

## ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВЗАИМОВРЪЗКАТА ФИЗИОЛОГИЧЕН ОТГОВОР НА РАСТЕНИЯ PISUM SATIVUM И LACTUCA SATIVA КЪМ УСЛОВИЕ ХИПОКСИЯ ВЪЗНИКВАЩО В „КОСМИЧЕСКАТА ПОЧВА” ПРИ КУЛТИВИРАНЕ В КОСМИЧЕСКА СРЕДА

**Илиана Илиева**

*Институт за космически изследвания и технологии – Българска академия на науките  
e-mail: iliana\_ilieva@space.bas.bg*

**Ключови думи:** *взаимовръзка „хипоксия-физиологичен статус“, салата, грах, космическа оранжерия*

**Резюме:** *В настоящото изследване ще бъдат представени резултатите от пилотни лабораторни експерименти за изследване на взаимовръзката между физиологичния отговор на растенията грах *Pisum sativum* и салата *Lactuca sativa* към условие хипоксия, възникващо в ”космическата почва” при отглеждане на растенията в космическа среда. С тези експерименти се цели да се формира база от данни, с отговора на растенията към условията на околната среда възникващи в космическата оранжерия в микрогравитация.*

## INTERRELATIONSHIP OF PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF PLANTS PISUM SATIVUM AND LACTUCA SATIVA TO HYPOXIA CONDITION OCCURRING IN THE “SPACE SOIL” DURING PLANT GROWING IN SPACE

**Iliana Ilieva**

*Space Research and Technology Institute – Bulgarian Academy of Sciences  
e-mail: iliana\_ilieva@space.bas.bg*

**Keywords:** *“hypoxia- physiological status” interaction, peas, lettuce, space greenhouse*

**Abstract:** *The present study will present the results of pilot laboratory experiments to investigate the interrelationship between physiological response of peas *Pisum sativum* and lettuce *Lactuca sativa* to hypoxia condition occurring in the “space soil” during plant growing in space. These experiments aim to form a database with plant responses to the environmental conditions occurring in the space greenhouse in microgravity.*

### **Въведение**

Растенията ще изпълняват важна роля във функционирането на бъдещата Биорегенеративна система за осигуряване на живота (БСОЖ) на екипажите при продължителните мисии, основаваща се на способността им да пречистват въздуха чрез процеса фотосинтеза и водата чрез процеса транспирация. Растенията ще служат също за храна, както и ще бъдат източник на суровини и материали. Експериментите с растенията в космически условия започват през 1971 г. и днес повече от 50 години по-късно са постигнати фундаментални резултати, но все още темповете на растеж, развитие и репродукция на растенията са недостатъчни, за да се осигури устойчивото функциониране на БСОЖ. Като причина за това се посочва възникването на неблагоприятни, стресови условия в контролираната околна среда (ОС), която космическата оранжерия (КО) създава за отглеждане на растенията [1]. Установените стресови условия са:

- недостиг на кислород (НК) (хипоксия) за корените на растенията в кореновия модул (КМ) на КО;
- липса на естествена конвекция във въздушната среда на КО;

- незадоволителни характеристики на изкуствената светлина;
- наличие на газ етилен във въздушната среда в концентрации над допустимите за растенията.

От една страна, тези условия възникват поради изискванията за малък обем и маса, както и ниска консумация на енергия от апаратурата, оперираща на борда [9]. За да се спазят енергийните и конструктивни ограничения и досега КО се конструират с малки размери и в тях отсъстват системи, които да осигуряват определени условия на средата и/или липсват системи за мониторинг и/или контрол на даден параметър на ОС [1, 16].

От друга страна, в отсъствие на гравитация редица физични процеси като конвекция, топлообмен, хидродинамика на флуидите, масообменни процеси, наличието на градиенти в концентрацията на субстанциите, седиментация и др., или не съществуват, или са силно повлияни от микрогравитацията [10, 14, 19]. В допълнение във всички разработени до момента КО, контролът на ОС се осъществява на един и същ принцип, който се състои в регулиране на съответните параметри около предварително зададени прагови стойности (установен режим). Праговете стойности за всеки климатичен параметър обикновено са извлечени от евристични знания и/или емпирични изследвания с всяко конкретно растение, предназначено за отглеждане в космически условия. При този подход, изменените характеристики на описаните по-горе процеси водят до явления в контролираната от сензори среда на КО, които не се улавят от сензорите, и по този начин смущенията в ОС и нейните ефекти върху растенията не се отчитат и не се включват в контрола. Следователно, въвеждането на методи за контрол, които да са в състояние да компенсират ефектите от изменените характеристики на околната среда върху растежа и развитието на растенията в микрогравитация са необходими за създаването на оптимална среда за отглеждане на растения.

Концепция за адаптивен контрол на параметрите на ОС в КО, която се разработва, за да бъде приложена в трето поколение КО Свет (КО Свет-3) [6] предвижда контрола на параметрите на ОС да се извършва не само въз основа показанията на сензорите, но и въз основа на обратна връзка от самите растения, така че условията на ОС да се създават съобразно физиологичния статус и изискванията на растенията.

Възможно ли е динамиката на физиологичните показатели на растенията в отговор на условията на средата, в която са отглеждани, да бъде използвана като обратна връзка при контрола на създаваните условия в КО с цел оптимизирането им? За да се даде отговор на този въпрос са необходими изследвания за взаимовръзката стресово условие, възникващо в ОС на КО с физиологичния отговор на растенията.

Резултатите от експерименти с различни видове растения проведени в космически условия показват, че хипоксия са изпитвали, както растенията, отгледани в космическите оранжерии от серията Оазис на космически станции Салют [12], така и растенията, отгледани на космическите совалки [13, 15, 18], а също растенията *Brassica rapa* отгледани в КО Свет-2 на Мир [18], както и растенията *Brassica rapa*, отгледана в Biomass Production System [11], *Arabidopsis thaliana* в Advanced Astroculture [7], салата *Lactuca sativa* cv. „Outredgeous” и циния *Zinnia hybrida* cv. „Profusion” във Veggie [8] на Международната космическа станция. Доказателство за наличието на хипоксия са специфичните характеристики на растенията, като прорастване на корените извън субстрата [3, 8, 12], синтезът на в пъти повече от ензима Алкохолдеhidрогеназа (АДХ) в тъканите на корените [13, 15], повишеното съдържание на захари [18] и вторични метаболити [11] в листата, както и гутация, и видими следи от преовлажняване на порьозната среда-субстрат, разработен на основата на зеолит или глина, използван като „космическа почва” [8].

Причините за възникване на НК (хипоксия) в КМ на КО се дължи на изменената хидродинамика на флуидите- подадената водата се разпространява бавно в обема на субстрата и не дренира. В процеса на контрол на влажността в субстрата в микрогравитацията се наблюдават следните явления:

- фронтът на омокряне е неравномерен- наблюдават се зони с преференциално омокряне и изолирани сухи зони [17];

- в микрогравитация, подадената вода се разпространява по повърхността на порите в субстрата като образува филм, който, удебелявайки се, може да затвори балонче въздух в пората [2];

- в процеса на омокряне и изсушаване на субстрата се наблюдава пренареждане на субстратните частици [21]. В резултат на тези явления възниква хетерогенна влажност в обем на субстрата и едновременно могат да се образуват зони с повишена влажност и зони със засушаване, като НК може да възникне и в двете.

Цел на настоящето изследване е да се проведат пилотни лабораторни експерименти за да се изследва взаимовръзката между физиологичния отговор на растенията грах *Pisum sativum* и салата *Lactuca sativa* към условие хипоксия, възникващо в ”космическата почва” при отглеждане

на растения в космическа среда. Тези растения са избрани за отглеждане в бъдещите БСОЖ, тъй като грахът е богат на протеини, а салатата се характеризира с бърз растеж и богата на витамини, и микронутриенти биомаса [20].

## Методи и материали

### Наземни методи за пресъздаване на стрес недостиг на кислород

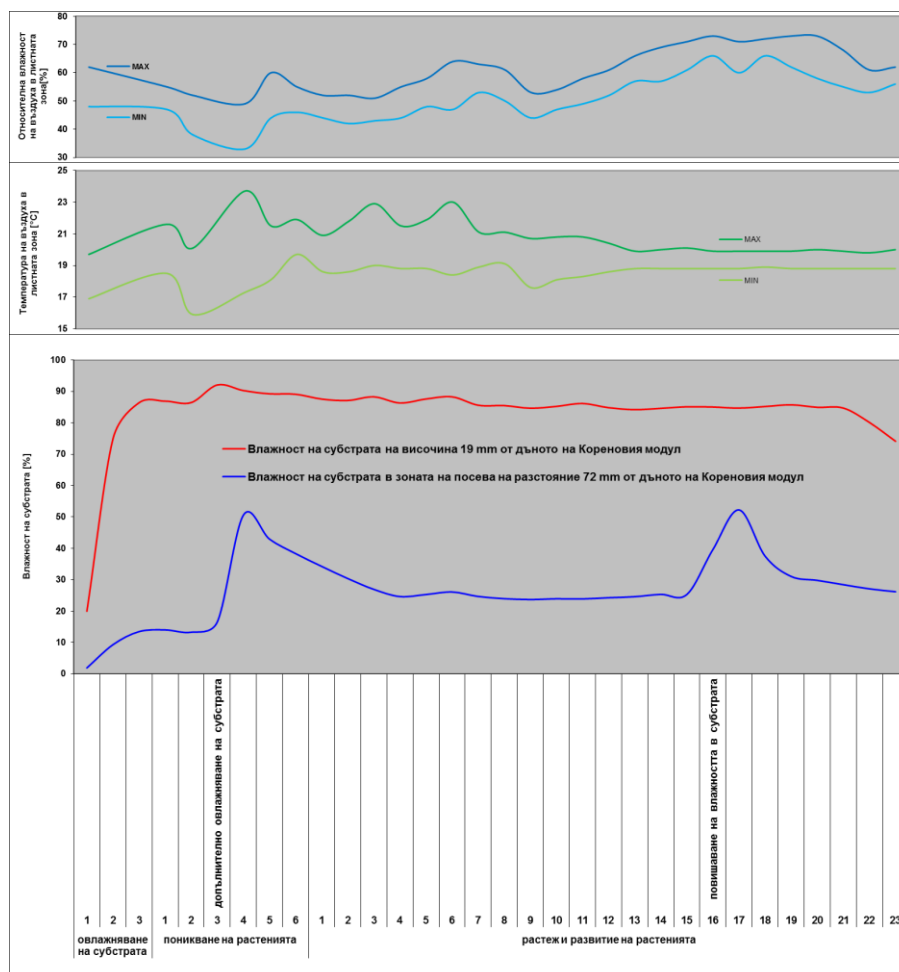
Факторите, причиняващи НК в кореновата система на Земята са: повишено съдържание на вода в почвата, вследствие на обилни валежи, снеготопене, разлив на реки, езера и др. водни басейни; преполивване на земеделски и други стопански площи; бавният дренаж на водата в почвения профил, дължащ се на структурата на почвата- когато частиците и порите между тях са с малки размери.

Водата е химически безвредна за растенията и наличието на голямо количество вода в почвата би следвало да е безопасно за тях, но способността на водата да взаимодейства с газовете и да пречатства свободният газообмен в почвата причинява НК и последващите уврежданията в растенията.

В лабораторни условия, НК се създава, като контейнерите, в които се отглеждат растенията са без отвори, за да се пречатства дренажето на излишната вода след поливане, или, като контейнерите биват потопени в дълбок съд с вода, така че водата да покрие повърхността на почвата в тях.

### Дизайн на пилотните експерименти за пресъздаване на стрес недостиг на кислород в кореновия модул на КО Свет-2

Проведени са по един експеримент съответно с растенията грах *Pisum sativum* cv. „Ran-1” и салатата *Lactuca sativa* cv. „Lollo Rossa”.



Фиг. 1. Параметрограма с условията на околната среда създадени при пилотния експеримент с грах

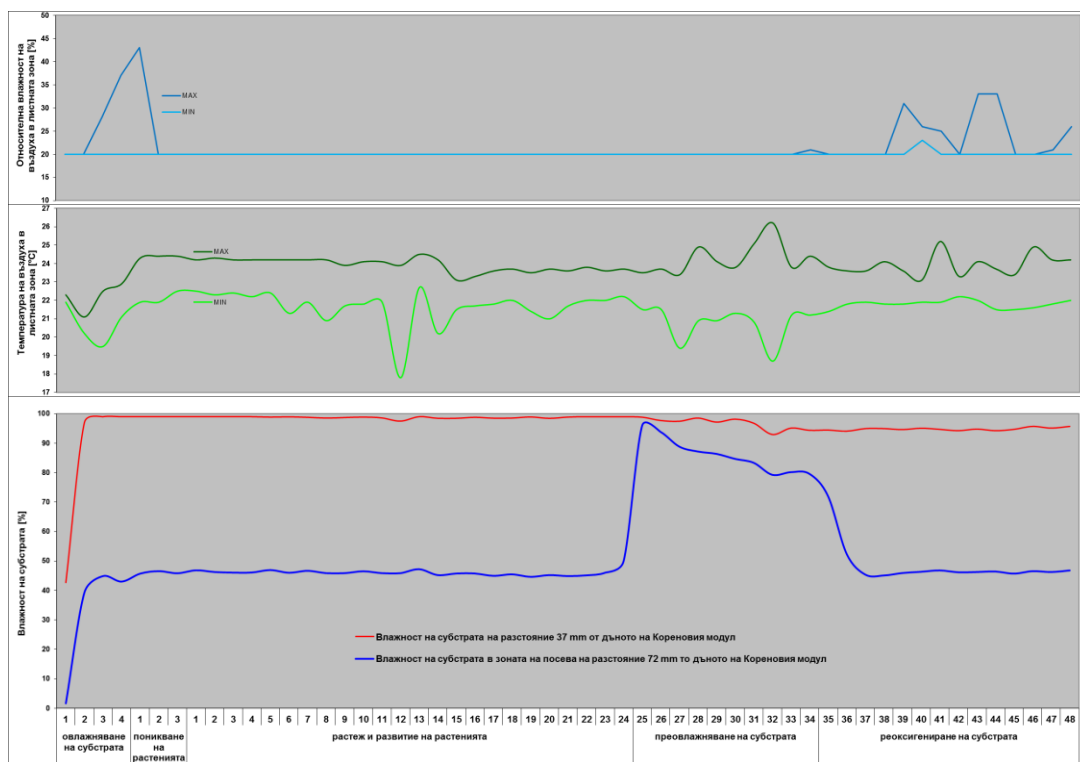
Експериментите са проведени в лабораторния прототип на КО Свет-2. За да се създаде НК е използван КМ без отвори в стените, като по този начин в обема на субстрата може да се поддържа влажност в диапазона от въздушно сух субстрат до напълно преовлажнен субстрат. КМ се състои от два Вегетационни съда (ВС), всеки с по две лехи с обем от 5,2 l и с площ от 0,05 m<sup>2</sup>. Пилотните експерименти са проведени с използването само на единия от ВС. И при двата експеримента е използван субстрат Балканин- природен зеолит от находището в с. Бели пласт, обл. Кърджали [5] с големина на частиците (1,0 – 1,5) mm. Влажността в субстрата се контролира от сензор за влажност, разположен на височина от 72 mm от дъното на ВС, а водата се подава от U-образен хидропровод, разположен в субстрата, в средата на ВС по продължение на цялата му дължина. Втори сензор за допълнителен мониторинг на влажността в обема на субстрата е разположен на височина 19 mm от дъното на ВС- при експеримента с грах, и на 37 mm от дъното на ВС- при експеримента със салата. Семената на граха са посадени на дълбочина 30 mm, а тези на салатата- на 10 mm от повърхността на субстрата.

Процесът на контрол на влажността при експеримента с грах е показан на Фиг. 1. НК в КМ е пресъздаден чрез повишаване на влажността в субстрата за 24 часа на шестнадесетия ден от развитието на растенията грах. При експеримента със салата е приложено пълно преовлажняване на субстрата в продължение на 10 дни на двадесет и петия ден от развитието на растенията (Фиг. 2). Преовлажняването и при двата експеримента е последвано от реоксигениране- отглеждане на растенията при влажност от преди третирането.

Надземната част на растенията и при двата експеримента се развива в среда с интензитет на светлината 400 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, осигурен от флуоресцентни лампи Osram Dulux S-21 11W и фотопериод 16/8 часа ден/нощ. Скоростта на въздушния поток е 0,2 m/s и при двата експеримента. Температурата на въздуха е в диапазона (15,9 ÷ 23,7)°C, а относителната влажност (33 ÷ 73)% при експеримента с грах, и, съответно, (17,8 ÷ 26,2)°C и (20 ÷ 43)% при експеримента със салата.

#### Анализ на растителния материал

Изследвани са пет физиологични показателя- интензивност на фотосинтеза, съдържание на хлорофил, височина, свежо тегло и сухо вещество на растенията.

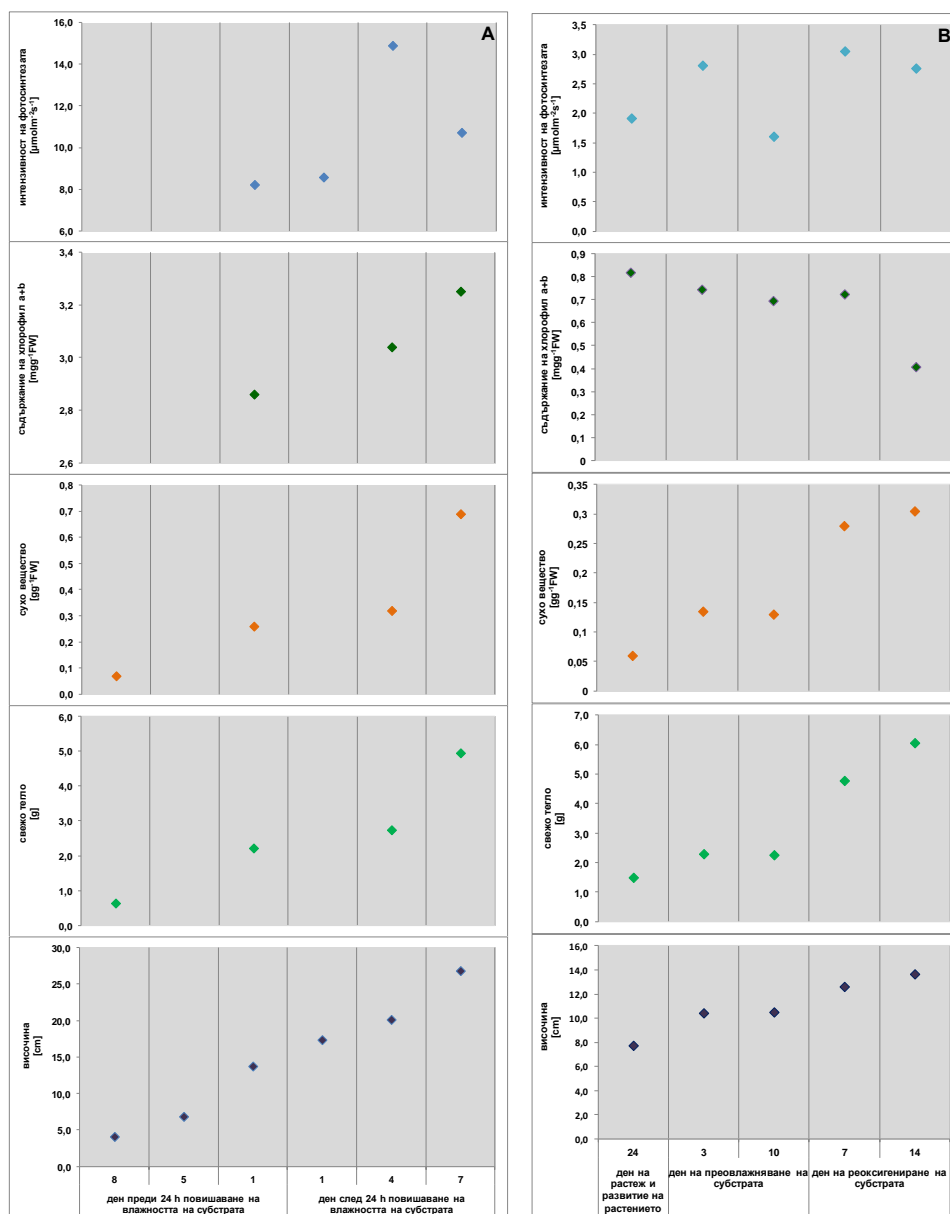


Фиг. 2. Параметрограма с условията на околната среда създадени при пилотния експеримент със салата

#### Резултати

В КМ на лабораторния прототип на КО Свет-2 е пресъздаден недостиг на кислород в кореновата зона, чрез краткотрайно или продължително преовлажняване на субстрата.

При краткотрайно повишаване на влажността в субстрата се постига частичен недостиг на кислород, който оказва слабо влияние върху показателите височина, свежа биомаса и сухо вещество при граха, води до бавно изменение в съдържанието на хлорофил a+b и бързо изменение в интензивността на фотосинтезата (Фиг. 3-А).



Фиг. 3. Динамика на физиологичните показатели при:  
 А- кратковременно състояние на недостиг на кислород при грах;  
 В- продължително състояние на недостиг на кислород при салата

Продължителния недостиг на кислород при салатата води до: Забавяне на нарастването на височина, синтезата на свежа биомаса и натрупването на сухо вещество. В процеса на реоксигениране тези показатели се възстановяват, но добивът на биомаса е значително занижен. Биосинтезата на хлорофил a+b е подтиснат, като в процеса на реоксигениране синтеза на хлорофил a+b не се възстановява. Наблюдава се понижаване на интензивността на фотосинтезата при недостиг на кислород и възстановяване в процеса на реоксигениране на субстрата (Фиг. 3-В).

Бързите изменения в интензивността на фотосинтезата както при краткотраен НК така и при продължителна хипоксия показва, че този параметър е много чувствителен и подходящ за оценка на физиологичното състояние на растенията.

С проведените пилотни експерименти се поставя началото на събирането на времеви серии от данни (plant histories) с цел да се създаде база от колкото е възможно по-информативни данни, даващи както количествена, така и качествена представа за отговора на

растенията към стресовите условия на ОС в микрогравитация. Генерираната поредица от данни за отговор на растенията, за конкретни комбинации от стресови фактори, в последствие ще бъде използвана за създаването на моделите идентифициращи физиологичното състояние на растенията и служещи за основа на последващият контрол на параметрите на ОС в КО.

### Литература:

1. Илиева, И. И., Т. Н. Иванова, С. М. Сапунова, П. Т. Костов. Създаване на подходяща среда за развитие на растенията в микрогравитация - технически решения и експериментален опит, *Сборник с доклади от Юбилейна научна сесия "90 години авиационно образование в България"* - Д. Митрополия, 22-23 април 2004, Т. 1, с. 98–106, 2004.
2. Bingham, G. E., S. B. Jones, D. OR, I. G. Podolski, M. A. Levinskikh, V. N. Sytchov, T. Ivanova, P. Kostov, S. Sapunova and I. Dandolov, D. B. Bubenheim, G. Jahns. Microgravity effects on water supply and substrate properties in porous matrix root support systems, *Acta Astronautica* Vol. 47, No. 11, pp. 839–848, 2000.
3. Cowles, J., R. LeMay, G. Jahns. Seedling growth and development on Space Shuttle, *Advances in Space Research*, Vol. 14, No. 11, pp. 3–12, 1994.
4. Cowles, J.R., H.W. Scheld, R. LeMay, C. Peterson. Growth and lignification in seedlings exposed to eight days of microgravity, *Annals of Botany*, Vol. 54, Supplement 3, pp. 33–48, 1984.
5. Ivanova, T., Stoyanov, I., Stoilov, G., Kostov, P., Sapunova, S. Zeolite Gardens in Space. Natural Zeolites Sofia'95. Pensoft Publishers, Sofia – Moscow, pp. 3–10, 1997.
6. Kostov P., T. Ivanova, I. Dandolov, S. Sapunova, I. Ilieva. Adaptive Environmental Control for Optimal Results during Plant Microgravity Experiments, *Acta Astronautica*, Vol. 51, Nos. 1-9, pp. 213–220, 2002.
7. Link, B. M., S. J. Durst, W. Zhou, B. Stanković. Seed-to-seed growth of *Arabidopsis thaliana* on the International space station, *Advances in Space Research*, Vol. 31, No. 10, pp. 2237–2243, 2003.
8. Massa, G. D., N. F. Dufour, J. A. Carver, M. E. Hummerick, R. M. Wheeler, R. C. Morrow, T. M. Smith. VEG-01: Veggie Hardware Validation Testing on the International Space Station, *Open Agriculture*, Vol. 2, pp. 33–41, 2017.
9. Monje, O., G. W. Stutte, G. D. Goins, D. M. Porterfield, G. E. Bingham. Farming in space: environmental and biophysical concerns, *Advances in Space Research*, Vol. 31, No. 1, pp. 151–167, 2003.
10. Morey-Holton, E.R. The impact of gravity on life, In *Evolution on planet earth*, Elsevier, pp. 143–159, 2003.
11. Musgrave, M.E., A. Kuang, L.K. Tuominen, L.H. Levine, R.C. Morrow. Seed storage reserves and glucosinolates in *Brassica rapa* L. grown on the International space station, *Journal of the American Society of Horticultural Scientists*, Vol. 130, No. 6, pp. 848–856, 2005.
12. Nechitailo, G.S., A.L. Mashinsky. Space Biology Studies at Orbital Stations, Mir Publishers Moscow, 1993.
13. Porterfield, D. M., S.W. Matthews, C.J. Daugherty, M.E. Musgrave. Spaceflight exposure effects on transcription, activity, and localization of alcohol dehydrogenase in the roots of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiology*, Vol. 113, pp. 685–693, 1997.
14. Porterfield, D.M. The biophysical limitations in physiological transport and exchange in plants grown in microgravity, *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 21, pp. 177–190, 2002.
15. Porterfield, D.M., D.J. Barta, D.W. Ming, R.C. Morrow, M.E. Musgrave. ASTROCULTURE™ root metabolism and cytochemical analysis, *Advances in Space Research*, Vol. 26, No. 2, pp. 315–318, 2000.
16. Porterfield, D.M., G.S. Nechitailo, A.L. Mashinsky, M.E. Musgrave. Spaceflight hardware for conducting plant growth experiments in space: The early years 1960-2000, *Advances in Space Research*, Vol. 31, No. 1, pp. 183–193, 2003.
17. Steinberg, S. L., S. B. Jones, M. Xiao, L. Reddi, G. Kluitenberg, D. Or, J. I. D. Alexander, N. Daidzic, M. Tuller. Challenges to understanding fluid behavior in plant growth media under microgravity, *SAE Paper Number 05ICES-73*, 2005.
18. Stout, S. C., D. M. Porterfield, L. G. Briarty, A.Kuang, M.E. Musgrave. Evidence of root zone hypoxia in *Brassica rapa* L. grown in microgravity, *International Journal of Plant Science*, Vol. 162, No. 2, pp. 249–255, 2001.
19. Todd, P. Gravity-dependent phenomena at the scale of single cell, *ASGSB Bulletin*, Vol. 2, pp. 95-113, 1989.
20. Wheeler, R.M., C.L. Mackowiak, J.C. Sager, W.M. Knott, W.L. Berry. Proximate composition of CELSS crops grown in NASA's biomass production chamber, *Advances in Space Research*, Vol. 18, No. 4-5, pp. 43–47, 1996.
21. Xiao, M., L.N. Reddi, S.L. Steinberg. Discontinuous pore fluid distribution under microgravity due to particle rearrangement. *Springer Series in Geomechanics and Geoengineering*, pp. 65–68, 2011.