

## ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ КУЛЬТУР ВОЛОСОВИДНЫХ КОРНЕЙ *Withania coagulans*

© 2024 г. Е. В. Михайлова<sup>1, \*</sup>, М. А. Панфилова<sup>1, 3</sup>, В. В. Федяев<sup>2</sup>, Б. Р. Кулуев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа, 450054 Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО “Уфимский университет науки и технологий”, Уфа, 450076 Россия

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО “Уфимский государственный нефтяной технический университет”, Уфа, Россия

\*e-mail: mikhele@list.ru

Поступила в редакцию 12.11.2023 г.

После доработки 23.12.2023 г.

Принята к публикации 25.12.2023 г.

*Withania coagulans* (Stocks) Dunal – ценное лекарственное растение, богатое биологически активными веществами, которое имеет перспективы применения не только в медицине, но и в пищевой промышленности. Волосовидные корни витании являются более предпочтительным источником биологически активных веществ, чем корни растений, выращенных в природных условиях. Однако подбор условий для культивирования культур корней *W. coagulans* ранее не проводился. Согласно литературным данным соединения  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  и  $\text{CaCl}_2$  положительно влияют на рост корней *Withania somnifera* (L.) Dunal, соли кобальта – на рост корней *Angelica archangelica* L., повышение концентрации агара – на рост корней *A. thaliana*. В данной работе было впервые исследовано влияние этих веществ на рост волосовидных корней *W. coagulans*. Показано, что изменение состава среды МС не приводит к увеличению сухой массы корней, повышение концентрации кобальта двухвалентного ингибирует рост корней, тогда как кобальт трехвалентный в концентрации до 100 мкМ позволяет дольше сохранять жизнеспособность корней. Добавление  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  может быть использовано для длительного хранения культур корней витании без пересадок, что является важным этапом их биотехнологического производства.

**Ключевые слова:** *Withania coagulans*, *Withania somnifera*, волосовидные корни, hairy roots

**DOI:** 10.56304/S0234275824010083

### ВВЕДЕНИЕ

*Withania coagulans* (Stocks) Dunal – растение семейства Пасленовых, богатое биологически активными веществами. Активное его использование в традиционной индийской и китайской медицине привело к сокращению ареала и угрозе вымирания [1]. У экстрактов листьев и корней витании обнаружены противоопухолевая, противовоспалительная и антибактериальная активности, обусловленные содержанием соединений класса витанолидов: витанолида А, витаферина А, витанолидов D, L, P, I, F и K, 16 витакоагулинов (A, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, S, Q, U и R), коагуланзина В, коагуланолида и др [2–5]. В частности, витанолиды I и K обладают противогрибковой активностью [6]. Витанолид А оказывает положительное влияние на регенерацию нейритов и реконструкцию синапсов в сильно повре-

жденных нейронах [7]. Витакоагулин Н обладает иммуносупрессивными свойствами, поскольку ингибирует пролиферацию лимфоцитов и выработку цитокина Th-1, и может быть использован как аналог преднизолона [8]. Витаферин А ингибирует синтез РНК в клетках саркомы и митоз в клетках карциномы [3]. Также это вещество продемонстрировало активность в отношении *Streptococcus pyogenes*, *S. lutea*, *S. pyogenes*, *S. viridans*, *Bacillus subtilis*, *B. anthracis* и *Escherichia coli* [4]. В целом, витанолиды вызывают окислительный стресс в раковых клетках, что приводит к остановке их роста, либо апоптозу [9]. Витанолиды содержатся также и в близкородственном виде *Withania somnifera* (L.) Dunal, которое лучше изучено, чем *W. coagulans*.

Уникальность *W. coagulans* в том, что плоды этого растения также содержат аспартильную протеазу с молекулярной массой 31 кДа, которая используется для коагуляции молока. Ее называют индийским сычужным ферментом, который может служить альтернативой химозину, имеющему животное

Список сокращений: ВК – волосовидные корни; МС – Му-расиге-Скуга среда; LB – лизогенная среда Lysogeny broth.

происхождение [10, 11]. Таким образом, *W. coagulans* имеет перспективы применения не только в медицине, но и в пищевой промышленности.

В целях уменьшения сбора природного растительного материала и снижения нагрузки на естественные экосистемы может быть предложена технология выращивания культур волосовидных корней (ВК) *W. coagulans* в биореакторах с целью получения ценных метаболитов этого растения. Волосовидные корни (от англ. hairy roots), которые также называют бородачатыми корнями, индуцируются с использованием бактерий *Agrobacterium rhizogenes*. Такие корни способны к неограниченному росту на безгормональных питательных средах в изолированной от побега культуре, при этом продуцируя корнеспецифичные метаболиты, характерные для растения в природных экосистемах. Получение и культивирование волосовидных культур витании не представляет сложности и описано в литературе [12].

Установлено содержание основных витанолидов в листьях и корнях *W. coagulans*. Преобладающим метаболитом в природных корнях являются витанолиды J и H, концентрация которых находится на уровне 33.68 и 12.63 мкг/г. В листьях их содержание примерно такое же, тогда как в стеблях их в разы больше: 742 и 447 мкг/г. Содержание витанолида K колеблется от 6.55 мкг/г в корнях до 300.17 мкг/г в листьях, витаферина А — от 1.13 до 2651 мкг/г, а витанолида А — от 1.37 до 300 мкг/г [13]. В культурах ВК типичного морфотипа содержание витанолида А составляло 0.891 мкг/г, а витаферина А — 37 нг/г сухой массы. У каллусообразующих культур корней эти значения составили 1.9 мкг/г и 47 нг/г сухой массы, соответственно [12]. Таким образом, ВК являются более перспективным источником витанолидов, чем корни растений, выращенных в природных условиях, однако *W. coagulans* все равно уступает *W. somnifera* по их содержанию.

В природных условиях *W. somnifera* накапливает до 5 мг/г витанолида А в корнях и 15.23 мг/г витаферина А в листьях, поэтому для этого вида неоднократно проводился анализ роли состава питательных сред на накопление биомассы и содержание витанолидов в культурах корней [9]. Например, исследовалось влияние содержания сахарозы в среде Мурасиге-Скуга (МС) в диапазоне 10–60 г/л, и было показано, что концентрация 40 г/л позволяла в 5 раз повысить накопление биомассы [14]. Двойная концентрация  $\text{KNO}_3$  позволяла повысить накопление витанолида А до 15.27 мг/г сухой массы. Увеличение содержания  $\text{MgSO}_4$  в 1.5–2 раза и  $\text{CaCl}_2$  в 2 раза, а также снижение доли ионов  $\text{NH}_4^+$  по сравнению с  $\text{NO}_3^-$  приводило к увеличению биомассы и содержания витанолидов. Удвоение концентрации  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  по-

ложительно сказывалось только на накоплении биомассы [15].

Для *W. coagulans* такие исследования отсутствуют, хотя именно для этого вида особенно важно повышение содержания витанолидов, поскольку изначально их концентрация невелика. На данный момент известно только то, что добавление ауксинов в питательную среду стимулировало накопление биомассы и витанолидов в адвентивных корнях *W. coagulans* [16].

Помимо макронутриентов, есть и другие соединения, которые могут потенциально влиять на продуктивность культуры корней. Для повышения наработки вторичных метаболитов в *in vitro* культурах часто используют элиситоры, вызывающие у растения иммунный ответ. Так, например, неорганический элиситор,  $\text{CoCl}_2$  в концентрации 0.3 мг/л в наибольшей степени стимулировал набор биомассы культурами корней *Azadirachta indica* [17]. У *Catharanthus roseus* четырехкратное увеличение концентрации  $\text{CoCl}_2$  в питательной среде для культур корней позволило на 60% повысить содержание терпен-индольного алкалоида катарантина [18]. Внесение  $\text{CoSO}_4$  стимулировало рост корней *Angelica archangelica* L. и накопление ими кумаринов [19]. Влияние солей кобальта может быть обусловлено тем, что его ионы ингибируют превращение метионина в этилен, при этом в целом не нарушая метаболизм растения. Поскольку этилен негативно влияет на рост растений, кобальт косвенно может улучшать его, ингибируя биосинтез этилена [20]. Помимо этого, кобальт влияет и на синтез вторичных метаболитов, поскольку катализирует некоторые ферменты шикиматного пути, таких как ДАГФ-синтаза [21]. В пути биосинтеза алкалоидов кобальт также служит активатором аргиназы, которая гидролизует растительные белки, содержащие аргинин [22, 23].

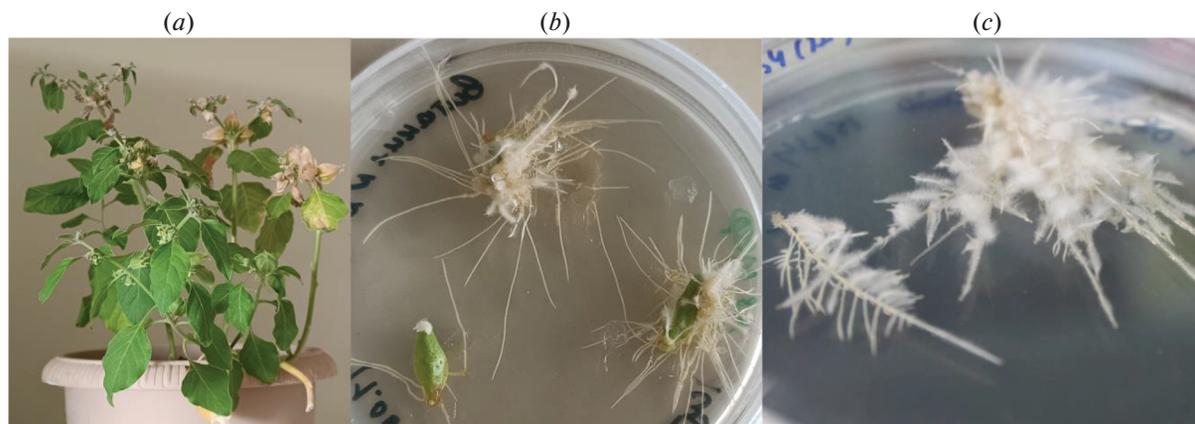
Целью нашего исследования было получение волосовидных корней *W. coagulans* и оценка влияния некоторых макро- и микроэлементов на продуктивность корней при их выращивании в изолированной культуре.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Получение культур волосовидных корней

Семена *W. coagulans* скарифицировали при помощи наждачной бумаги, затем стерилизовали в течение одной минуты в 70%-ном этиловом спирте и в течение 8 мин в 0.01%-ном растворе активного хлора, после чего 5 раз промывали стерильной водой. Простерилизованные семена высаживали на твердую среду Мурасиге-Скуга (МС, M5524, Sigma Aldrich, США). Для трансформации использовали семядольные листья 10-дневных проростков.

Культуры *A. rhizogenes* штаммов 15834 и А4 из коллекции Института биохимии и генетики УФИЦ



**Рис. 1.** Этапы получения культур корней *W. coagulans*. (a) — плодоносящее растение в условиях лаборатории, (b) — индукция ВК на семядольных эксплантах, (c) — рост ВК, изолированных от эксплантов.

**Fig. 1.** Stages of obtaining *W. coagulans* HR cultures. (a)—fruiting plant under laboratory conditions, (b)—induction of HR on cotyledon explants, (c)—growth of HR isolated from explants.

РАН выращивали в жидкой среде LB [24] в течение суток, затем центрифугировали в течение 10 мин на центрифуге 5804R (Eppendorf, Германия) при 3200 g. Осадок ресуспендировали в жидкой среде МС. Семядольные листья *W. coagulans* размещали нижней стороной листа вверх в чашке Петри с жидкой средой МС и добавлением суспензии агробактерий до достижения  $OD_{600}$  0.2–0.4. Каждый из эксплантов по центральной жилке несколько раз укалывали иглой инсулинового шприца и совместно культивировали с агробактериями в течение 30 мин. Затем экспланты подсушивали на фильтровальной бумаге и в течение двух сут сокультивировали с агробактериями на твердой среде МС (pH 5.8, M0404, Sigma Aldrich) с добавлением 40 г/л сахарозы (“Химреактивснаб”, Россия) и 8 г/л агара (Диаэм, Россия). После этого экспланты пересаживали на среду, содержащую дополнительно 300 мг/л цефотаксима (“Биосинтез”, Россия). Появление корней наблюдали на 7–10 день. Использованный метод позволил достичь высокой эффективности трансформации — на каждом экспланте образовывалось от 7 до 45 корней (рис. 1b). Корни длиной не менее 1.5 см пересаживали на отдельные чашки, и далее каждую линию исследовали отдельно. Для дальнейших исследований были отобраны 7 линий, полученных при помощи штамма 15834; и три линии, полученные при помощи штамма А4. Все этапы культивирования (рис. 1в, с) проводили при 25°C в темноте.

#### Оценка влияния содержания макроэлементов на продуктивность культур корней

Ранее было показано, что для наработки биомассы корней витании оптимальной концентрацией сахарозы в среде является 3%, и этот источ-

ник углерода превосходит мальтозу, глюкозу и фруктозу. При этом оптимальное значение pH среды составляло 5.8 [25]. Именно эти параметры среды использовали во всех вариантах эксперимента. В среде 1 состав среды МС не подвергался модификации. В связи с тем, что увеличение содержания макроэлементов  $KNO_3$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$  и  $CaCl_2$  в питательной среде в 1.5–2 раза положительно сказывалось на наработке биомассы и содержании витанолидов [15], в одной из сред использовали повышенные концентрации этих солей (среда 2). Поскольку имеются данные о том, что соотношение соединений  $NH_4^+$  и  $NO_3^-$  значительно влияет на рост корней и накопление витанолидов, в одном из этих вариантов было дополнительно снижено содержание микроэлементов и  $NH_4NO_3$  (среда 3). На жидких питательных средах хорошо изучены параметры роста ВК, однако отсутствуют данные о влиянии на них повышения твердости среды. Согласно литературным данным, увеличение содержания агара способствовало росту корней, и только при его концентрации свыше 1.3% наблюдалась обратная тенденция [26]. Поэтому в четвертом варианте среды концентрация агара была увеличена на 25% (среда 4). Состав использованных в эксперименте сред представлен в табл. 1.

Кончики полученных в ходе работы молодых ВК 11 линий (штамм 15834: № 2, 6, 13, 14, 37, 45, 55 и 66 и штамм А4: № 5, 10 и 27) длиной около 1 см помещали на твердые питательные среды 4 типов. По прошествии 5 недель корни удаляли из питательной среды, промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе в течение 5 дней, после чего взвешивали (рис. 2a). Для каждой линии эксперимент повторяли трижды. Статистическую

**Таблица 1.** Состав питательных сред, использованных в эксперименте  
**Table 1.** Composition of nutrient mediums used in the experiments

Компонент	Содержание компонента, мг/л			
	Среда 1	Среда 2	Среда 3	Среда 4
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.0	1650.0	825.0	1650.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2	3.1	6.2
CaCl <sub>2</sub>	332.2	664.4	332.2	332.2
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.0125	0.025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.0125	0.025
Na <sub>2</sub> -EDTA	37.26	37.26	18.63	37.26
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8	13.9	27.8
MgSO <sub>4</sub>	180.7	361.4	180.7	180.7
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.9	16.9	8.45	16.9
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.125	0.25
KI	0.83	0.83	0.415	0.83
KNO <sub>3</sub>	1900.0	3800	1900.0	1900.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.0	170.0	85	170.0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	8.6	4.3	8.6
Глицин	2.0	2.0	1	2.0
Инозитол	100.0	100.0	50	100.0
Никотиновая кислота	0.5	0.5	0.25	0.5
Пиридоксин·HCl	0.5	0.5	0.25	0.5
Тиамин·HCl	0.1	0.1	0.05	0.1
Сахароза, г/л	30	30	30	30
Агар, г/л	8	8	8	10
pH	5.8	5.8	5.8	5.8

обработку данных производили при помощи программного пакета Libre office.

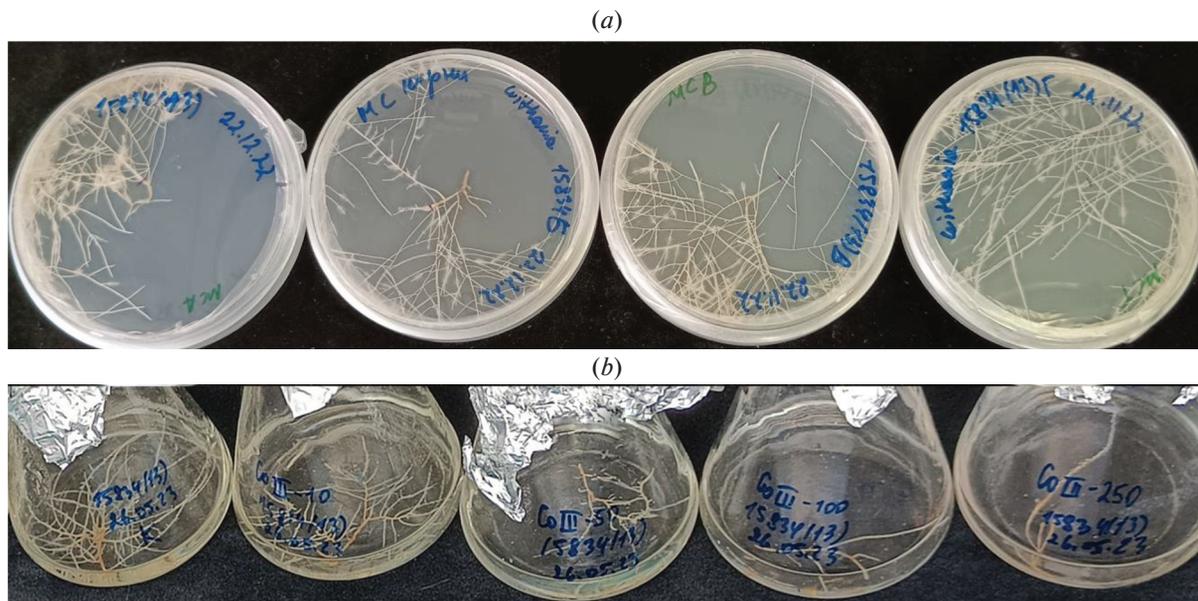
#### *Оценка влияния содержания кобальта на продуктивность культур корней*

В качестве источника кобальта использовали соединения [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub> (Co<sup>3+</sup>) и CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Co<sup>2+</sup>), отличающиеся валентностью кобальта. Ранее влияние кобальта на витанию не изучалось, поэтому не были известны концентрации этого тяжелого металла, оптимальные для проведения экспериментов. Предварительный подбор концентраций кобальта проводили на одной из линий ВК в стеклянных пробирках объемом 50 мл с добавлением 10 мл жидкой среды. Тестировали концентрации от 0.1 до 5000 мкМ. По результатам этих опытов для проведения дальнейших экспериментов были отобраны концентрации 10, 50, 100 и 250 мкМ каждого из соединений. Линии корней А4 № 10, 15834 № 13, 14, 45 и 55 выращивали в колбах с добавлением 20 мл жидкой среды

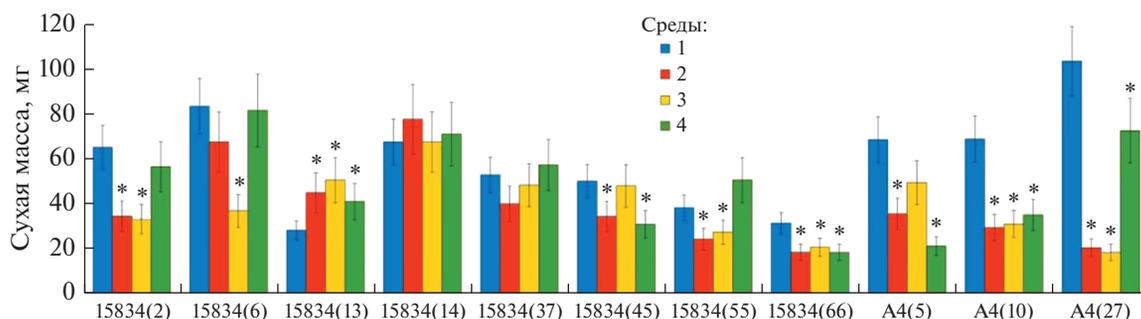
МС (pH 5.8, M0404, Sigma Aldrich,) и 40 г/л сахарозы (рис. 2b). Стоковый раствор с концентрацией кобальта 10 мг/мл фильтровали через 0.22 мкм бактофильтр и добавляли в питательную среду после автоклавирования. После 45 дней культивирования корни сушили при комнатной температуре в течение 5 дней и измеряли сухую массу. Для каждой линии эксперимент повторялся трижды. Статистическую обработку данных производили при помощи программного пакета Libre office.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Средняя сухая масса корней, выращенных на среде 1 составила 67.9 ± 19 мг, на среде 2 – 45.6 ± 15.1 мг, на среде 3 – 50.69 ± 13.8 мг, на среде 4 – 56.6 ± 13.3 мг. Таким образом, изменение состава сред не оказывало статистически значимого влияния на накопление биомассы культурами корней *W. coagulans*. Не обнаружено ожидаемого увеличения биомассы на средах с измененным составом, как это наблюдали у *W. somnifera* [15]. Сравнительные данные по накоплению биомассы корнями



**Рис. 2.** Рост ВК *W. coagulans* на экспериментальных питательных средах. (а) — среды с измененным содержанием макроэлементов и агара, слева направо: среды 2, 1, 4, 3 (b) — корни линии 15834(13) через 12 дней после посадки (слева направо: на среде без кобальта, а также с добавлением 10, 50, 100 и 250 мкМ кобальта трехвалентного).  
**Fig. 2.** Growth of *W. coagulans* HR on experimental nutrient media. (a)—media with modified content of macroelements and agar, from left to right: media 2, 1, 4, 3 (b)—roots of line 15834(13) 12 days after passage (from left to right: on a medium without cobalt, 10, 50, 100 and 250 μM trivalent cobalt).

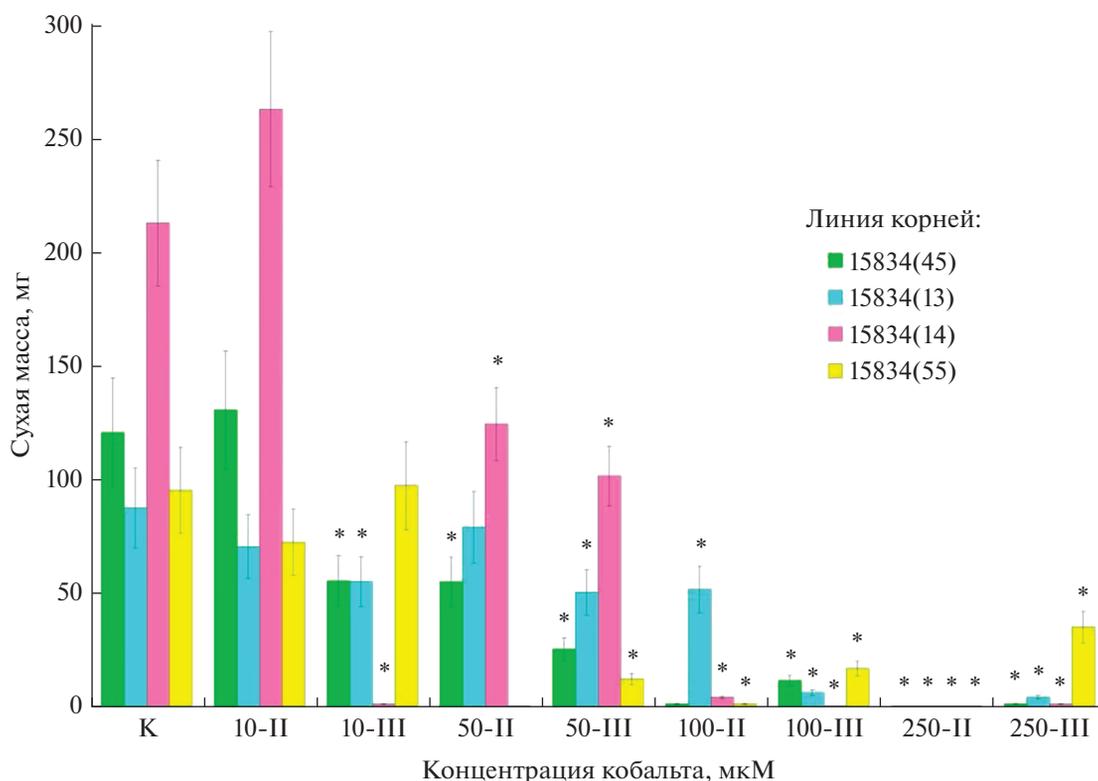


**Рис. 3.** Сравнение накопления биомассы 11 линиями корней *W. coagulans* на 4 типах сред. Статистически значимые различия относительно контроля (среды 1) отмечены как (\*).  
**Fig. 3.** Comparison of biomass accumulation by 11 *W. coagulans* root lines on 4 types of media. Statistically significant differences relative to the control (medium 1) are marked as (\*).

*W. coagulans* на 4 использованных в исследовании средах представлены на рис. 3. Семь линий корней накапливали максимальную биомассу на среде 1, две линии — на среде 4 и по одной линии на средах 2 и 3. Некоторые линии превосходили другие по набору биомассы на всех средах. Например, масса корней линии 14 на всех типах сред колебалась от 67.4 до 77.5 мг, тогда как масса корней линии 66 находилась в пределах от 18 до 31.1 мг. У всех линий корней, полученных с использованием штамма агробактерий A4, масса на среде 1 была достоверно выше, чем на других типах сред. У линий, полученных с использованием штамма 15834, со-

став среды влиял на рост корней в меньшей степени. Таким образом, на средние значения, вероятно, оказывали значительное влияние физиологические различия между линиями, тогда как анализ накопления биомассы отдельными линиями однозначно демонстрировал негативное влияние изменения состава макроэлементов в средах 2 и 3 на рост корней. Наилучшие показатели наблюдались в экспериментах со средами 1 и 4, где состав макро-солей оставался стандартным для сред МС.

Кобальт в виде соединения  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  содержится в среде МС в концентрации 0.1 мкМ (табл. 1) и является необходимым микроэлементом для жиз-



**Рис. 4.** Сравнение накопления сухой массы 4 линиями корней *W. coagulans* на средах с 4 различными концентрациями солей  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Co}^{3+}$ . Статистически значимые различия относительно контроля (среды без кобальта) отмечены как (\*).  
**Fig. 4.** Comparison of dry mass accumulation by 4 lines of *W. coagulans* roots on media with 4 different concentrations of  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Co}^{3+}$  salts. Statistically significant differences relative to the control (medium without cobalt) are marked as (\*).

недеятельности растений. В среднем на жидкой среде 1 корни набирали сухую массу  $128.5 \pm 35$  мг, тогда как при добавлении  $10 \text{ мкМ } \text{Co}^{2+}$  –  $133.5 \pm 50$  мг,  $50 \text{ мкМ } \text{Co}^{2+}$  –  $64.2 \pm 21$  мг,  $100 \text{ мкМ } \text{Co}^{2+}$  –  $14.3 \pm 12$  мг, а при  $250 \text{ мкМ } \text{Co}^{2+}$  рост корней не наблюдали. При добавлении  $10 \text{ мкМ } \text{Co}^{3+}$  сухая масса корней в среднем составляла  $51.8 \pm 38$  мг,  $50 \text{ мкМ } \text{Co}^{3+}$  –  $47 \pm 21$  мг,  $100 \text{ мкМ } \text{Co}^{3+}$  –  $8.45 \pm 6.9$  мг, а при  $250 \text{ мкМ } \text{Co}^{3+}$  –  $10.2 \pm 9$  мг. Таким образом, концентрации кобальта свыше  $10 \text{ мкМ}$  оказывали ингибирующее воздействие на рост культур корней.  $\text{Co}^{3+}$  сильнее ингибировал рост начиная с концентрации  $10 \text{ мкМ}$ , однако полное прекращение роста наблюдали только при добавлении  $250 \text{ мкМ } \text{Co}^{2+}$ . При такой же концентрации  $\text{Co}^{3+}$  рост полностью не ингибировался (рис. 4). Следует отметить, что линия А4(10) была более чувствительной к соединениям кобальта, чем линии, полученные с помощью штамма 15834. Рост корней этой линии практически отсутствовал во всех экспериментальных средах и не мог быть измерен, тогда как в контрольной среде их сухая масса достигала  $80.2$  мг.

Интересно отметить, что  $\text{Co}^{3+}$ , хотя и ингибировал рост корней в концентрации  $50 \text{ мкМ}$  и более, за-

медлял также их старение. По истечении 45 дней на контрольных средах и средах с добавлением  $\text{Co}^{2+}$  наблюдалось потемнение ВК, что является признаком старения. Корни, выращенные на различных концентрациях  $\text{Co}^{3+}$ , оставались светлыми и продолжали рост (рис. 5). Таким образом, увеличение содержания в среде  $\text{Co}^{3+}$  позволяло дольше сохранять их жизнеспособность.

В данной работе была впервые проведена оценка влияния состава питательной среды на рост волосовидных корней ценного растения – *W. coagulans*. Хотя для его ближайшего родственника *W. somnifera* было показано, что соотношение  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{NO}_3^-$ , а также повышенное содержание  $\text{MgSO}_4$  и  $\text{CaCl}_2$  положительно влияют на ростовые параметры культур ВК [14], мы не обнаружили аналогичной закономерности для объекта этого исследования. Для некоторых линий корней изменение состава среды МС негативно сказывалось на накоплении биомассы, что говорит о сбалансированности оригинального состава среды МС. Только у линии 15834(13) наблюдали достоверное увеличение массы при выращивании на средах 2, 3 и 4. Таким образом, предложенные варианты изменений состава питательной среды не могут быть использованы для



**Рис. 5.** Корни линии 15834(45) после сбора. Содержание солей кобальта в среде: (a) – контроль, (b) –  $\text{Co}^{2+}$  50 мкМ, (c) –  $\text{Co}^{3+}$  50 мкМ, (d) –  $\text{Co}^{2+}$  10 мкМ, (e) –  $\text{Co}^{3+}$  10 мкМ, (f) –  $\text{Co}^{3+}$  100 мкМ.

**Fig. 5.** Roots of line 15834(45) after collection. Content of cobalt salts in the medium: (a) – control, (b) –  $\text{Co}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$ , (c) –  $\text{Co}^{3+}$  50  $\mu\text{M}$ , (d) –  $\text{Co}^{2+}$  10  $\mu\text{M}$ , (e) –  $\text{Co}^{3+}$  10  $\mu\text{M}$ , (f) –  $\text{Co}^{3+}$  100  $\mu\text{M}$ .

повышения продуктивности волосовидных корней *W. coagulans*.

Избыточные концентрации солей действительно могут приводить к замедлению роста и потемнению корней [27]. Поскольку в среде 2 было увеличено содержание сразу трех солей, а не одной, как в вышеупомянутом исследовании [15], это могло негативно сказываться на наборе биомассы и приводить к преждевременному старению.

Для замедления старения и решения проблемы долговременного хранения культур корней без пересадок нами ранее применялись такие методы как увеличение концентрации NaCl и снижение содержания сахарозы [28]. Добавление маннитола и хранение при пониженных температурах были менее эффективными. Наши новые данные показывают, что для долговременного выращивания без пересадок также могут использоваться соли трехвалентного кобальта. Концентрация  $\text{Co}^{3+}$  100 мкМ эффективно сдерживала рост корней, при этом сохраняя их жизнеспособность и препятствуя потемнению. Эффект может объясняться влиянием кобальта на этиленовый сигналинг, что препятствует старению вегетативных тканей растения [20]. В связи с тем, что этилен также вызывает торможение роста, мы не наблюдали статистически достоверного увеличения биомассы корней при добавлении кобальта. При содержании ко-

бальта в среде в концентрации 50 мкМ и более масса корней снижалась у всех линий.

Таким образом, ни одна из использованных в данном исследовании модификаций состава среды не оказала положительного эффекта на рост корней *W. coagulans*. Поэтому представляется интересным исследование содержания ценных вторичных метаболитов – витанолида А, витаферина А, коагулина и др. в корнях, выращенных на средах с измененным содержанием макро- и микро-солей. Ранее было показано, что добавление  $\text{KNO}_3$  способствует накоплению витанолидов, тогда как  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  не оказывает такого эффекта [15]. О возможном влиянии кобальта на биосинтез биологически активных веществ в составе витании до сих пор ничего не известно, поэтому получение таких данных представляет особый интерес, тем более что соединения кобальта могут быть использованы для длительного хранения культур корней витании без пересадок, что является важным этапом их биотехнологического производства.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rathore M.S., Shekhawat S., Kau G., Singh R.P., Shekhawat N.S. Micropropagation of vegetable rennet (*Withania coagulans* [Stocks] Dunal)—a critically endangered medicinal plant. *J. Sustain. For.*, 2012, 31(8), 727–746.  
<https://doi.org/10.1080/10549811.2012.706533>

2. Khan M.I., Maqsood M., Saeed R.A., Alam A., Sahar A., Kieliszek M., Miecznikowski A., Muzammil H.S., Aadil R.M. Phytochemistry, Food Application, and Therapeutic Potential of the Medicinal Plant (Withania Coagulans): A Review. *Molecules*, 2021, 26 (22), 6881. <https://doi.org/10.3390/molecules26226881>
3. Maurya R. Chemistry and Pharmacology of *Withania Coagulans*: An Ayurvedic Remedy. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2010, 62 (2), 153–160. <https://doi.org/10.1211/jpp.62.02.0001>
4. Gupta R., Sonawane T., Pai S. An Overview on Pharmaceutical Properties and Biotechnological Advancement of *Withania Coagulans*. *ADV. TRADIT. MED. (ADTM)*, 2022, 22 (4), 673–683. <https://doi.org/10.1007/s13596-021-00558-7>
5. Ahmad Z., Shaheen A., Was A., Rehman S.U., Tahseen S., Ramakrishnan M., Upadhyay A., Ganie I.B., Shahzad A., Ding Y. Biotechnological Intervention and Withanolide Production in *Withania Coagulans*. *Agronomy*, 2023, 13 (8), 1997. <https://doi.org/10.3390/agronomy13081997>
6. Iqbal Choudhary M., Dur-e-Shahwar, Parveen Z., Jabbar A., Ali I., Atta-Ur-Rahman. Antifungal Steroidal Lactones from *Withania Coagulans*. *Phytochemistry*, 1995, 40 (4), 1243–1246. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00429-B](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00429-B)
7. Kuboyama T., Tohda C., Komatsu K. Neuritic Regeneration and Synaptic Reconstruction Induced by Withanolide A. *Br. J. Pharmacol.*, 2005, 144 (7), 961–971. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706122>
8. Mesaik M., Zaheerulhaq, Murad S., Ismail Z., Abdullah N., Gill H., Attaurrahman, Yousaf M., Siddiqui R., Ahmad A. Biological and Molecular Docking Studies on Coagulin-H: Human IL-2 Novel Natural Inhibitor. *Mol. Immunol.*, 2006, 43 (11), 1855–1863. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.10.020>
9. Mikhaylova E.V. Prospects for the Application of the Medicinal Plant *Withania Somnifera* for Biotechnological Production of Pharmaceuticals. *Bmcs*, 2022, 14 (3), 192–208. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2022-14>
10. Ahmadi S., Salehi M., Ausi S. Kinetic and Thermodynamic Study of Aspartic Protease Extracted from *Withania Coagulans*. *Int. Dairy J.*, 2021, 116, 104960. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104960>
11. Salehi M., Aghamaali M. R., Sajedi R. H., Asghari S. M., Jorjani E. Purification and Characterization of a Milk-Clotting Aspartic Protease from *Withania Coagulans* Fruit. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, 98, 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.034>
12. Mirjalili H.M., Fakhr-Tabatabaei S.M., Bonfill M., Alizadeh H., Cusido R.M., Ghassempour A., Palazon J. Morphology and Withanolide Production of *Withania Coagulans* Hairy Root Cultures. *Eng. Life Sci.*, 2009, 9 (3), 197–204. <https://doi.org/10.1002/elsc.200800081>
13. Ali A., Maher S., Khan S.A., Chaudhary M.I., Musharraf S.G. Sensitive Quantification of Six Steroidal Lactones in *Withania Coagulans* Extract by UH-PLC Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Steroids*, 2015, 104, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.09.011>
14. Murthy H.N., Dijkstra C., Anthony P., White D.A., Davey M.R., Power J.B., Hahn E.J., Paek K. Y. Establishment of *Withania Somnifera* Hairy Root Cultures for the Production of Withanolide A. *JIPB*, 2008, 50 (8), 975–981. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00680.x>
15. Praveen N., Murthy H. N. Withanolide A Production from *Withania Somnifera* Hairy Root Cultures with Improved Growth by Altering the Concentrations of Macro Elements and Nitrogen Source in the Medium. *Acta Physiol. Plant*, 2013, 35 (3), 811–816. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1125-5>
16. Murugesan P., Senthil K. Influence of auxin on biomass production and withanolide accumulation in adventitious root culture of indian rennet: *Withania coagulans*. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 2017, 10 (7), 131. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i7.17342>
17. Srivastava S., Srivastava A. K. Effect of Elicitors and Precursors on Azadirachtin Production in Hairy Root Culture of *Azadirachta Indica*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014, 172 (4), 2286–2297. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0664-6>
18. Jung K.-H., Kwak S.-S., Choi C.-Y., Liu J. R. Development of Two Stage Culture Process by Optimization of Inorganic Salts for Improving Catharanthine Production in Hairy Root Cultures of *Catharanthus Roseus*. *J. Ferment. Bioeng.*, 1994, 77 (1), 57–61. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(94\)90209-7](https://doi.org/10.1016/0922-338X(94)90209-7)
19. Касьянова А.Ю., Баширова Р.М., Кудашкина Н.В. Влияние внесения сульфата кобальта на содержание кумаринов в *Angelica archangelica* L. *Химия растительного сырья*, 2004, (1), 41–45. Kasyanova A. Yu., Bashirova R.M., Kudashkina N.V. Effect of adding cobalt sulfate on the content of coumarins in *Angelica archangelica* L. *Chem. Plant Raw Mater.*, 2004, (1), 41–45.
20. Lau O.L., Yang S.F. Inhibition of Ethylene Production by Cobaltous Ion. *Plant Physiol.*, 1976, 58 (1), 114–117. <https://doi.org/10.1104/pp.58.1.114>
21. Stephens C.M., Bauerle R. Analysis of the Metal Requirement of 3-Deoxy-D-Arabinose-7-Phosphate Synthase from *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266 (31), 20810–20817. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54781-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54781-5)
22. Fuller W.C., Gibson M.R. The Arginase-Alkaloid Relationship in *Datura Tatula* L. *JAPhA*, 1952, 41 (5), 263–266. <https://doi.org/10.1002/jps.3030410513>
23. Fouad A.S., Hafez R.M. Effect of Cobalt Nanoparticles and Cobalt Ions on Alkaloids Production and Expression of CrMPK3 Gene in *Catharanthus Roseus* Suspension Cultures. *Cell. Mol. Biol.*, (Noisy-le-grand), 2018, 64 (12), 62–69. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.12.13>

24. Bertani G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J. Bacteriol.*, 2004, 186(3), 595–600.  
<https://doi.org/10.1128/jb.186.3.595-600.2004>
25. Praveen N., Murthy H.N. Synthesis of Withanolide A Depends on Carbon Source and Medium pH in Hairy Root Cultures of *Withania Somnifera*. *Ind. Crops Prod.*, 2012, 35 (1), 241–243.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.07.009>
26. Yan J., Zhou Y., Xu B. Root Elongation in Agar Gels: Correlation with Agar Concentration and Rheology. *Mega J. Case Rep.*, 2023, 6, 2001–2012.
27. Sabir F., Sangwan R.S., Kumar R., Sangwan N.S. Salt Stress-Induced Responses in Growth and Metabolism in Callus Cultures and Differentiating In Vitro Shoots of Indian Ginseng (*Withania Somnifera* Dunal). *J. Plant Growth Regul.*, 2012, 31 (4), 537–548.  
<https://doi.org/10.1007/s00344-012-9264-x>
28. Musin K.G., Gumerova G.R., Gorte E., Baimukhametova E.A., Mikhaylova E.V., Kuluev B.R. Using Stress Factors for Storage of *Withania Somnifera* L. Hairy Roots without Passages. *Russ. J. Plant Physiol.*, 2021, 68 (3), 536–544.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443721030146>

## The Impact of the Content of Macro- and Microelements in the Culture Medium on the Productivity of *Withania coagulans* Hairy Root Cultures

E. V. Mikhaylova<sup>a, #</sup>, M. A. Panfilova<sup>a, c</sup>, V. V. Fedyaev<sup>b</sup>, and B. R. Kuluev<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of biochemistry and genetics Ufa federal research center RAS, Ufa, 450054 Russia

<sup>b</sup>Ufa University of science and technology, Ufa, 450076 Russia

<sup>c</sup>Ufa State Petroleum Technical University, Ufa, 450064 Russia

<sup>#</sup>e-mail: mikhele@list.ru

**Abstract**—*Withania coagulans* (Stocks) Dunal is a valuable medicinal plant with prospects for use not only in medicine, but also in the food industry. The hairy roots of withania are a more promising source of biologically active substances than the roots of plants grown in natural conditions. There is evidence of a positive effect of the compounds KNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> and CaCl<sub>2</sub> on the growth of the roots of *Withania somnifera* (L.) Dunal, cobalt salts on the growth of the roots of *Angelica archangelica* L., increased agar concentration on the growth of the roots of *A. thaliana*. In this work, the effect of these compounds on the growth of hairy roots of *W. coagulans* was studied for the first time. It has been shown that changed the composition of the MS medium does not contribute to an increase in the dry mass of the roots. An increase in the concentration of divalent cobalt inhibits root growth, while trivalent cobalt in a concentration of up to 100 μM prolongs viability of roots. The addition of [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub> can be used for long-term storage of withania root cultures without passages.

**Keywords:** *Withania coagulans*, *Withania somnifera*, hairy roots