

С.В. Песяк

*Биологический институт Томского государственного университета (г. Томск)*

### ДЕЙСТВИЕ СЕЛЕКТИВНОГО СВЕТА НА РОСТ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР РАСТЕНИЯ *ARTEMISIA ANNUA* L.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 09-04-99039-р-офи), а также в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009–2013 гг. (ГК № П 112 от 12.04.2010).

*Изучено действие селективного света на рост каллусной и суспензионной культур Artemisia annua L. (полыни однолетней). Установлено, что зеленый свет вызывает замедление роста каллусной культуры Artemisia annua L., а также увеличение объемов клеток, что может свидетельствовать о замедлении процессов клеточного деления. Показано, что максимальных значений индекс роста достигал в каллусной культуре полыни однолетней, выращиваемой на синем свете. Выяснено, что красный свет достоверно замедляет рост суспензионной культуры Artemisia annua L. по сравнению с синим светом.*

**Ключевые слова:** *Artemisia annua* L.; селективный свет; суспензионная культура; каллусная культура; индекс роста.

Одним из самых актуальных направлений в фармакологическом производстве лекарственных веществ становится использование новых биотехнологических методов для получения ценных метаболитов лекарственных растений. К таким ценным лекарственным растениям относится и *Artemisia annua* L., или полынь однолетняя, – источник сесквитерпенового лактона артемизинина и его производных, обладающих противомалярийной и противопаразитарной активностью [2].

Проведенные исследования показали возможность использования сесквитерпеновых лактонов *A. annua* L. для лечения не только малярии и сопутствующих заболеваний, но также и цитомегаловирусных инфекций [3], раковых заболеваний [4] и других паразитарных инфекций (лямблиозов, шистосомозов [5] и описторхозов).

Традиционно артемизинин выделяют из интактных растений, выращиваемых на полях. Однако содержание искомого вещества в различных органах растения неоднородно, колеблется в пределах 0,01–0,5%, зависит от климатических и других факторов внешней среды [6]. Восполнить дефицит артемизинина и его производных сесквитерпеновой природы мог бы химический синтез [7]. Однако этот процесс очень сложен, многостадийен и экономически неконкурентоспособен даже с получением искомого вещества из интактных растений.

Следовательно, для увеличения поставок сесквитерпеновых лактонов на мировые рынки сбыта необходимо либо увеличивать их концентрации в интактном растении либо, альтернативно, использовать технологию культуры

клеток и тканей. Эта технология может создать круглогодичный цикл выращивания культуры клеток, что позволит получать чистые биологически активные вещества без примесей и загрязнений, а также регулировать синтез сесквитерпеновых лактонов с помощью физических или химических факторов.

Формирование такой технологии возможно лишь на основе фундаментальных знаний о физиологической регуляции уровня биологически активных веществ в растительной клетке [8]. Одним из важнейших факторов регуляции продукционного процесса растений является свет, действие которого проявляется через активацию специфических фоторецепторов (фитохромов, криптохромов и др.) [9]. Свет, выполняющий регуляторную функцию, контролирует морфогенез и продуктивность растений [10, 11, 12]. Для многих культур растений *in vitro* показано, что свет значительно влияет на ростовые параметры каллусных клеток [13]. Селективный свет также может воздействовать на биохимические параметры клеточных культур, активируя различные пути биосинтеза вторичных метаболитов [14].

Таким образом, для интенсификации роста клеточных культур и повышения продукции ими вторичных метаболитов необходимо изучить действие селективного света, прежде всего в диапазоне 430–740 нм, на ростовые параметры культуры клеток *in vitro*, что и являлось целью данной работы.

### Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлась клеточная культура, полученная из листовых эксплантов *A. annua* L.

Средняя продолжительность одного субкультивирования каллусной культуры полыни однолетней составила 15 сут (рис. 1), суспензионной культуры – 10 сут.

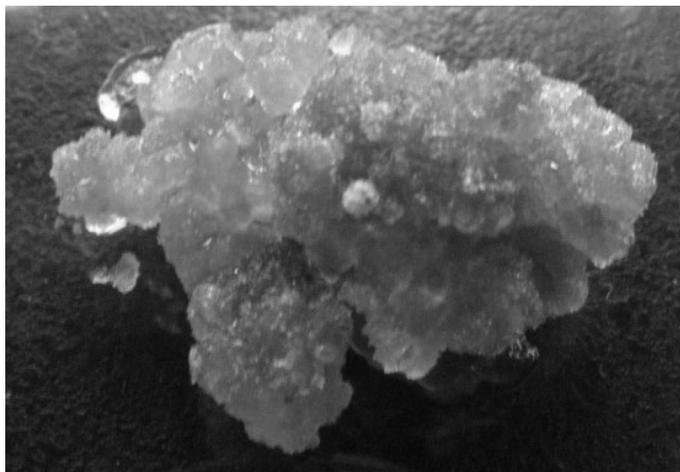


Рис. 1. Внешний вид каллусной культуры *Artemisia annua* L.

Среда культивирования каллусной культуры была оптимизирована по составу фитогормонов. Для культивирования использовалась среда Мурасиге–

Скуга (MS) с добавлением фитогормонов НУК в концентрациях 0,5–1 мг/л и 6–БАП в концентрации 0,2 мг/л [15]. При добавлении миоинозитола ростовые параметры (индекс роста, накопление сухой массы) каллусной культуры кратковременно повышались. Однако при дальнейшем культивировании отличия по этим параметрам между каллусными культурами, выращенными на средах с содержанием миоинозитола и без него, становились незначительными [16]. Культивирование проводили на белом свете при 25°C и влажности 60%.

Для исследования действия селективного света каллусную культуру полыни выращивали в стерильных пластиковых чашках Петри на агаризованной среде MS по 20 повторностей на каждый вариант эксперимента. Определение интенсивности и спектра излучения цветных ламп проводили при помощи спектрометра двухканального оптоволоконного Avaspec Avantes.

Суспензионную культуру клеток полыни однолетней выращивали в колбах объемом 100 мл на шейкерах (Heidolph Unimax 2010, Германия; BioSan OS-10, Латвия) при 100 об./мин и температуре 25 ± 1°C на красном, синем и белом свете.

Прирост сырой биомассы оценивали по общепринятому показателю – ростовому индексу (в %) [13]. Определяли средний конечный и средний начальный вес клеток культуры *in vitro*:

$$\text{Индекс роста} = \frac{\text{Средний конечный вес} - \text{Средний начальный вес}}{\text{Средний начальный вес}}$$

Ростовые характеристики суспензии (индекс роста, накопление сухой массы) определяли, измеряя сухую и сырую биомассу. Сухую массу определяли, высушивая культуру при температуре 50–55°C до постоянной массы. Микроскопический анализ клеточного материала проводили после мацерации в растворе 10%-ной хромовой кислоты в течение 10 мин при 26°C [17].

Данные представлены в виде средних со стандартными ошибками. Различия достоверны при  $p < 0,05$ . Нормальность распределения оценивали при помощи критерия Колмогорова с поправкой Лилиефорса и критерия Шапиро–Вилка. Уставлено, что все полученные выборки подчиняются закону нормального распределения, следовательно, для установления значимости отличий использовали критерий Стьюдента. Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась с помощью программ Microsoft Office Excel 2007 и STATISTICA 8.0.

### Результаты и обсуждение

По литературным данным, свет может положительно влиять на ростовые параметры как интактных растений, так и культуры генетически-модифицированных корней *hairy root A. annua* L. [18]. Стимулирующее воздействие на скорость роста культуры модифицированных корней полыни однолетней и накопление артемизинина оказал красный свет (740 нм.), в то время как воздействие зеленым светом приводит к обратному эффекту [19]. Однако на клеточной культуре данного растения влияние селективного света не изучено.

Исследовано действие монохроматического красного, синего и зеленого света на ростовые характеристики каллусной культуры полыни однолетней 7-го пасса-

жа. В эксперименте использованы цветные лампы фирмы Philips [18, 19], световой поток был выровнен по падающим квантам на уровне  $160 \text{ мкМ м}^2/\text{с}$  (рис. 2).

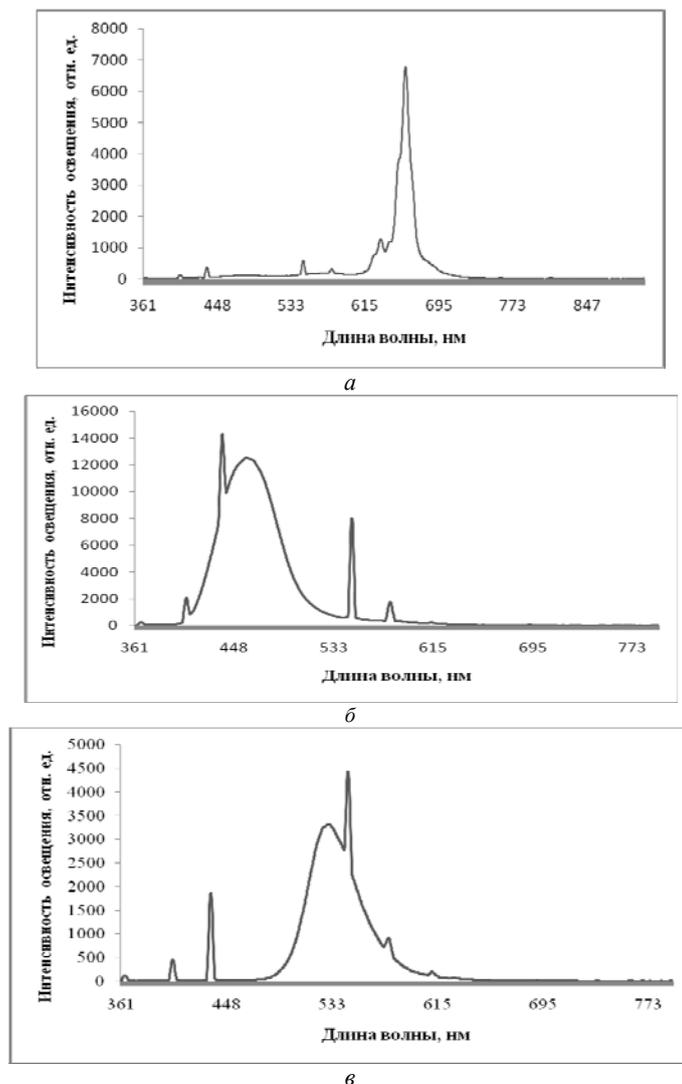
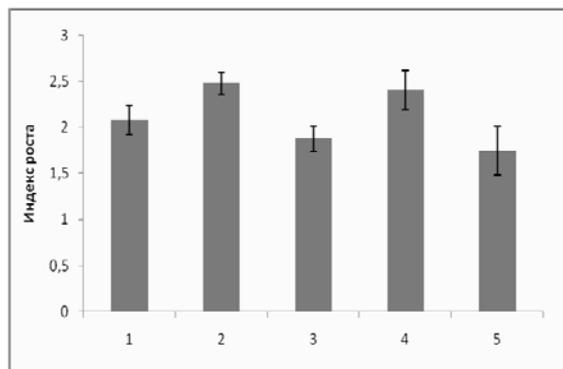


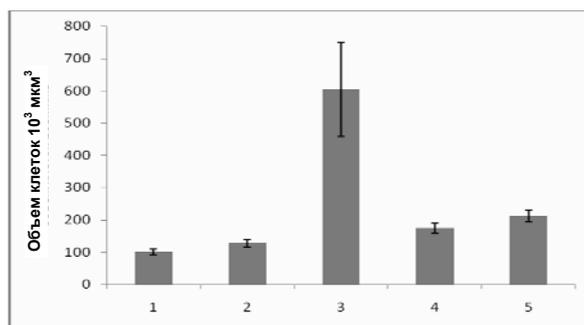
Рис. 2. Спектры излучения люминесцентных ламп фирмы «Philips», интенсивность излучения в зависимости от длины волны: а – красные лампы TL-D 36W/15; б – синие лампы TL-D 36W/18; зеленые лампы TL-D 36W/17; в – зеленые лампы TL-D 36W/17

Исследован рост каллусной культуры *A. aptia* L. за период субкультивирования 15 сут. Максимальные значения индекса роста показаны у каллусной культуры, выращенной на селективном синем свете по сравнению с каллусной культурой в темноте ( $t = -3,3$ ;  $p = 0,001$ ), в то время как зеленый свет по-

давлял рост каллусной культуры. При изучении объема клеток максимальные значения обнаружены у каллусной культуры, выращенной на зеленом свете, в то время как красный и синий свет способствовал уменьшению этого показателя, что может свидетельствовать об увеличении пролиферативной активности каллуса, выращиваемого на селективном синем свете (рис. 3).



а



б

Рис. 3. Ростové показатели каллусной культуры *A. annua* L.:  
 а – индекс роста; б – объём клеток каллусной культуры, выращенной на свету разного спектрального состава: 1 – красный свет, 2 – синий свет, 3 – зеленый свет, 4 – белый свет, 5 – темнота

Исследовано влияние монохроматического света на ростовые параметры суспензионной культуры *A. annua* L. на среде с содержанием фитогормонов НУК и БАП в концентрациях 0,5 и 0,2 мг/л соответственно. При изучении объема клеток суспензионной культуры значимых отличий этого параметра у культур не обнаружено (рис. 4).

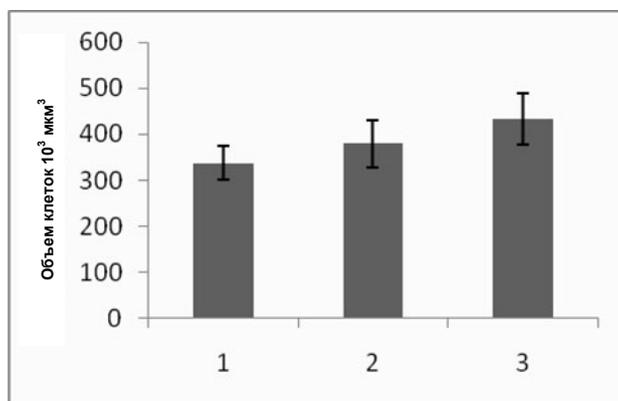
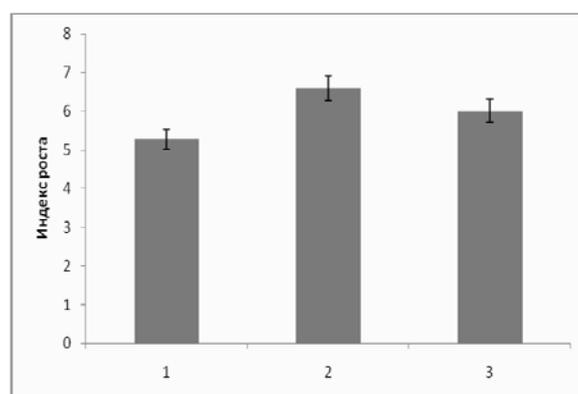
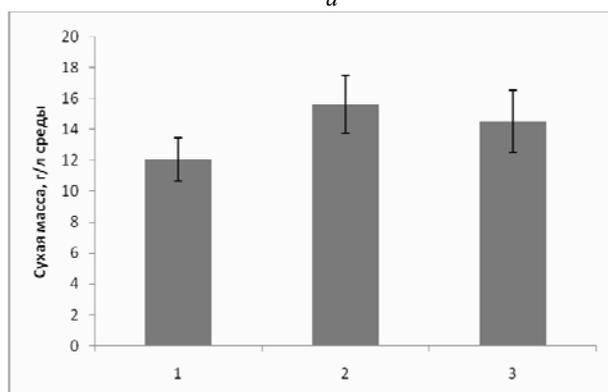


Рис. 4. Объем клеток суспензионной культуры *A. annua* L., выращенной на свету разного спектрального состава: 1 – красный свет; 2 – синий свет; 3 – контроль



*a*



*б*

Рис. 5. Ростовые показатели суспензионной культуры *A. annua* L.: *a* – индекс роста; *б* – сухая масса суспензионной культуры, выращенной на свету разного спектрального состава: 1 – красный свет, 2 – синий свет, 3 – контроль

При изучении индекса роста, а также накопления сухой массы суспензионной культуры установлено, что выращивание на красном свете приводит к уменьшению данных показателей по сравнению с синим светом ( $t = -2,41$ ;  $p = 0,042$  для индекса роста и  $t = -2,6$ ;  $p = 0,028$  для накопления сухой массы). Значимых отличий между суспензионными культурами на синем свете и контролем не обнаружено (рис. 5).

В результате проведенной работы было показано, что зеленый свет замедляет рост каллусной культуры полыни однолетней и одновременно приводит к увеличению объемов клеток этой культуры, что может свидетельствовать о торможении процессов клеточного деления при воздействии на каллусные культуры зеленого света. Максимальных значений индекса роста достигала каллусная культура, выращиваемая на селективном синем свете. Также показано, что красный свет достоверно замедляет рост суспензионной культуры *Artemisia annua* L. по сравнению с синим светом.

### Литература

1. Cole I.B., Praveen C., Saxena K., Murch S.J. Medicinal biotechnology in the genus scutellaria // In Vitro Cell developmental biology – plants. 2007. № 43. P. 318–327.
2. Jorge F.S., Ferreira J.F.S. *Artemisia annua* L.: The hope against malaria and cancer // Medicinal and Aromatic Plants: Production, Business & Applications. 2004. P. 56–61.
3. Effertth T., Marschall M., Xin Wang et al. Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and ganciclovir-resistant human cytomegaloviruses // Journal of molecular medicine. 2001. № 80. P. 233–242.
4. Beekman A.C., Wierenga P.K. Artemisinin-derived sesquiterpene lactones as potential antitumour compounds: cytotoxic action against bone marrow and tumour cells // Planta medicine. 1998. № 64. P. 615–619.
5. Xiao S.H., Wu Y.L., Tanner M. Schistosoma japonicum: in vitro effects of artemeter combined with haemin depend on cultivation media and appraisal of artemether products appearing in the media // Parasitology resources. 2003. № 89. P. 459–466.
6. Wright C.W. *Artemisia*. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial profiles. London: Taylor and Francis, 2002. 359 p.
7. Patrick S.C. Making artemisinin // Phytochemistry. 2008. № 69. P. 2881–2885.
8. Weathers P.J., Towler M.J., Xu J. Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products // Applied microbiological biotechnology. 2010. № 85. P. 1339–1351.
9. Bögre L., Beemster G. Plant Growth Signaling. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2008. P. 223–242.
10. Карначук Р.А., Головацкая И.Ф. Гормональный состав, рост и фотосинтез растений, выращенных на свету разного спектрального состава // Физиология растений. 1998. Т. 45. С. 925–934.
11. Карначук Р.А., Тищенко С.Ю., Головацкая И.Ф. Эндогенные фитогормоны и регуляция морфогенеза *Arabidopsis thaliana* синим светом // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 262–267.
12. Карначук Р.А., Головацкая И.Ф., Ефимова М.В., Хрипач В.А. Действие 24-эпибрасинолида на морфогенез и соотношение гормонов у проростков *Arabidopsis* на зеленом свету // Физиология растений. 2002. Т. 49. С. 591–595.
13. Гвоздева Е.С., Ефимова М.В., Карначук Р.А., Дорофеев В.Ю., Асташкина М.П. Роль света в морфогенезе клеточной культуры in vitro трансгенного табака с геном интерлейкина-18 человека // Вестник Томского государственного университета. 2007. № 300 (2). С. 116–118.

14. Hobbs M.C., Yeoman M.M. Effect of light on alkaloid accumulation in cell cultures of nicotiana species // *Jornal of experimental botany*. 1991. Vol. 42, № 11. P. 1371–1378.
15. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г. и др. Справочник по ботанической микро-технике. Основы и методы. М.: Изд-во МГУ. 2004. 312 с.
16. Песяк С.В., Комлева Е.В., Карначук Р.А. Оптимизация условий культивирования каллусной культуры полыни однолетней // 9-я Международная конференция «Биология клеток растений in vitro и биотехнология»: Сб. трудов. Звенигород, 2008. С. 36.
17. Песяк С.В., Комлева Е.В. Оптимизация питательной среды для эффективного культивирования каллусной культуры *Artemisia annua* L. // Молодежная всероссийская школа-семинар «Современные фундаментальные проблемы физиологии и биотехнологии растений и микроорганизмов»: Сб. тезисов. Томск, 2008. С. 26–27.
18. Liu C.Z., Guo C., Wang Y., Ouyang F. Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. // *Process biochemistry*. 2002. № 38. P. 581–585.
19. Wang Y., Zhang H., Zhao B., Yuan X. Improved growth of *Artemisia annua* L. hairy roots and artemisinin production under red light conditions // *Biotechnology letters*. 2001. Vol. 23. P. 1971–1973.

Поступила в редакцию 25.04.2010 г.

Sergey V. Pesyak

*Biological Institute of Tomsk State University, Tomsk, Russia*

#### EFFECT OF SELECTIVE LIGHT ON *ARTEMISIA ANNUA* L. CELL CULTURES GROWTH

*One of the major source of medicinal substances for human diseases curing is the plants. Artemisia annua L. (sweet wormwood) which are the origin of sesquiterpen lactone artemisinin and its derivatives with antimalarial, antiparasitic, antiviral and anti-tumour effects, is the exercise of such plant.*

*Traditionally artemisinin has been made from intact plants. However, the content of this substance in various plant organs is nonuniform. Consequently, for increasing of sesquiterpene lactones supply on the world markets we must use cell culture technology.*

*The process of creating this technology needed to obtain basic knowledge about the physiological regulation of biologically active substances content in the plant cell. Selective lighted controlling of morphogenesis, plant productivity and secondary metabolites biosynthesis is the one of the most important factors of this regulation.*

*Thus, the aim of our work was researching a selective light effects on *A. annua* L. callus and suspension growth parameters.*

*Growth of callus culture *A. annua* L. for subculture period in 15 days was studied. Maximum values of the growth index were on culture under blue light, while the green light suppressed ones. Maximum cell volume were in callus under green light, both red and blue leads to a reduction of this index, this can show increasing of proliferative activity under blue light.*

*The effect of selective light on *A. annua* L. suspension growth for 10 days subculturing on NAA and BAP contained medium was studied. There are no significant differences between cell volumes on the selective light and control. Suspension culture under red light has reduced values of growth index and dry weight production in compare with culture under blue light.*

**Key words:** *Artemisia annua* L., selective light, suspension culture, callus culture, growth index

Received April 25, 2010