

А.К. Аргумбаева, А.О. Рахимжанова, А.К. Каканай, Ш.А. Манабаева\*

Национальный центр биотехнологии КН МОН РК, Нур-Султан, Казахстан

\*Автор для корреспонденции: manabaeva@biocenter.kz

## Особенности индуцированного морфогенеза и регенерации растений из соматических тканей люцерны сортов отечественной селекции в культуре *in vitro*

**Аннотация.** Изучены особенности морфогенеза и регенерации люцерны сортов отечественной селекции в культуре *in vitro*. В результате проведенных исследований отработан протокол стерилизации семян люцерны с использованием различных стерилизующих агентов, и отмечено получение 100% асептических жизнеспособных проростков для последующих культуральных работ. Для инициации каллусов в качестве эксплантов использовали семядоли и гипокотили, культивируя их на питательной среде Гамборга В5 с добавлением 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и кинетина - 5,0 мг/л, нафтилуксусной кислоты (НУК) - 0,1 мг/л. Морфогенные каллусные ткани индуцированы на среде Гамборга В5 с 6-бензиламинопурином (БАП) - 0,2 мг/л. Эффективной средой для развития побегов отмечена безгормональная среда Гамборга В5, а также  $\frac{1}{2}$  данной среды с добавлением кинетина 0,2 мг/л. Установлено, что отработанный протокол получения растений-регенерантов из каллусных культур люцерны является эффективным для использования биотехнологических методов по расширению генетической основы люцерны.

**Ключевые слова:** люцерна, культура каллусов, фитогормоны, растения-регенеранты.

DOI: 10.32523/2616-7034-2022-139-2-97-106

### Введение

Люцерна (*Medicago*) – род двудольных однолетних и многолетних травянистых растений из семейства Бобовых (Fabaceae). Род люцерны широко распространён в Средиземноморском регионе, доходя до Испании и Канарских Островов на западе, Китая на востоке, Сибири на севере и Йемена на юге [1]. Насчитывает более 60 видов [1]. Важнейшими представителями данного рода являются люцерна посевная (*Medicago sativa*), люцерна желтая (*Medicago falcata*) и люцерна изменчивая (*Medicago varia*) [2].

В настоящее время некоторые классические методы классификации люцерны по морфологическим признакам, как оттенок цветка, форма стручка, пыльцы, т. д. требуют корректировки. Развитие и доступность молекулярных методов могут служить действенным инструментом в этом направлении исследований [3].

Люцерна играет важную роль в фармакологии, имея в составе сапонины, понижающие уровень холестерина, что благоприятно влияет на сердечно-сосудистую и нервную систему [4], и в кормовой отрасли благодаря сравнительно высоким количествам зеленой массы на гектар и количеству перевариваемого протеина [5]. Кроме того, люцерна является медоносной культурой, а также особый интерес представляет способность растений удобрять и восстанавливать водный баланс почвы благодаря глубокой корневой системе и симбиозу с азотофиксирующими бактериями.

Первая успешная работа по получению регенерантов люцерны описана в работе Сандерса и Бингхэма в 1972 году с помощью способа соматического эмбриогенеза посредством использования среды Блэйдс с сочетанием гормонов кинетин, НУК, 2,4-Д [6]. Авторами было

установлено, что эмбриогенный потенциал люцерны не зависит от типов экспланта, процесс соматического эмбриогенеза может быть начат из любой части растения [6].

Исследования по регенерации люцерны являются актуальными и в настоящее время, востребованность люцерны в агропромышленном комплексе, медицине, в косметологической и пищевой промышленности и других отраслях с каждым годом возрастает благодаря не только издревле известным, но и новым выявляемым свойствам данного растения.

Известно, что способность к морфогенезу в условиях *in vitro* у различных органов одного и того же растения различна. Более того, установлено, что морфогенетический потенциал культивируемых тканей люцерны зависит не только от органа, от вида экспланта, но и его физиологического возраста, размера, анатомических и функциональных особенностей [7,8].

Строевой и Дархановой удалось индуцировать каллусные клетки из листовых эксплантов у люцерны изменчивой при использовании аналогичной комбинации гормонов, что и у Сандерса, с дальнейшим получением эмбриогенных клеток с помощью высокой концентрации ауксинов по 8,0 мг/л 2,4-Д и кинетина и 5,0 мг/л – НУК на модифицированной среде Гамборга В5, исследования проведены только на одном сортообразце Сюлинская [9]. В результате комплексных исследований по морфогенезу люцерны в культуре *in vitro* выявлена зависимость морфогенетических реакций от генотипа [10,11,12].

В некоторых исследованиях изучается эффект различных гормонов на индукцию побегообразования люцерны. Гхотби с коллегами изучал эффект разных концентраций ауксина на укоренение побегов люцерны [13]. Подробный процесс соматического эмбриогенеза и получение регенерантов люцерны посевной, а также методы генетической трансформации, вопросы взаимодействия люцерны с полезными микроорганизмами описаны в статье Тича и др. [14]. Французскими учеными установлено, что дополнительная экспрессия гена WUSCHEL стимулирует каллусогенез и соматический эмбриогенез [15].

Методами генетической инженерии люцерны успешно трансформируется с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, начиная с 1980-х годов, однако до сих пор не существует универсальной процедуры трансформации для различных сортов в пределах одного вида. Нерешенной проблемой, сдерживающей разработку и широкое использование технологий для улучшения люцерны, являются существенная зависимость процесса морфогенеза *in vitro* от исходного генотипа и отсутствие четко регулируемых систем регенерации растений в культуре клеток и тканей.

Задачей данного исследования является изучение морфогенетического и регенерационного потенциала сортов люцерны местной селекции с целью отбора отзывчивых генотипов для последующей *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. Данный этап работы является необходимым для успешной реализации проекта, направленного на создание генетически улучшенных растений люцерны.

## Материалы и методы

В качестве объекта исследований использовали семена 3 сортов люцерны изменчивой (*M.varia*): Шортандинская 2, Райхан и Лазурная. Все сорта люцерны были выведены методами селекции в НППЦЗХ им. А.Бараева. Сорта отличаются особой устойчивостью к болезням, засухо- и зимоустойчивы, обладают высокой урожайностью по приросту зеленой массы и семенами.

Для введения в культуру *in vitro* и изучения инициации каллусных культур в исследованиях использованы асептические растения. Стерилизацию семян проводили в 2 этапа: 1- семена помещали в раствор «Белизны», содержащего в составе активное вещество гипохлорит натрия (время экспозиции 30, 40 и 60 минут), с добавлением 1-2 капли твина-20, и помещивали на шейкере. Затем тщательно промывали 3–5 раз стерильной дистиллированной водой; 2 - семена

обрабатывали в растворе 70% этанола (время экспозиции 1 минута), затем промывали 3–5 раз стерильной водой.

Стерилизованные семена проращивали на безгормональной агаризованной питательной среде Гамборга В5. Из полученных асептических проростков получили экспланты семядолей и гипокотилей.

Для получения каллусной массы сегменты семядолей и гипокотилей 7-дневных асептических проростков культивировали в чашках Петри, содержащей 20-25 мл агаризованной питательной среды Гамборга В5 с различной комбинацией и концентрацией ростовых регуляторов (таблица 1). В качестве желирующего агента использовали фитогель в количестве 2 г/л.

Культивирование эксплантов проводили при температуре 25-27°C, при дополнительном освещении 2,5-3,0 тыс.лк. с 16-часовым фотопериодом и при 70% относительной влажности воздуха. Частоту каллусогенеза (%) оценивали по количеству эксплантов, индуцирующих каллус, от общего числа эксплантов.

Таблица 1

**Состав питательных сред для индукции каллусообразования и регенерации люцерны**

| № | Фитогормоны (мг/л) | Каллусогенез |        |         |       |        |         | Регенерация |        |         |
|---|--------------------|--------------|--------|---------|-------|--------|---------|-------------|--------|---------|
|   |                    | В5К I        | В5К II | В5К III | В5V I | В5V II | В5V III | В5Р I       | В5Р II | В5Р III |
| 1 | 2,4-Д              | 8,0          | 5,0    | 2,0     | –     | –      | –       | –           | –      | –       |
| 2 | Кинетин            | 8,0          | 5,0    | 2,5     | –     | –      | –       | –           | –      | –       |
| 3 | НУК                | 0,5          | 0,1    | 0,1     | –     | –      | –       | –           | –      | –       |
| 4 | БАП                | –            | –      | –       | 0,5   | 0,5    | 0,7     | 0,2         | 0,5    | 1,0     |
| 5 | ГКЗ                | –            | –      | –       | 10,0  | 5,0    | 2,0     | –           | –      | –       |

Через 3-4 недели индуцированные морфогенные каллусы были перенесены на среду для регенерации, стимулирующую развитие зеленых хлорофиллсодержащих участков, в качестве регуляторов роста использовали БАП в концентрациях 0,2 мг/л, 0,5 мг/л и 1,0 мг/л соответственно. Через 30 дней культивирования, при формировании морфогенных зон, каллусные ткани пассировали на среду В5 для оптимизации побегообразования. Для дальнейшего развития побегов использовали среду 1/2 В5 с добавлением кинетина в концентрации 0,2 мг/л.

**Результаты исследований**

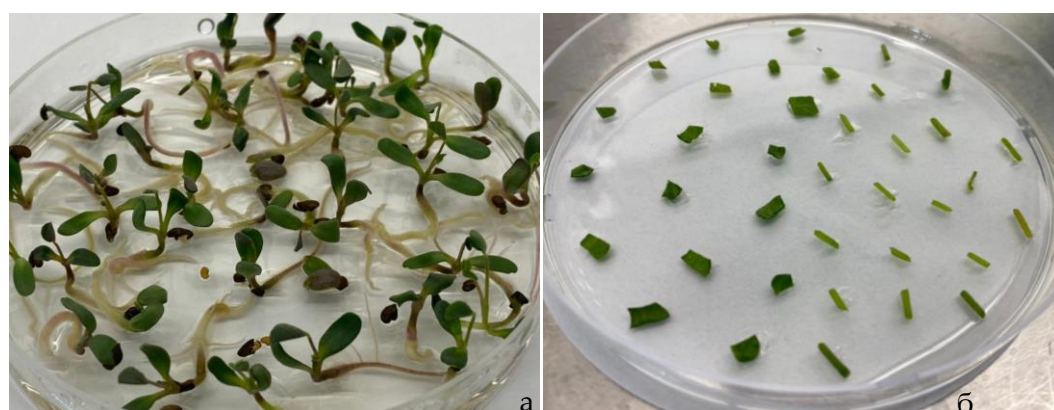
Первым и основным этапом исследований для получения изолированных клеток, тканей и органов растений является стерилизация растительного материала. Результаты проведенных исследований по обеззараживанию семян люцерны представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Выход асептического и жизнеспособного материала при стерилизации люцерны изменчивой**

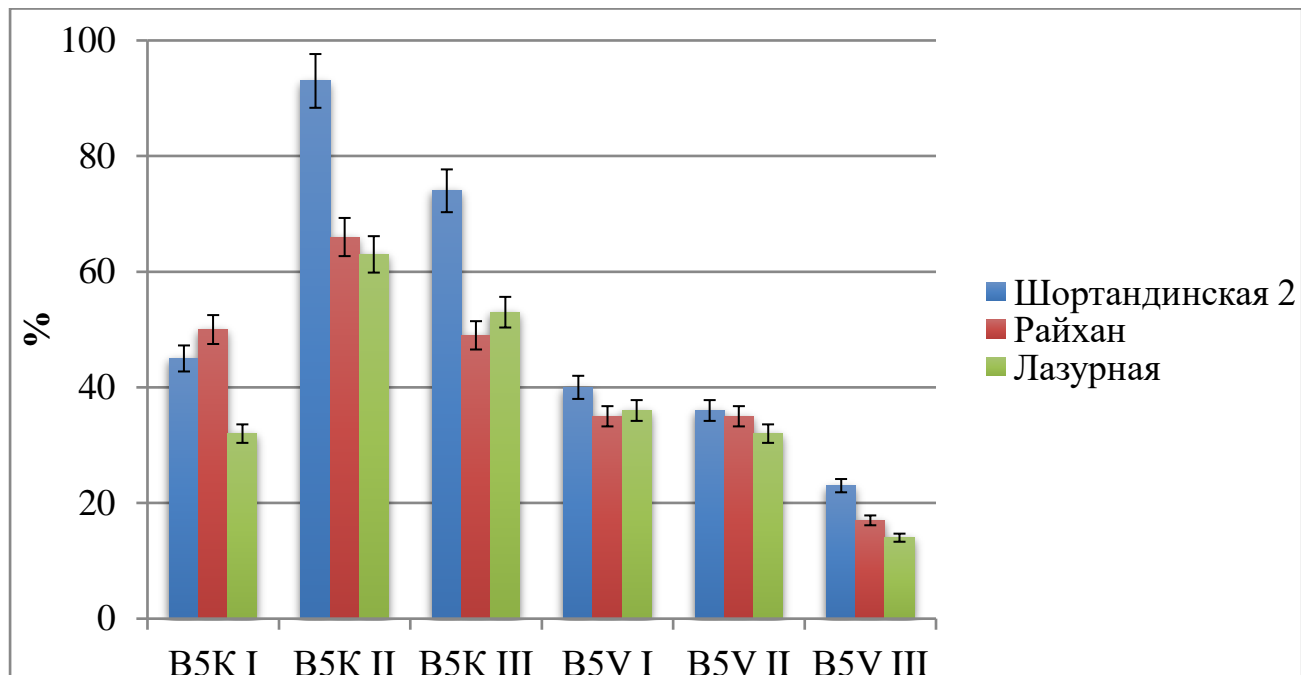
| Время экспозиции, мин. | Общее количество семян, шт. | Число семян, шт (%)        |             |                              |             |                |             |
|------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------|------------------------------|-------------|----------------|-------------|
|                        |                             | Асептически жизнеспособные |             | Асептически нежизнеспособные |             | Инфицированные |             |
| 30                     | 60                          | 44                         | 73,3 ± 0,63 | 1                            | 1,6 ± 2,60  | 15             | 25,0 ± 0,17 |
| 40                     | 62                          | 54                         | 87,0 ± 0,75 | 3                            | 4,8 ± 3,50  | 5              | 8,2 ± 4,30  |
| 60                     | 65                          | 46                         | 70,7 ± 0,61 | 18                           | 27,7 ± 0,15 | 1              | 1,6 ± 2,6   |

По итогам проведенных экспериментов оптимальным временем стерилизации семян люцерны является 40 минут. Обработка в течение 30 минут показала наиболее высокий процент инфицирования семян, а более продолжительная обработка в течение 60 минут приводила к снижению жизнеспособности. На рисунке 1 представлены асептические 7-дневные проростки семян люцерны и сегменты семядолей и гипокотилей на среде для каллусообразования.



**Рисунок 1. а - стерильные 7-дневные проростки семян люцерны; б - изолированные экспланты на среде для каллусогенеза**

Каллусообразующая способность сортов люцерны показана на рис. 2.



**Рисунок 2. Интенсивность каллусогенеза сортов люцерны изменчивой**

По итогам мониторинга, на 30 день культивирования высокий прирост каллусной ткани показал сорт Шортандинская 2 (93,0%) на варианте среды B5K II, содержащей в составе: 2,4-Д- 5,0 мг/л, кинетин-5,0 мг/л и НУК- 0,1 мг/л. Необходимо отметить, что все сорта, использованные в эксперименте, отличались хорошим пролиферативным потенциалом и на других модификациях средах. Например, сорт Райхан - 66,0%, Лазурная-63,0%. Оптимальным вариантом питательной среды для каллусогенеза, где выявлен активный рост ткани, является среда B5K II, которая также оказалась оптимальной для длительного культивирования каллусов. При увеличении или снижении концентрации фитогормонов отмечался низкий прирост каллусной массы.

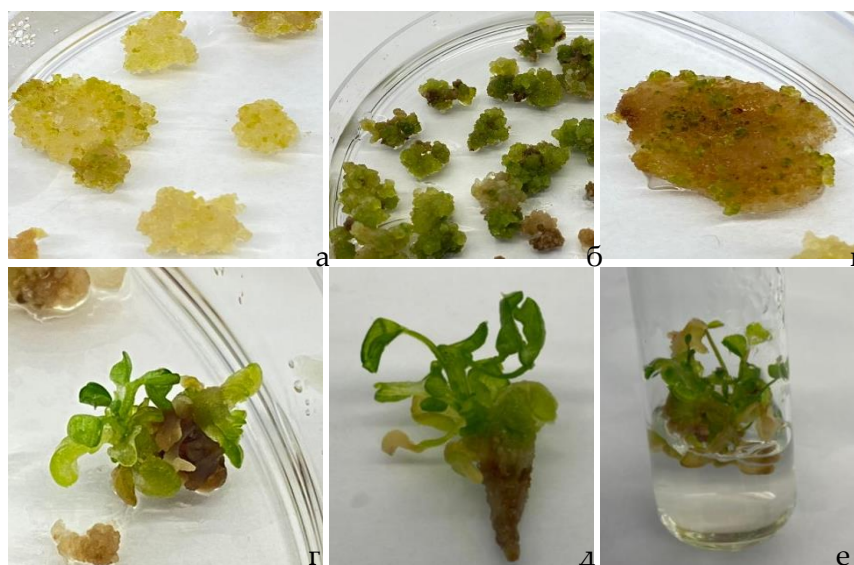
На модификациях сред с добавлением БАП и ГКЗ отмечался частичный некроз эксплантов, а также минимальный процент формирования каллусной ткани. Для получения растений-регенерантов полученные рыхлые и обводненные каллусы пассировали на 3 варианта питательной среды B5P. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3

**Частота морфогенеза и регенерации сортов люцерны изменчивой**

| Вариант питательной среды | Шортандинская 2      |                        | Райхан               |                        | Лазурная             |                        |
|---------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
|                           | Кол-во каллусов, шт. | Частота регенерации, % | Кол-во каллусов, шт. | Частота регенерации, % | Кол-во каллусов, шт. | Частота регенерации, % |
| В5Р I                     | 31                   | 77,5 ± 0,65            | 26                   | 65,3 ± 0,51            | 29                   | 55,2 ± 0,41            |
| В5Р II                    | 29                   | 62,1 ± 0,49            | 24                   | 58,3 ± 0,43            | 31                   | 25,9 ± 0,18            |
| В5Р III                   | 27                   | 37,2 ± 0,28            | 29                   | 24,2 ± 0,15            | 25                   | 24,0 ± 0,15            |

На варианте среды с содержанием БАП в концентрации 0,2 мг/л у трех сортов люцерны отмечался высокий процент образования морфогенного каллуса с многочисленными меристемными зонами. При увеличении концентрации данного цитокинина до 1,0 мг/л отмечено негативное влияние и снижение процента регенерации, наименьший процент регенерации показали сорт Лазурная и Райхан. При культивировании на среде Гамборга В5 с витаминами Гамборга В5 в течение 14 дней наблюдался рост побегов с простыми листьями, однако при последующем культивировании на данной среде наблюдаются торможение роста и развития, а также некроз эксплантов. Для дальнейшего развития побеги переносили на ½ среды Гамборга В5, содержащей кинетин в концентрации 0,2 мг/л. На данной среде получены растения-регенеранты и регенерационная способность варьировала от 55,2% до 77,5%.



**Рисунок 3. а - формирование каллусной ткани; б - темно-зеленый каллус с многочисленными меристемными зонами; в - морфогенные каллусы, сорт Шортандинская 2; г, д, е - регенеранты люцерны изменчивой, сорт Шортандинская 2**

## Выводы

Итак, изучены особенности каллусогенеза и морфогенеза отечественных сортов люцерны. Отмечена максимальная частота образования каллусной ткани у эксплантов сорта Шортандинская 2 (93,0%), при культивировании на варианте среды В5К II с 2,4-Д- 5,0 мг/л, кинетин-5,0 мг/л и НУК- 0,1 мг/л. По итогам проведенных исследований можно сделать вывод, что сорт Шортандинская 2 отличается от других сортов высоким потенциалом регенерационной способности.

Таким образом, отработанные протоколы по стерилизации семян, по индукции процесса каллусогенеза и определению морфогенной способности, а также выявлению эффективного способа регенерации побегов из семян сортов люцерны отечественной селекции можно использовать для успешных генетических исследований по расширению генетического базиса данного уникального растения.

**Финансирование.** Работа выполнена при грантовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан (номер гранта: AP09260362).

## Список литературы

1. Quiros C.F., Bauchan G.R. The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* comp. - Agronomy monographs, 2015.
2. Lesins K.A., Lesins I.L. Genus *Medicago* (*Leguminosae*): A Taxogenetic Study // - W. Junk. The Hague Netherlands, 1979.
3. Şakiroğlu D.İ. *Medicago sativa* species complex: Revisiting the century-old problem in the light of molecular tools // Crop Science. – 2020. – Vol. 61, № 5. – P. 827-838.
4. Bora K.S., Sharma A. Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: a review // Pharm Biol. – 2011. – Vol. 49, № 2. – P. 211-220.
5. Пикун П.Т. Люцерна и ее возможности. – Минск: Белорусская наука, 2012. – С. 314.
6. Saunders J.W., Bingham E.T. Production of Alfalfa Plants from Callus Tissue // Crop Science - 1972. – Vol. 12, № 6. – P. 804-808.
7. Строева Н.С., Дарханова В.Г. Получение растений-регенерантов *Medicago varia* индукцией каллусообразования листовых эксплантов в культуре *in vitro* // Наука и Образование. – 2017. – V. 1. – P. 110-113.
8. Gonzalez-Duran I.J.L. Morphological stage, chronological age, and accumulated temperatures as predictors of forage quality of field-grown alfalfa (*Medicago sativa* L.) / Cornell University, 1998.
9. Hindson S., McElroy A.R., Portelance C. Media and Genotype Effects on the Development and Conversion of Somatic Alfalfa (*Medicago Sativa* L.) Embryos. // *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, – 1998. – Vol. 34, № 3. – P. 181–84.
10. Wan Y., Sorensen E.L., Liang G.H. Genetic control of *in vitro* regeneration in alfalfa (*Medicago sativa* L.)// *Euphytica*. – 1998. – Vol. 39. – P. 3–9.
11. Sangra A., Shahin L., Dhir S. Long-Term Maintainable Somatic Embryogenesis System in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Using Leaf Explants: Embryogenic Sustainability Approach // *Plants*. – 2019. – Vol. 8. – P. 278-294.
12. Hawkins C., Yu L. Recent progress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) genomics and genomic selection // *The Crop Journal*. – 2018. – Vol. 6, №6. – P.565-575.
13. Ghotbi V., Dehghani H., Choucan R., Moeini A. Effects of different auxin solutions on rooting of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cuttings// *Iranian Journal of Filed Crop Science* – 2017. – Vol. 48, № 2. – P. 535-543.

14. Ticha M., Illesova P., Hrbackova M., Basheer J., Novak D., Hlavakova K., Samajova O., Niehaus K., Ovecká M., Samaj J. Tissue culture, genetic transformation, interaction with beneficial microbes, and modern bio-imaging techniques in alfalfa research. *Crit Rev Biotechnol.* – 2020. – Vol. 40, № 8. – P. 1265-1280.

15. Kadri A., Grenier D.G., Guerineau F., Cosson V., Ratet P. WUSCHEL Overexpression Promotes Callusogenesis and Somatic Embryogenesis in *Medicago truncatula Gaertn* // *Plants* (Basel) – 2021. – Vol. 10, № 4.

**А.К. Аргумбаева, А.О. Рахимжанова, А.К. Каканай, Ш.А. Манабаева**  
*ҚР БҒМ ҒК «Ұлттық биотехнология орталығы», Нұр-Сұлтан, Қазақстан*

### ***In vitro* жағдайында отандық селекциясының жоңышқа сорттарының соматикалық ұлпаларының морфогенезімен регенерациясының ерекшеліктері**

**Аңдатпа.** *In vitro* жағдайында отандық селекцияның жоңышқа сорттарының морфогенезі мен регенерация ерекшеліктері зерттелді, морфогенді каллус ұлпаларынан регенерант өсімдіктерін алу жағдайлары зерттелді. Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде 70% этанол және 10% натрий гипохлоридінің ерітіндісі сияқты стерильдеу агенттерін пайдалана отырып, жоңышқа тұқымын стерильдеу хаттамасы дайындалды, бұл *in vitro* жағдайында жұмыс жасау үшін 100% асептикалық өміршең өскіндерді алу үшін ең жақсы нәтиже берді. Тұқымжарнақ пен өсімдік сабағынан каллус индукциясы Гамборг В5 қоректік ортасында 2,4-дихлорфеноксисірке қышқылы (2,4-Д), кинетин 5,0 мг/л және нафтилсірке қышқылы (НУК) 0,1 мг/л концентрациясында байқалды. Морфогенді каллус индукциясы құрамында 6-бензиламинопурин (БАП) 0,2 мг/л концентрациясы бар Гамборг В5 қоректік ортасында қол жеткізілді. Өркендердің одан әрі құрамында Гамборг В5 дәрумендері қосылған және Гамборг В5 гормоны жоқ қоректік ортада, сондай-ақ 0,2 мг/л кинетин қосылған ортаның жартылай құрамында дамыды. Өзгермелі жоңышқаның каллус ұлпаларынан регенерант өсімдіктерін алудың оңтайланған әдісінің тиімді екендігі анықталды.

**Түйін сөздер:** жоңышқа, каллус культураны, фитогормондар, регенерант өсімдіктер.

**A.K. Argumbayeva, A.O. Rakhimzhanova, A.K. Kakanay, S.A. Manabayeva**  
*National center for biotechnology, Nur-Sultan, Kazakhstan*

### **Features of *in vitro* induced morphogenesis and plant regeneration from alfalfa domestic cultivars**

**Abstract.** The authors have studied Morphogenesis and regeneration features of domestic breeding cultivars of alfalfa and conditions for obtaining regenerant plants from the morphogenic callus tissues. As a result of the study, the efficient sterilization protocol of alfalfa seeds was established with the use of sterilizing agents as 70% ethanol and 10% sodium hypochlorite which resulted in the production of 100% aseptically viable seedlings for the further *in vitro* studies. Callus initiation from cotyledons and hypocotyls was implemented on a Gamborg B5 nutrient medium containing 2,4-dichlorophenoacetic acid (2,4-D), kinetin in a concentration of 5,0 mg/l, and naphthaleneacetic acid (NAA) of 0,1 mg/l. Induction of morphogenic callus was achieved on a Gamborg B5 medium with 0,2 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP). Further shoot initiation occurred on a hormone-free Gamborg B5 medium with the addition of Gamborg B5 vitamins, and on a half-strength medium with the addition of 0,2mg/l kinetin. It was found that established method of obtaining regenerated plants from the callus cultures of *Medicago Varia* proved itself effective.

**Key words:** alfalfa, callus culture, phytohormones, regenerated plants.

## References

1. Quiros C.F., Bauchan G.R. The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* comp. Agronomy monographs, 2015.
2. Lesins K.A., Lesins I.L. Genus *Medicago* (*Leguminosae*): A Taxogenetic Study. W. Junk. The Hague Netherlands, 1979.
3. Şakiroğlu D.İ. *Medicago sativa* species complex: Revisiting the century-old problem in the light of molecular tools, *Crop Science*, 61(5), 827-838 (2020).
4. Bora K.S., Sharma A. Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: a review, *Pharm Biol.*, 49(2), 211-220 (2011).
5. Pikun P.T. Lyucerna i ee vozmozhnosti [Lucerne and its possibilities]. (Minsk, Belorusskaya nauka, 2012, 314 p.). [in Russian]
6. Saunders J.W., Bingham E.T. Production of Alfalfa Plants from Callus Tissue, *Crop Science*, 12(6), 804-808 (1972).
7. Stroeveva N.S., Darhanova V.G. Poluchenie rastenij-regenerantov *Medicago varia* indukciej kallusoobrazovaniya listovyh eksplantov v kul'ture *in vitro*, *Nauka i Obrazovanie* [Obtaining regenerant plants *Medicago varia* by induction of callus formation of leaf explants in *in vitro* culture, *Science and Education*], 1, 110-113 (2017). [in Russian]
8. Gonzalez-Duran I.J.L. Morphological stage, chronological age, and accumulated temperatures as predictors of forage quality of field-grown alfalfa (*Medicago sativa* L.), Cornell University, 1998.
9. Hindson S., McElroy A.R., Portelance C. Media and Genotype Effects on the Development and Conversion of Somatic Alfalfa (*Medicago Sativa* L.) Embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 34(3), 181-84 (1998).
10. Wan Y., Sorensen E.L., Liang G.H. Genetic control of *in vitro* regeneration in alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Euphytica*, 39, 3-9 (1998).
11. Sangra A., Shahin L., Dhir S. Long-Term Maintainable Somatic Embryogenesis System in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Using Leaf Explants: Embryogenic Sustainability Approach, *Plants*, 8, 278-294 (2019).
12. Hawkins C., Yu L. Recent progress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) genomics and genomic selection, *The Crop Journal*, 6(6), 565-575 (2018).
13. Ghotbi V., Dehghani H., Choucan R., Moeini A. Effects of different auxin solutions on rooting of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cuttings, *Iranian Journal of Filed Crop Science*, 48(2), 535-543 (2017).
14. Ticha M., Illesova P., Hrbackova M., Basheer J., Novak D., Hlavakova K., Samajova O., Niehaus K., Oveckova M., Samaj J. Tissue culture, genetic transformation, interaction with beneficial microbes, and modern bio-imaging techniques in alfalfa research. *Crit Rev Biotechnol.*, 40(8), 1265-1280 (2020).
15. Kadri A., Grenier D.G., Guerineau F., Cosson V., Ratet P. WUSCHEL Overexpression Promotes Callogenesis and Somatic Embryogenesis in *Medicago truncatula* Gaertn, *Plants (Basel)*, 10(4), (2021).

**Сведения об авторах:**

*Аргумбаева А.К.* - младший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии растений, «Национальный центр биотехнологии», Нур-Султан, Казахстан.

*Рахимжанова А.О.* - научный сотрудник лаборатории генетической инженерии растений, «Национальный центр биотехнологии», Нур-Султан, Казахстан.

*Каканай А.К.* - младший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии растений, «Национальный центр биотехнологии», Нур-Султан, Казахстан.

*Манабаева Ш.А.* - кандидат биологических наук, заведующая лабораторией генетической инженерии растений, «Национальный центр биотехнологии», доцент кафедры общей биологии и геномики, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Нур-Султан, Казахстан.

*Argumbayeva A.K.* - Junior researcher of the Plant Genetic Engineering laboratory in the «National center for biotechnology», Nur-Sultan, Kazakhstan.

*Rakhimzhanova A.O.* - Researcher of the Plant Genetic Engineering laboratory in the «National center for biotechnology», Nur-Sultan, Kazakhstan.

*Kakanay A.K.* - Junior researcher of the Plant Genetic Engineering laboratory in the «National center for biotechnology», Nur-Sultan, Kazakhstan.

*Manabayeva S.A.* - Candidate of Biological Sciences, Head of the Plant Genetic Engineering laboratory in the National center for biotechnology, associate professor at the Department of General Biology and Genomics in the L.N. Gumilyov Eurasian National University, Nur-Sultan, Kazakhstan.