z., Millar, K. D., & Edelmann, R. E. (2012). Phototropism of *Arabidopsis thaliana* in microgravity and fractional gravity on the International Space Station. *Planta*, 236(2), 635-645.

- Kiss, J. Z. (2014). Plant biology in reduced gravity on the Moon and Mars. *Plant Biology*, *16*, 12-17.
- Kittang, A. I., Iversen, T. H., Fossum, K. R., Mazars, C., Carnero-Diaz, E., Boucheron-Dubuisson, E., ... & Medina, F. J. (2014). Exploration of plant growth and development using the European Modular Cultivation System facility on the International Space Station. *Plant Biology*, *16*(3), 528-538.
- Kranz, A. R. (1986). Genetic and physiological damage induced by cosmic radiation on dry plant seeds during space flight. *Advances in Space Research*, *6*(12), 135-138.
- Myers, J. (1964). Use of algae for support of the human in space. *Life sciences and space research*, *2*, 323-336.
- Paul, A. L., Zupanska, A. K., Ostrow, D. T., Zhang, Y., Sun, Y., Li, J. L., ... & Ferl, R. J. (2012). Spaceflight transcriptomes: unique responses to a novel environment. *Astrobiology*, *12*(1), 40-56.
- Paul, A. L., Wheeler, R. M., Levine, H. G., & Ferl, R. J. (2013). Fundamental plant biology enabled by the space shuttle. *American journal of botany*, *100*(1), 226-234.
- Peterson, D. D., Benton, E. V., Tran, M., Yang, T., Freeling, M., Craise, L., & Tobias, C. A. (1977). Biological effects of high-LET particles on corn-seed embryos in the Apollo-Soyuz Test Project--Biostack III experiment. *Life sciences and space research*, *15*, 151-155.
- Skagen, E.-B.; Iversen, T.-H. (2000) Effect of simulated and real weightlessness on early regeneration stages of *Brassica napus* protoplasts. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, *36*, 312–318.
- Sugimoto, M., Oono, Y., Gusev, O., Matsumoto, T., Yazawa, T., Levinskikh, M. A., ... & Hummerick, M. (2014). Genome-wide expression analysis of reactive oxygen species gene network in Mizuna plants grown in long-term spaceflight. *BMC plant biology*, *14*(1), 4.
- Sychev, V. N., Levinskikh, M. A., Gostimsky, S. A., Bingham, G. E., & Podolsky, I. G. (2007). Spaceflight effects on consecutive generations of peas grown onboard the Russian segment of the International Space Station. *Acta Astronautica*, *60*(4-7), 426-432.

- Vandenbrink, J. P., & Kiss, J. Z. (2016). Space, the final frontier: a critical review of recent experiments performed in microgravity. *Plant Science*, 243, 115-119.
- Yano, S.; Kasahara, H.; Masuda, D.; Tanigaki, F.; Shimazu, T.; Suzuki, H.; Karahara, I.; Soga, K.; Hoson, T.; Tayama, I. (2013). Improvements in and actual performance of the Plant Experiment Unit onboard Kibo, the Japanese Experiment Module on the International Space Station. *Advances in Space Research*, 51, 780–788.
- Zupanska, A. K., Denison, F. C., Ferl, R. J., & Paul, A. L. (2013). Spaceflight engages heat shock protein and other molecular chaperone genes in tissue culture cells of *Arabidopsis thaliana*. *American Journal of Botany*, 100(1), 235-248.

Web izvori

- https://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/experiments/explorer/Investigation.html?id=795, pristupljeno 19.09.2019
- https://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/news/wklysumm_week_of_jan21.html, pristupljeno 19.09.2019
- <https://www.wired.com/2011/02/moon-trees/>, pristupljeno 16.09.2019
- https://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/experiments/explorer/Investigation.html?id=697, pristupljeno 19.09.2019.
- https://www.nasa.gov/missions/science/f_lada.html, pristupljeno 19.09.2019.
- <https://ntrs.nasa.gov/search.jsp?R=19760016000>, pristupljeno 19.09.2019
- <http://www.ibp.ru/science/bios3.php>, pristupljeno 19.09.2019
- https://nssdc.gsfc.nasa.gov/planetary/lunar/moon_tree.html, pristupljeno 13.09.2019

10. Sažetak

Astrobotanika se bavi istraživanjem rasta i razvoja biljaka u svemirskim uvjetima. Istraživanja u ovom području počinju već od najranijih dana čovjekova istraživanja svemira jer biljke kao fotosintetski organizmi uz minimalni dodatak energije u obliku svjetlosti i esencijalnih hranjivih tvari, mogu osigurati kisik i hranu posadi svemirskih letjelica. U istraživanjima se koriste sjemenke, klijanci, kalusne kulture ili pak kulture protoplasta kako bi se ustanovile sve promjene koje se događaju u biljnom metabolizmu u svemirskim uvjetima. Zabilježen je niz promjena poput indukcije stresnog metabolizma biljaka ili prilagodbi stanične stjenke, no unatoč tome biljke su bile sposobne aklimatizirati se na nove uvjete. Pokazalo se da su rast i razvoj biljaka u staklenicama na svemirskoj postaji mogući tijekom nekoliko generacija uz stvaranje vijabilnog sjemenja. Trenutačno se istražuje nekoliko sustava sa ciljem integracije biljaka u sustave za održavanje života koji bi trebali omogućiti dulji i samostalniji boravak ljudi u svemiru bez potrebe za opskrbom sa Zemlje pa tako Europska svemirska agencija (ESA) razvija bioregenerativni sustav pod imenom MELiSSA. Kruženje tvari unutar ovoga sustava trebalo bi pomoći posadama duljih letova da sami regeneriraju potrebne esencijalne elemente uz njihov minimalni gubitak.

11. Summary

The main focus of astrobotanical research is growth and development of plants in space. Plants have been part of space research since its earliest years and have been recognized as valuable resource to support human life in space. Due to their photosynthetic activity it is possible to grow them for food and oxygen production, with minimal energy and nutrient input. They are tested as seeds, shoots, callus and protoplast cultures in order to identify changes that take place when exposed to space conditions. A number of changes have been identified in plants grown in space compared to plants grown on Earth, mainly the activation of stress metabolism related genes and remodelling of the cell wall structure, however plants were able to adapt and grow. Growth and development of healthy plants that produce viable seeds is possible in space even over a number of generations. At the moment, there are a few designs in development for the integration of plants into life support systems. One of such is a bioregenerative system named MELiSSA (by European Space Agency), based on the circulation of elements in order to regenerate nutrients and enable longer space flights.