

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУР НА АНАТОМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОКЛОНОВ *JUGLANS REGIA L. IN VITRO*

Терлецкая Н.В.<sup>1,2</sup>, Ербай М.<sup>1</sup>, Шаденова Е.А.<sup>1</sup>, Корбозова Н.К.<sup>1,2</sup>, Назарова И.<sup>1,2</sup>, Литвиненко Ю.А.<sup>1,2</sup>, Кудрина Н.О.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт генетики и физиологии КН МНВО РК, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы  
teni02@mail.ru

## АННОТАЦИЯ

Грецкий орех (*Juglans Regia L.*) – перспективное растение для использования в современной медицине. Описываются реакции микроклонов *Juglans Regia L.*, подвергнутых воздействию холодового стресса *in vitro* на уровне клеток и тканей. Показаны различия в оводненности растительных тканей и анатомо-морфологической структуры стебля и листа микроклонов *Juglans Regia L.* в контрольных и стрессовых условиях. Выявлены значительные изменения анатомических параметров различных тканей стебля как в сторону увеличения, так и снижения, и тенденция снижения значений анатомических параметров листа в условиях холодового стресса. Высказано предположение, что изменение анатомических характеристик органов и тканей микроклонов *Juglans Regia L.* может повлиять на фитохимическое содержание в них биологически-активных веществ, ценных для фармации.

**Ключевые слова:** *Juglans Regia L.*, микроклоны, *in vitro*, холодовой стресс, анатомия

## ВВЕДЕНИЕ

Грецкий орех (*Juglans Regia L.*) – растение, принадлежащее к роду *Juglans* из семейства *Juglandaceae*, – является листопадным деревом родом из региона, простирающегося от Балкан на восток до Гималаев и юго-западного Китая. [1]. Листья и облиственные молодые побеги грецкого ореха содержат множество химических элементов, в том числе калий, кальций, магний, фосфор и серу, а также биологически активных веществ (БАВ), таких как дубильные вещества, флавоноиды, фенольные кислоты, юглон и гидроюглон, экспрессирующих антиоксидантный и антимикробный потенциал, а также имеющих противовоспалительные, ранозаживляющие, антигельминтные, противодиарейные и многие другие свойства, положительно влияющие на здоровье человека и поэтому широко используемые в официальной медицине многих зарубежных стран и гомеопатической практике [2, 3, 4]. Но в настоящий момент грецкий орех не является официальным, в Казахстане, его качество не регламентируется нормативной документацией отечественной фармакопеи, что свидетельствует о целесообразности проведения комплексных отечественных исследований по изучению *Juglans Regia L.*

В настоящее время, согласно «Конвенции о биологическом разнообразии» Организации Объединенных Наций (ООН) 1993 года, актуальным и важным является как поддержание растительного биоразнообразия в естественных ареалах обитания (*in situ*), так и разработка перспективных методов сохранения ценного растительного материала в искусственных условиях (*ex situ* и *in vitro*). Но получение новых культур *in vitro* является важным также для изучения содержания в них биологически активных веществ и выделения суперпродуцирующих штаммов, которые позволят в лабораторных условиях возобновлять сырье лекарственных растений и продукты на его основе, отвечающие требованиям фармацевтической промышленности.

В современной научной литературе есть сведения о

том, что растения, вегетация которых проходит на фоне более жестких климатических условий, как правило, демонстрируют более высокие концентрации БАВ, чем растения тех же видов, культивируемые в условиях, оптимальных для роста [5]. Для фармацевтических целей даже изменение одного фактора может привести к значительной изменчивости содержания активных соединений [6, 7, 8].

Как показывают результаты наших предыдущих исследований, одним из первых признаков даже кратковременного стрессового воздействия на растения является изменение оводненности растительных тканей и анатомо-морфологической структуры листа, которые обуславливают дальнейшее изменение метаболизма [9 - 11]. В литературных источниках содержатся данные микроскопического анализа морфолого-анатомического строения различных органов и тканей грецкого ореха [12-15]. Однако до сих пор не было информации об изменении анатомо-морфологических характеристик листа грецкого ореха при стрессе.

Микроклоны растений *in vitro* могут стать хорошей моделью для изучения воздействия абиотических стрессоров на морфофизиологические и фитохимические процессы, происходящие в растительных тканях для создания оптимальных условий суперпродукции БАВ *in vitro*.

В связи с этим, целью данной работы было изучение влияния низких положительных температур на анатомические параметры и содержание воды в листостебельной части микроклонов *Juglans Regia L. in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве исходного материала для введения в культуру *in vitro* служили адвентивные и пазушные почки одревесневших побегов грецкого ореха (*Juglans regia*).

Для получения асептических культур стерилизацию эксплантов проводили в мыльном растворе с последующей обработкой перекисью водорода. Процедуру стерили-

лизации проводили в ламинар-боксе, вычленили почку и пикировали на модифицированную питательную среду DKW с ½ составом макроэлементов и концентрации фитогормонов БАП 1 мг/л с добавлением 0,2 мг/л НУК, глюкозы 20г/л, 7г/л агара, pH 5,7. Полученные в результате 300 побегов были подвергнуты воздействию низких положительных температур (3-5° С, далее – «холодовой стресс») в течение 72 часов.

Фиксация растительного материала для анатомических исследований проводилась в 70% этаноле, консервация – в смеси Страсбургера-Флемминга: 96% этанол: глицерин: вода в соотношении 1:1:1 [16]. Анатомические препараты готовились на микротоме МЗП-01 («Техном», Екатеринбург, Россия) с замораживающим устройством ОЛ-ЗСО 30 («Инмедпром», Ярославль, Россия). Микрофотографии анатомических срезов произведены на микроскопе с МС 300 (Вена, Австрия) САМ V400/1. 3М камера «Vision» (Вена, Австрия).

Для определения влажности сырья навеску сырья 3 г помещали, в предварительно высушенный и доведенный до постоянной массы бюкс, и ставили в сушильный шкаф при температуре 100-105°С на 30 минут. Охлаждали и взвешивали. Высушивание проводили до постоянной массы. Постоянная масса считается достигнутой, если разница между двумя последующими взвешиваниями после 30 мин высушивания и 30 мин охлаждения составляет не более 0,1 г. Влажность сырья (X) в процентах вычисляли по формуле (2.1):

$$X = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{(m_1 - m_0)}$$

где,  $m_0$  – масса пустого бюкса (с крышкой), высушенного до постоянной массы, г;  $m_1$ ,  $m_2$  – масса бюкса (с крышкой) с навеской сырья до и после высушивания соответственно, доведенные до постоянной массы, г.

Для определения общей золы в предварительно прокаленный и точно взвешенный фарфоровый тигель помещали около 1 г препарата или 3-5 г измельченного сырья. Тигель с навеской сырья нагревали сначала при более низкой температуре, давая веществу сгореть или улетучиться. Увеличивали пламя после того как оставшиеся частицы угля сгорят почти полностью. При неполном сгорании частиц угля остаток охлаждали, смачивали водой или насыщенным раствором аммония нитрата, выпаривали на водяной бане и остаток прокаливали. Прокаливание вели при слабом калении (около 500) до постоянной массы, избегая сплавления золы и спекания со стенками тигля. Затем тигель охлаждали в эксикаторе и взвешивали.

Общую золу (X) в процентах вычисляли по формуле (2.2):

$$X = \frac{m_2 \cdot 100 \cdot 100}{m_1 \cdot (100 - W)}$$

где,  $m_1$  – масса сырья, г;  $m_2$  – масса золы, г; W – влаж-

ность сырья, %.

Для определения экстрактивных веществ 1 г сырья, измельченного и просеянного сквозь сито, с отверстиями диаметром 1 мм, помещали в коническую колбу, приливали 50 мл растворителя, указанного в НД на данный вид сырья. Закрытую пробкой колбу оставляли на 1 ч. Затем колбу соединяли с обратным холодильником, нагревали и поддерживали слабое кипение жидкости в течение 2 ч. После охлаждения колбу с содержимым вновь закрывали той же пробкой, взвешивали и потерю в массе дополняли тем же растворителем. Содержимое тщательно взбалтывали и фильтровали через сухой бумажный фильтр в сухую колбу вместимостью 150-200 мл.

25 мл фильтрата переносили в фарфоровую чашку диаметром 7-9 см, предварительно высушенную при 100-105°С до постоянной массы и взвешенную на аналитических весах, выпаривали на водяной бане досуха, сушили при температуре 100-105°С в течение 3 ч., затем охлаждали в эксикаторе и быстро взвешивали [17].

Процентное содержание экстрактивных веществ X в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле (2.5):

$$X = \frac{m \cdot 200 \cdot 100}{m_1 \cdot (100 - W)}$$

где, m – масса сухого остатка в чашке, г;  $m_1$  – масса сырья, г; W – влажность сырья, %.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При анатомическом изучении стебля *Juglans Regia* L. отмечены такие особенности, как клетки ассимиляционной паренхимы, расположенные в несколько рядов под слоем эпидермы, имеющие округло-вытянутую форму, которые чередуются с большими межклетниками. Среди клеток первичной коры встречаются единичные включения. Центральный цилиндр представляет собой проводящую систему соседних проводящих пучков, расположенных по кругу. Сердцевина состоит из паренхиматозных клеток округлой или овальной формы.

На рисунке 1 показано, что склеренхимные и паренхимные клетки первичной коры стебля в контрольном варианте имеют четко выраженную структуру клеточных стенок и видны границы тканей, расположенных в конкретной последовательности. При охлаждении ткани теряют данную прочность формы и структурную целостность тканей, клетки которых располагаются неупорядоченно между собой, что может привести ослаблению твердости стебля.

При охлаждении стеблей было зафиксировано значительное увеличение параметров проводящих систем (ксилемы и флоэмы) в сравнении с контролем (Рисунок 1, Таблица 1).

При анализе анатомических параметров стебля отмечены значительные изменения в метрических параметрах различных тканей как в отрицательной, так и в положительной динамике (Таблица 1).

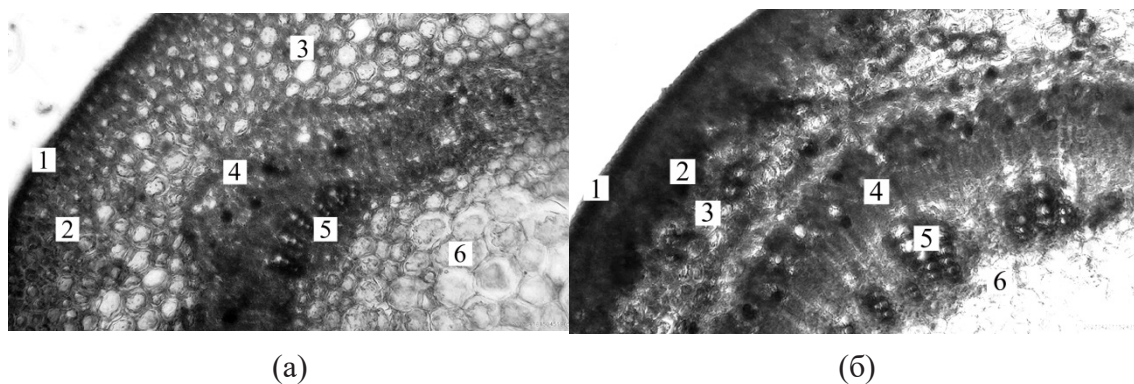


Рисунок 1 – Микроскопическое изображение поперечного среза стебля *Juglans Regia L.*: (а) – контроль, (б) – охлажденный; 1 – эпидермис; 2 – склеренхима; 3 – паренхима; 4 – флоэма; 5 – ксилема; 6 – сердцевина.

Таблица 1 – Измерение анатомических параметров стебля *Juglans Regia L.*

Условия	Толщина эпидермиса (мм)	Толщина колленхимы (мм)	Толщина склеренхимы (мм)	Толщина паренхимы (мм)	Толщина эндодермы (мм)	Площадь проводящих пучков (мм <sup>2</sup> )	Площадь флоэмы (мм <sup>2</sup> )	Площадь ксилемы (мм <sup>2</sup> )	Диаметр клеток (мм)
Конт-роль.	0,031±0,001	0,064±0,004	0,142±0,007	0,283±0,012	0,038±0,001	0,173±0,038	0,086±0,002	0,043±0,003	0,225±0,003
Холо-довой стресс	0,028±0,002	0,056±0,004	0,161±0,017	0,394±0,064	0,027±0,002	0,249±0,024	0,158±0,005	0,076±0,009	0,197±0,005

Так, выявлены значимые увеличения размеров проводящих пучков (как флоэмы (+83% к контролю), так и ксилемы (+86% к контролю), а также толщины паренхимной ткани (+38% к контролю) (Рис. 2).

При холодовом стрессе отмечены увядание и начинающийся хлороз листьев микроклонов *Juglans Regia L.* Листовая пластинка в условиях холодового стресса приобрела разреженную клеточную структуру. Клетки визуально уменьшались в размерах и структура тканей становилась более «сжатой» (рис. 3). При анализе размеров тканей и сравнении параметров гистологических структур отмечена разница в показателях контрольного и опытного вариантов с отрицательной динамикой при охлаждении (Таблица 2).

Эта тенденция наглядно показана на гистограмме (рис. 4), где показано, что диаметр паренхимных клеток при стрессе составил 85% от контрольных значений, а толщина абаксиального эпидермиса – 84% от контроля.

Рисунок 4 – Влияние низких положительных температур на анатомические параметры листа микроклонов *Juglans Regia L.*

Так как без анализов на доброкачественность растительное сырье не допускают к использованию в фармакологии, был проведен анализ растительного материала микроклонов *Juglans Regia L.*, как выращенных в контрольных условиях, так и подвергнутых холодовой обработке. Результаты представлены в Таблице 3.

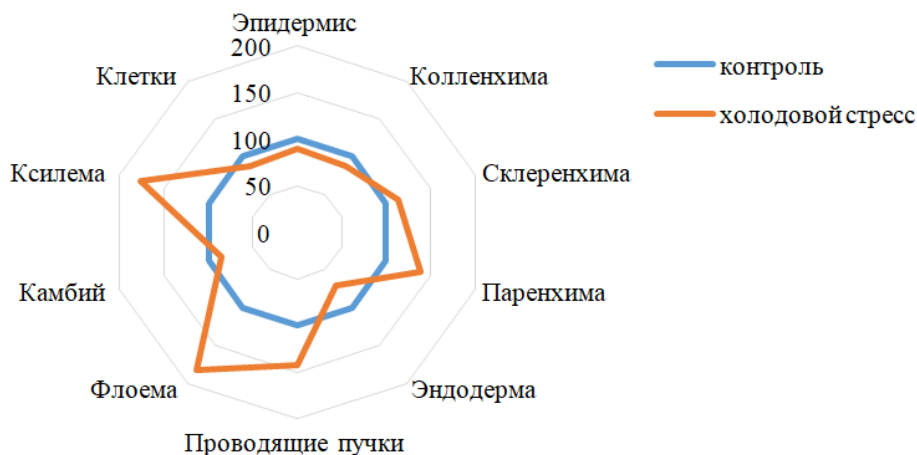


Рисунок 2 – Влияние низких положительных температур на анатомические параметры стебля микроклонов *Juglans Regia L.*

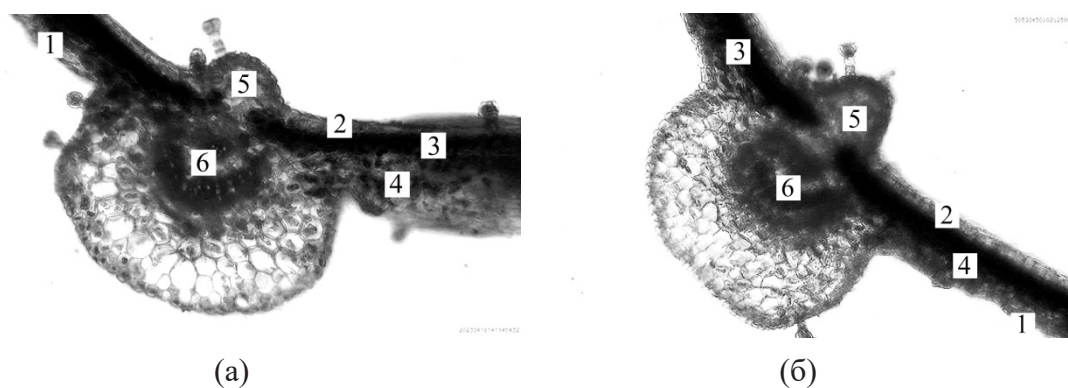


Рисунок 3 – Микроскопическое изображение поперечного среза центральной жилки листа *Juglans Regia L.*: (а) – контроль, (б) – холодовой стресс;

1 – адаксиальный эпидермис; 2 – абаксиальный эпидермис; 3 – палисадный слой мезофилла; 4 – губчатый слой мезофилла; 5 – центральная жилка; 6 – центральный проводящий пучок.

Таблица 2 – Влияние холодогов стресса на изменение анатомических параметров листа *Juglans Regia L.*

Усло-вия	Площадь центрального проводящего пучка (мм <sup>2</sup> )	Толщина эпидермиса, мм		Толщина мезофилла, мм			Диаметр центральной жилки, мм	Диаметр клетки паренхимы, мм
		Адаксиальный	Абаксиальный	Общий	Палисадный	Губ-чатый		
Контроль	0,183±0,009	0,040±0,002	0,041±0,002	0,183±0,014	0,079±0,003	0,099±0,013	0,956±0,033	0,083±0,004
Холодовой стресс	0,171±0,006	0,037±0,001	0,035±0,001	0,190±0,008	0,076±0,003	0,106±0,006	0,871±0,017	0,070±0,001

Таблица 3 – Показатели доброкачественности растительного сырья

Показатели	Контроль, %	Холодовой стресс, %
Влажность	9,78	14,85
Общая зола	12,60	17,01
Содержание экстрактивных веществ (водный экстракт)	17,06	18,30
Содержание экстрактивных веществ (спиртовой экстракт)	19,70	18,70

Выявлено, что по результатам проведенных исследований доброкачественность полученного растительного сырья находится в пределах допустимых норм, установленных ГФ РК.

## ОБСУЖДЕНИЕ

При современных условиях фармакогностических исследований приобретает значение определение ключевых анатомических микроскопических признаков, позволяющих определить подлинность ЛРС различного способа переработки [18]. Для листьев и стеблей возникает потребность в изучении фрагментов листа в поперечном сечении для исследования гистологической структуры и его изменения при различных стрессовых условиях [19].

Необходимое требование при изучении механизмов стрессоустойчивости – это поддержание константных контролируемых условий, которых достаточно сложно достичь при выращивании растений в открытом грунте или вегетационных сосудах. А культура *in vitro* позволяет за

сравнительно короткий период времени размножить экспериментальный материал, и провести необходимые тесты на ювенильных микроклонах, чрезвычайно чувствительных к негативному воздействию [20, 21].

Гипотермия, как и многие абиотические стрессы, например, осмотический или солевой, также ограничивает возможности роста и развития растений, хотя и не всегда уменьшает накопление биомассы, потому что при воздействии низких температур сохраняется или увеличивается оводненность растительных тканей, что мы наблюдали как ранее [9], так и в нашем эксперименте с микроклонами грецкого ореха, что показало определение доброкачественности растительного сырья, которая зависит от многих факторов и определяется временем заготовки, содержанием БАВ, уровнем влажности, отсутствием плесени, посторонних примесей и вредителей.

Однако, повреждение листьев микроклонов грецкого ореха холодом сопровождалась потерей ими тургора, что является следствием нарушения транспорта воды к транспирирующим органам. Анатомические исследова-



ния позволили выявить влияние низких положительных температур на проводящую систему, ведущее к уменьшению диаметров сосудов, а даже небольшое уменьшение их диаметра приводит к значительному снижению гидравлической проводимости сосудов [22, 23].

Но реакция на холодовой стресс разных органов растений различна. Известно, что к холодовому воздействию листья чувствительнее стеблей [24]. Нами отмечено увеличение размеров проводящих тканей стебля при холодовом стрессе по отношению к контролю: размеры ксилемы, проводящей воду и минералы от корней к различным частям растения, увеличилась на 76% по отношению к контролю, а размеры флоэмы, переносящей органические соединения из места фотосинтеза в разные части растения, при стрессе составила 83% по отношению к контрольным значениям. Это вызвано необходимостью импорта и экспорта большего объема воды и органических веществ, так как именно размеры сосудов являются критическими детерминантами проводимости [25]. На 39% при холодовом стрессе увеличилась толщина паренхимной ткани стебля. В целом, это и повлияло на увеличение общей оводненности растительных тканей микроклонов грецкого ореха при холодовом стрессе, что, в целом, возможно, является признаком адаптации к холодовому стрессу [26].

Но даже при высокой (в отличие от осмотического или солевого стрессов) гидратированности тканей, холодовой стресс может вызывать такие эффекты, как нарушение стабильности белков или белковых комплексов, снижение ферментативной активности, изменение количественного и качественного состава жирных кислот и т.д. [27]. Поскольку низкие температуры снижают скорость биохимических реакций, у растений нарушается баланс между поглощением энергии и ее использованием в метаболизме [28].

Именно изменение анатомических характеристик органов и тканей растения предопределяет физиологические процессы в нем. Адаптивные процессы связаны, прежде всего, со структурами органелл, клеток, тканей, которые имеют пространственные взаимоотношения друг с другом внутри растительных тканей [29]. И в первую очередь холодовой стресс вызывает повреждение хлорофиллоносных тканей листа, провоцируя многочисленные нарушения ультраструктуры клеточных мембран. Следовательно, к холодовому стрессу чувствительны такие мембраносвязанные процессы, как фотосинтез и дыхание [30]. И изменение анатомических параметров листа могут указывать на повреждение фотосинтетического аппарата.

Так, известно, что основную фотосинтетическую функцию выполняет мезофилл листа. В нашем эксперименте при воздействии холодового стресса отмечено утолщение мезофилла за счет утолщения слоя губчатой ткани. И если в контрольных условиях толщина губчатой ткани превышала толщину палисадной на 25%, то при холодовом стрессе – уже на 40%. Палисадная ткань, которая находится непосредственно под слоем эпидермиса и поглощает большую часть фотосинтетически активной радиации (ФАР), вносит больший вклад в фотосинтетическую продуктивность, чем губчатая, тогда как многоядная губчатая паренхима, которая служит главным образом для эффективного газообмена и транспирации, может

выполнять защитную функцию от стрессового температурного воздействия и пассивной потери влаги [31, 32]. Следовательно, изменение толщины мезофилла за счет снижения толщины палисадной ткани и увеличения толщины губчатой неизбежно поведет за собой изменение интенсивности фотосинтеза растений.

Отсутствие при холодовом стрессе существенных отклонений значений большинства анатомических параметров от контроля можно считать показателем резистентности данного вида к холодному климату континентальных регионов [33]. Но все же стоит учитывать уменьшение некоторых показателей, таких, как толщина адаксиального и абаксиального эпидермиса.

В адаптационных процессах к неблагоприятным условиям среды важную роль играет эпидермис листа. Лишь 5-10% УФ-радиации достигает клеток верхних слоев мезофилла, а основная часть поглощается флавоноидами, растворенными в вакуолях клеток эпидермиса. Возможно, что снижение толщины как абаксиального, так и адаксиального эпидермиса, отмеченное при холодовом стрессе в нашем эксперименте, может спровоцировать повышение концентрации флавоноидов, которая, как показывают данные литературы и наших предыдущих экспериментов, в стрессовых условиях обычно возрастает [10, 29, 34].

Поэтому наши исследования в данном направлении будут продолжены и дополнены анализом влияния холодового стресса на качественные и количественные изменения вторичных метаболитов в микроклонах грецкого ореха.

## ВЫВОДЫ

Внезапная холодовая обработка низкими положительными температурами (3-5° С в течение 72 часов) вызывает изменения анатомической структуры молодых клонов *Juglans Regia* L. *in vitro* – увеличение размеров мезофилла листа за счет увеличения губчатой ткани и повышенную гидратацию тканей за счет увеличения размеров проводящих сосудов и паренхимы стебля, и проводящих пучков стебля. Доброкачество полученного растительного сырья находится в пределах допустимых норм, установленных ГФ РК.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках задания «Разработка технологии направленной продукции природных антиоксидантов для создания новых фитопрепаратов для реабилитации спортсменов высокого уровня» Программы «Формирование комплексной системы подготовки высококвалифицированных спортсменов и перспективного олимпийского резерва по приоритетным для Казахстана видам спорта на основе физиолого-генетической оценки» BR18574139.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ключникова А.С., Нестерова О.В., Доброхотов Д.А., Ермакова В.Ю. Исторический опыт и перспективы использования листьев грецкого ореха в медицине (*Juglans Regia* L.) // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». - 2022. - Т. 24. - № 7. - С. 69-77. <https://doi.org/10.26907/2542-0275.2022.7.69-77>

org/10.26787/nydha-2686-6838-2022-24-7-69-77.

2. Saleida, A.M.; Janiewicz, J.; Korzeniewska, M.; Kolnyak-Ostek, J.; Krasnowska, G. Effect of adding green walnut husks on some qualitative properties of cooked sausages // *LWT Food Sci. Technol.* – 2016 - № 65. - P. 751-757.

3. Аслонова И.Ж., Кароматов И.Д., Тураева Н.И. Химический состав грецкого ореха // *Биология и интегративная медицина.* – 2019. - № 10 (38). - С. 77–83;

4. Genjemuratova G., Kudiyarova A., Safarboeva N. The analysis of the component of greek walnut leaf in the condition of Karakalpakstan // *American Journal Of Agriculture And Horticulture Innovations.* – 2021. - Vol.3 (6). – P. 17-22.

5. Sarker U., Oba S. Drought stress enhances nutritional and bioactive compounds, phenolic acids and antioxidant capacity of Amaranthus leafy vegetable // *BMC Plant Biology.* – 2018. - Vol.18. - Article number: 258.

6. Jan R., Asaf S., Numan M., Lubna L, Kim K.-M. Plant Secondary Metabolite Biosynthesis and Transcriptional Regulation in Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions // *Agronomy.* – 2021. - №11. - 968. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050968>

7. Selmar D., Kleinwächter M. Stress enhances the synthesis of secondary plant products: The impact of stress-related over reduction on the accumulation of natural products//*Plant Cell Physiol.*–2013. - №54. - 817-826. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct054>

8. Shulaev V., Cortes D., Miller G., Mittler R. Metabolomics for plant stress response // *Physiol. Plant.* – 2008. - № 132. – P. 199-208. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01025.x>.

9. Terletsкая N., Kurmanbayeva M. Change in leaf anatomical parameters of seedlings of different wheat species under conditions of drought and salt stress // *Pakistan Journal of Botany.* – 2017. - Vol. 49(3). - 857–865.

10. Terletsкая N.V., Seitimova G.A., Kudrina N.O., Meduntseva N.D., Ashimuly K. The Reactions of Photosynthetic Capacity and Plant Metabolites of *Sedum hybridum* L. in Response to Mild and Moderate Abiotic Stresses // *Plants.* – 2022. - № 11, 828. <https://doi.org/10.3390/plants11060828>.

11. Terletsкая N.V., Korbozova N.K., Kudrina N.O., Kobylina T.N., Kurmanbayeva M.S., Meduntseva N.D., Tolstikova T.G. The Influence of Abiotic Stress Factors on the Morphophysiological and Phytochemical Aspects of the Acclimation of the Plant *Rhodiola semenowii* Boriss // *Plants.* – 2021. - № 10. P. 1196. <https://doi.org/10.3390/plants10061196>.

12. Дайронас Ж.В., Зилфикаров И.Н. Орех грецкий -перспективное лекарственное растение // *Традиционная медицина.* – 2010. - № 3 (22). С. 118-23.

13. Еникеева Р.А. Исследование по фармакогностическому изучению и стандартизации сырья и препаратов ореха грецкого (*Juglans regia* L.). Автореф. дис. ... канд. фарм. наук / Р.А. Еникеева. - М., 2008.

14. Kurkin V.A., Ryzhov V.M., Tarasenko L.V., Zheleznikova A.S., Pomogaybin A.V. Morphological and

anatomical study of the rachis and petiole walnuts (*Juglans Regia* L.) // *Fundamental Research (Pharmaceutical sciences).* – 2014. - № 5. – P. 102-108.

15. Чебышев Н.В., Мартемьянова Л.О., Стреляева А.В, Лежава Д.И., Кузнецов Р.М. Изучение внешних признаков, микроскопии и химического состава перегородок грецкого ореха // *Сеченовский вестник.* - 2018. - № 4. <https://doi.org/10.26442/22187332.2018.4.60-69>

16. Handbook of Botanical Microtechnology (Foundations and Methods) / Barykina, R.P.; Veselova, T.D.; Devyatov, A.G.; Dzhililova, Kh.Kh.; Ilyina, G.M.; Chubatova, N.V. – М: MSU., Russia, 2004. - p. 312.

17. ОФС.1.5.3.0006.15 Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах. <https://pharmacopoeia.ru/>

18. Бобкова Н.В. Фармакогностическое изучение комплексных лекарственных растительных средств: дис... док. фарм. наук / Н.В. Бобкова. – Москва: ПМГМУ, 2017. - 275 с.

19. Зименкина Н.И. Сравнительное фармакогностическое исследование некоторых представителей рода Орех (*Juglans* L.): дис... канд. фарм. наук / Н.И. Зименкина. – Самара: СГМУ, 2022. – 221 с.

20. Богоутдинова Л.Р., Баранова Г.Б., Баранова Е.Н. Халилуев М.Р. Сравнительная анатомо-морфологическая характеристика клеток эпидермиса и паренхимы коры гипокотилия у двух генотипов томата (*Solanum Lycopersicum* L. ) в условиях хлоридного засоления *in vitro* // *Сельскохозяйственная биология.* – 2016. – Т. 51. - № 3. - С. 318-326. doi: 10.15389/agrobiology.2016.3.318rus;

21. Shibli R.A., Kushad M., Yousef G.G., Lila M.A. Physiological and biochemical responses of tomato microshoots to induced salinity stress with associated ethylene accumulation / *Plant Growth Regulation.* – 2007. - № 51(2). – P. 159-169. doi: 10.1007/s10725-006-9158-7.

22. Medek D.E., Evans J.R., Schortemeyer M., Ball M. Effects of growth temperature on photosynthetic gas exchange characteristics and hydraulic anatomy in leaves of two cold climate Poa species // *Function. Plant Biol.* - 2011. - V. 38. - P. 54-62.

23. Zwieniecki M.A., Melcher P.J., Michele Holbrook N.M. Hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants // *Science.* - 2001. - V. 291. - P. 1059–1062.

24. Климентова Е.Г. Приспособление и устойчивость растений: Учебное пособие для студентов экологического факультета / Климентова Е.Г., Сагаров Г. А., Зудова Т.А. – Ульяновск: УЛГУ, 2006. –53с.

25. Zhang, W.J., Z.L. Huang, Q. Wang and Y.N. Guan, 2015. Effects of low temperature on leaf anatomy and photosynthetic performance in different genotypes of wheat following a rice crop // *Int. J. Agric. Biol.* - № 17. – P. 1165–1171.

26. Bhat, A.A.; Shakeel, A.; Rafiq, S.; Farooq, I.; Malik, A.Q.; Alghuthami, M.E.; Alharthi, S.; Qanash, H.; Alharthy, S.A. *Juglans regia* Linn.: A Natural Repository of Vital Phytochemical and Pharmacological Compounds // *Life.* - 2023. - № 13. - P. 380. <https://doi.org/10.3390/life13020380>.

27. Orvar, B.L.; Sangwan, V.; Omann, F.; Dhindsa, R. Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity // *Plant J.* - 2000. - № 23. - P. 785–794.
28. Климов С.В. Адаптация растений к стрессам через изменение донорноакцепторных отношений на разных уровнях структурной организации // *Успехи совр. биол.* - 2008. - Т. 128 - № 3. - С. 281-299.
29. Чхубианишвили Е.И., Чанишвили Ш.Ш., Качарава Н.Ф., Бадридзе Г.Ш. Структурно-функциональные особенности листьев луговых растений в условиях высокогорий Малого Кавказа // *Физиология и биохимия культ. Растений.* - 2009. - Т.41. - №2. - С. 132-139.
30. Kolupaev, Y.E.; Gorelova, E.I.; Yastreb, T.O. Mechanisms of plant adaptation to hypothermia: Role of antioxidant system // *Вісник ХНАУ.* - 2018. - № 1. - P. 6–33.
31. Hajhashemi Set al., Effect of Cold Stress on Photosynthetic Traits, Carbohydrates, Morphology, and Anatomy in Nine Cultivars of *Stevia rebaudiana* // *Front Plant Sci.* - 2018. - № 9. - P. 1430. doi: 10.3389/fpls.2018.01430. PMID: 30323827; PMCID: PMC6172358;
32. Шмакова Н.Ю., Ермолаева О.В. Анатомо-физиологическая характеристика *Rhodiola Rosea* L. в условиях культуры полярно-альпийского ботанического сада (Мурманская область) // *Субтропическое и декоративное садоводство.* - 2021. - №77. - С. 141-151.
33. Gauthier, M.M., Jacobs, D.F. Walnut (*Juglans* spp.) ecophysiology in response to environmental stresses and potential acclimation to climate change // *Annals of Forest Science.* - 2011. - № 68. - P. 1277–1290. https://doi.org/10.1007/s13595-011-0135-6.
34. Li, B.Z.; Fan, R.N.; Sun, G.L.; Sun, T.; Fan, Y.T.; Bai, S.L.; Guo, S.Y.; Huang, S.Q.; Liu, J.; Zhang, H.; et al. Flavonoids improve drought tolerance of maize seedlings by regulating the homeostasis of reactive oxygen species // *Plant Soil.* - 2021. - № 461. - P. 389–40. https://doi.org/10.1007/s11104-020-04814-8
1. Kljuchnikova A.S., Nesterova O.V., Dobrohotov D.A., Ermakova V.Ju. Istoricheskij opyt i perspektivy ispol'zovaniya list'ev greckogo oreha v medicine (*Juglans Regia* L.) // *Mediko-farmaceuticheskij zhurnal «Pul's».* - 2022. - Т. 24. - № 7. - S. 69-77. https://doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2022-24-7-69-77.
2. Saleida, A.M.; Janiewicz, J.; Korzeniewska, M.; Kolnyak-Ostek, J.; Krasnowska, G. Effect of adding green walnut husks on some qualitative properties of cooked sausages // *LWT Food Sci. Technol.* - 2016 - № 65. - P. 751-757.
3. Aslonova I.Zh., Karomatov I.D., Turaeva N.I. Himicheskij sostav greckogo oreha // *Biologija i integrativnaja medicina.* - 2019. - № 10 (38). - S. 77–83;
4. Genjemuratova G., Kudiyarova A., Safarboeva N. The analysis of the component of greek walnut leaf in the condition of Karakalpakstan // *American Journal Of Agriculture And Horticulture Innovations.* - 2021. - Vol.3 (6). - P. 17-22.
5. Sarker U., Oba S. Drought stress enhances nutritional and bioactive compounds, phenolic acids and antioxidant capacity of *Amaranthus* leafy vegetable // *BMC Plant Biology.* - 2018. - Vol.18. - Article number: 258.
6. Jan R., Asaf S., Numan M., Lubna L., Kim K.-M. Plant Secondary Metabolite Biosynthesis and Transcriptional Regulation in Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions // *Agronomy.* - 2021. - №11. - 968. https://doi.org/10.3390/agronomy11050968
7. Selmar D., Kleinwächter M. Stress enhances the synthesis of secondary plant products: The impact of stress-related over reduction on the accumulation of natural products // *Plant Cell Physiol.* - 2013. - №54. - 817-826. https://doi.org/10.1093/pcp/pct054
8. Shulaev V., Cortes D., Miller G., Mittler R. Metabolomics for plant stress response // *Physiol. Plant.* - 2008. - № 132. - P. 199-208. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01025.x.
9. Terletsкая N., Kurmanbayeva M. Change in leaf anatomical parameters of seedlings of different wheat species under conditions of drought and salt stress // *Pakistan Journal of Botany.* - 2017. - Vol. 49(3). - 857–865.
10. Terletsкая N.V., Seitimova G.A., Kudrina N.O., Meduntseva N.D., Ashimuly K. The Reactions of Photosynthetic Capacity and Plant Metabolites of *Sedum hybridum* L. in Response to Mild and Moderate Abiotic Stresses // *Plants.* - 2022. - № 11, 828. https://doi.org/10.3390/plants11060828.
11. Terletsкая N.V., Korbozova N.K., Kudrina N.O., Kobylina T.N., Kurmanbayeva M.S., Meduntseva N.D., Tolstikova T.G. The Influence of Abiotic Stress Factors on the Morphophysiological and Phytochemical Aspects of the Acclimation of the Plant *Rhodiola semenowii* Boriss // *Plants.* - 2021. - № 10. P. 1196. https://doi.org/10.3390/plants10061196.
12. Dajronas Zh.V., Zilfikarov I.N. Oreh greckij -perspektivnoe lekarstvennoe rastenie // *Tradicionnaja medicina.* - 2010. - № 3 (22). S. 118-23.
13. Enikeeva R.A. Issledovanie po farmakognosticheskomu izucheniju i standartizacii syr'ja i preparatov oreha greckogo (*Juglans regia* L.). Avtoref. dis. ... kand. farm. nauk / R.A. Enikeeva. - M., 2008.
14. Kurkin V.A., Ryzhov V.M., Tarasenko L.V., Zheleznikova A.S., Pomogaybin A.V. Morphological and anatomical study of the rachis and petiole walnuts (*Juglans Regia* L.) // *Fundamental Research (Pharmaceutical sciences).* - 2014. - № 5. - P. 102-108.
15. Chebyshev N.V., Martem'janova L.O., Streljaeva A.V., Lezhava D.I., Kuznecov R.M. Izuchenie vneshnih priznakov, mikroskopii i himicheskogo sostava peregorodok greckogo oreha // *Sechenovskij vestnik.* - 2018. - № 4. https://doi.org/10.26442/22187332.2018.4.60-69
16. Handbook of Botanical Microtechnology (Foundations and Methods) / Barykina, R.P.; Veselova, T.D.; Devyatov, A.G.; Dzhaililova, Kh.Kh.; Ilyina, G.M.; Chubatova, N.V. - M: MSU., Russia, 2004. - p. 312.
17. OFS.1.5.3.0006.15 Opredelenie sodержaniya jekstraktivnyh veshhestv v lekarstvennom rastitel'nom syr'e i lekarstvennyh rastitel'nyh preparatah. https://pharmacopoeia.ru/
18. Bobkova N.V. Farmakognosticheskoe izuchenie



- kompleksnyh lekarstvennyh rastitel'nyh sredstv: dis... dok. farm. nauk / N.V. Bobkova. – Moskva: PMGMU, 2017. – 275 s.
19. Zimenkina N.I. Sravnitel'noe farmakognosticheskoe issledovanie nekotoryh predstavitelej roda Oreh (*Juglans L.*): diss... kand. farm. Nauk / N.I. Zimenkina. – Samara: SGMU, 2022. – 221 s.
20. Bogoutdinova L.R., Baranova G.B., Baranova E.N. Haliluev M.R. Sravnitel'naja anatomo-morfologicheskaja karakteristika kletok jepidermisa i parenhimy kory gipokotilja u dvuh genotipov tomata (*Solanum Lycopersicum L.*) v uslovijah hloridnogo zasolenija in vitro // Sel'skohozjajstvennaja biologija. – 2016. – T. 51. – № 3. – S. 318-326. doi: 10.15389/agrobiologija.2016.3.318rus;
21. Shibli R.A., Kushad M., Yousef G.G., Lila M.A. Physiological and biochemical responses of tomato microshoots to induced salinity stress with associated ethylene accumulation / *Plant Growth Regulation*. – 2007. – № 51(2). – P. 159-169. doi: 10.1007/s10725-006-9158-7.
22. Medek D.E., Evans J.R., Schortemeyer M., Ball M. Effects of growth temperature on photosynthetic gas exchange characteristics and hydraulic anatomy in leaves of two cold climate *Poa* species // *Function. Plant Biol.* – 2011. – V. 38. – P. 54-62.
23. Zwieniecki M.A., Melcher P.J., Michele Holbrook N.M. Hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants // *Science*. – 2001. – V. 291. – P. 1059–1062.
24. Klimentova E.G. Prispособlenie i ustojchivost' rastenij: Uchebnoe posobie dlja studentov jekologicheskogo fakul'teta / Klimentova E.G., Satarov G. A., Zudova T.A. – Ul'janovsk: UIGU, 2006. – 53s.
25. Zhang, W.J., Z.L. Huang, Q. Wang and Y.N. Guan, 2015. Effects of low temperature on leaf anatomy and photosynthetic performance in different genotypes of wheat following a rice crop // *Int. J. Agric. Biol.* – № 17. – P. 1165–1171.
26. Bhat, A.A.; Shakeel, A.; Rafiq, S.; Farooq, I.; Malik, A.Q.; Alghuthami, M.E.; Alharthi, S.; Qanash, H.; Alharthy, S.A. *Juglans regia* Linn.: A Natural Repository of Vital Phytochemical and Pharmacological Compounds // *Life*. – 2023. – № 13. – P. 380. <https://doi.org/10.3390/life13020380>.
27. Orvar, B.L.; Sangwan, V.; Omann, F.; Dhindsa, R. Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity // *Plant J.* – 2000. – № 23. – P. 785–794.
28. Klimov S.V. Adaptacija rastenij k stressam cherez izmenenie donornoakceptornyh otnoshenij na raznyh urovnjah strukturnoj organizacii // *Uspehi sovr. biol.* – 2008. – T. 128 – № 3. – S. 281-299.
29. Chhubianishvili E.I., Chanishvili Sh.Sh., Kacharava N.F., Badridze G.Sh. Strukturno-funkcional'nye osobennosti list'ev lugovyh rastenij v uslovijah vysokogorij Malogo Kavkaza // *Fiziologija i biohimija kul't. Rastenij*. – 2009. – T.41. – №2. – S. 132-139.
30. Kolupaev, Y.E.; Gorelova, E.I.; Yastreb, T.O. Mechanisms of plant adaptation to hypothermia: Role of antioxidant system // *Вісник ХНАУ*. – 2018. – № 1. – P. 6–33.
31. Hajhashemi Set al., Effect of Cold Stress on Photosynthetic Traits, Carbohydrates, Morphology, and Anatomy in Nine Cultivars of *Stevia rebaudiana* // *Front Plant Sci.* – 2018. – № 9. – 1430. doi: 10.3389/fpls.2018.01430. PMID: 30323827; PMCID: PMC6172358;
32. Shmakova N.Ju., Ermolaeva O.V. Anatomo-fiziologicheskaja karakteristika *Rhodiola Rosea L.* v uslovijah kul'tury poljarno-al'pijskogo botanicheskogo sada (Murmanskaja oblast') // *Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo*. – 2021. – №77. – S. 141-151.
33. Gauthier, M.M., Jacobs, D.F. Walnut (*Juglans* spp.) ecophysiology in response to environmental stresses and potential acclimation to climate change // *Annals of Forest Science*. – 2011. – № 68. – P. 1277–1290. <https://doi.org/10.1007/s13595-011-0135-6>.
34. Li, B.Z.; Fan, R.N.; Sun, G.L.; Sun, T.; Fan, Y.T.; Bai, S.L.; Guo, S.Y.; Huang, S.Q.; Liu, J.; Zhang, H.; et al. Flavonoids improve drought tolerance of maize seedlings by regulating the homeostasis of reactive oxygen species // *Plant Soil*. – 2021. – № 461. – P. 389–40. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04814-8>



**INFLUENCE OF LOW POSITIVE TEMPERATURES ON ANATOMICAL CHARACTERISTICS  
UGLANS REGIA L. IN VITRO MICROCLONES**

Terletskaya N.V.<sup>1,2</sup>, Yerbay M.<sup>1</sup>, Shadenova E.A.<sup>1</sup>, Korbozova N.K.<sup>1,2</sup>, Nazarova I.<sup>1,2</sup>, Litvinenko Ju.A.<sup>1,2</sup>, Kudrina N.O.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Physiology MES RK, Kazakhstan, Almaty

<sup>2</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty  
teni02@mail.ru

**ABSTRACT**

Walnut (*Juglans Regia L.*) is a promising plant for use in modern medicine. We describe the reactions of *Juglans Regia L.* microclones exposed to cold stress *in vitro* at the cell and tissue level. Differences in the water content of plant tissues and the anatomical and morphological structure of the stem and leaf of *Juglans Regia L.* microclones under control and stress conditions are shown. Significant changes in the anatomical parameters of various stem tissues, both upward and downward, and a tendency for the values of the anatomical parameters of the leaf to decrease under cold stress conditions were revealed. It has been suggested that changes in the anatomical characteristics of organs and tissues of *Juglans Regia L.* microclones may affect the phytochemical content of biologically active substances in them, valuable for pharmacy.

**Keywords:** *Juglans Regia L.*, microclones, *in vitro*, cold stress, anatomy

**JUGLANS REGIA L. IN VITRO МИКРОКЛОНДАРЫНЫҢ АНАТОМИЯЛЫҚ СИПАТТАМАЛАРЫНА  
ТӨМЕН ОҢ ТЕМПЕРАТУРАЛАРДЫҢ ӘСЕРІ**

Терлецкая Н.В.<sup>1,2</sup>, Ербай М.<sup>1</sup>, Шаденова Е.А.<sup>1</sup>, Корбозова Н.К.<sup>1,2</sup>, Назарова И.<sup>1,2</sup>, Литвиненко Ю.А.<sup>1,2</sup>, Кудрина Н.О.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігінің Генетика және физиология институтында, Қазақстан Республикасы, Алматы қаласы

<sup>2</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы  
teni02@mail.ru

**ТҮЙІН**

Жаңғақ (*Juglans Regia L.*) - қазіргі заманғы медицинада қолданылатын перспективті өсімдік. *Juglans Regia L.* микроклондарының *in vitro* жағдайында жасуша және ұлпа деңгейінде суық стресске ұшыраған реакциялары сипатталған. Бақылау және стресс жағдайында *Juglans Regia L.* микроклондарының сабағы мен жапырағының анатомиялық және морфологиялық құрылымы мен өсімдік ұлпаларының сулануындағы айырмашылықтар көрсетілген. Сабақтың әртүрлі ұлпаларының анатомиялық параметрлерінің айтарлықтай жоғары және төмен бағыттағы өзгерістері және суық стресс жағдайында жапырақтың анатомиялық параметрлерінің мәндерінің төмендеу тенденциясы анықталды. *Juglans Regia L.* микроклондарының мүшелері мен ұлпаларының анатомиялық сипаттамаларының өзгеруі олардағы фармация үшін құнды биологиялық белсенді заттардың фитохимиялық құрамына әсер етуі мүмкін деген болжам жасалды.

**Түйін сөздер:** *Juglans Regia L.*; микроклондар; *in vitro*; суық стресс; анатомия