

КОЛЛЕКЦИИ МИРОВЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ ДЛЯ РАЗВИТИЯ ПРИОРИТЕТНЫХ НАПРАВЛЕНИЙ СЕЛЕКЦИИ

Научная статья

УДК 575.16222

DOI: 10.30901/2227-8834-2025-4-98-109



Разработка протоколов для введения зрелых семян риса (*Oryza sativa L. subsp. indica* и *subsp. japonica*) в асептические условия и получения каллусной культуры

Е. А. Нестерова¹, А. В. Поваляев², О. И. Романова¹, К. Н. Горбунова¹, Н. А. Швачко¹¹ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия² Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, РоссияАвтор, ответственный за переписку: Екатерина Артемовна Нестерова, ea.nesterova@vir.nw.ru

Актуальность. Рис (*Oryza sativa L.*) считается модельным однодольным растением, что делает его одной из наиболее изученных культур. Несмотря на это, генетики, селекционеры и биотехнологи сталкиваются с трудностями, такими как ранний некроз и слабое образование каллуса у сортов и линий *subsp. indica* S. Kato. В то время как у сортов риса подвида *japonica* S. Kato отмечена высокая способность к образованию каллуса (40%), у сортов и линий подвида *indica* ответ на индукцию каллусообразования составил 0%.

Материалы и методы. Объектом исследования послужили 40 образцов риса из коллекции ВИР (11 образцов относятся к подвиду *indica* и 29 – к подвиду *japonica*). Проращивание семян и получение каллусной массы проводили на питательных средах Chu (N6), Gamborg B₅ и MS. Для образования каллуса отбирали зрелые семена риса, очищенные от семенной оболочки, и в дальнейшем культивировали на питательных средах разного состава. Растительный материал поддерживали на светоустановках в режиме светового дня 16/8 ч при температуре 23–24°C и освещении 25 000 люкс.

Результаты. Отработан протокол стерилизации семян для дальнейшего введения в асептические условия *in vitro*. Все 40 образцов проросли в асептической культуре. Получена каллусная культура у образцов риса *subsp. indica* (41% каллусообразования) и *subsp. japonica* (38% каллусообразования). Разработаны протоколы сред для поддержания, пролиферации клеток каллусной массы и получения регенерантов.

Заключение. Разработаны и модифицированы протоколы для получения каллусной культуры из двух подвидов риса. Для образцов *subsp. indica* выбрана питательная среда Chu (N6) с добавлением 2 мг/л 2,4D и 0,5 г/л казеина. Наиболее подходящей средой для индукции каллусообразования образцов *subsp. japonica* выбрана среда 1/2MS с добавлением 0,2 г/л пролина, 0,4 мг/л кинетина и 0,8 мг/л 2,4D. При добавлении в питательную среду MS пролина (0,5 г/л) и гидролизата казеина (0,3 г/л) удалось инициировать начальную стадию регенерации побегов и корней.

Ключевые слова: рис, каллус, регенерация побегов и корней, протоколы *in vitro*

Благодарности: работа выполнена в рамках темы НИР № FGEM-2022-0007 «Выявление новых генетических маркеров селекционно значимых свойств и новых аллельных вариантов хозяйствственно ценных генов в генофонде культурных растений и их диких родичей при помощи геномных и постгеномных технологий».

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Нестерова Е.А., Поваляев А.В., Романова О.И., Горбунова К.Н., Швачко Н.А. Разработка протоколов для введения зрелых семян риса (*Oryza sativa L. subsp. indica* и *subsp. japonica*) в асептические условия и получения каллусной культуры. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2025;186(4):98-109. DOI: 10.30901/2227-8834-2025-4-98-109

COLLECTIONS OF THE WORLD'S CROP GENETIC RESOURCES FOR THE DEVELOPMENT OF PRIORITY PLANT BREEDING TRENDS

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2025-4-98-109

Development of protocols for introducing mature seeds of rice (*Oryza sativa* L. subsp. *indica* and subsp. *japonica*) into aseptic conditions and obtaining callus culture

Ekaterina A. Nesterova¹, Alexander V. Povalyaev², Olga I. Romanova¹, Ksenia N. Gorbunova¹, Nataliya A. Shvachko¹

¹ N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

² St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Ekaterina A. Nesterova, ea.nesterova@vir.nw.ru

Background. Rice (*Oryza sativa* L.) is considered a model monocotyledonous plant, which makes it one of the most studied crops. Despite this, geneticists, breeders, and biotechnologists face difficulties such as early necrosis and poor callus formation in subsp. *indica* cultivars and lines. While high callus formation ability (40%) was observed in subsp. *japonica* cultivars, the response to callus induction was 0% in cultivars and lines of subsp. *indica*.

Materials and methods. The studied material included 40 rice accessions from the VIR collection (11 accessions of subsp. *indica*, and 29 of subsp. *japonica*). Chu (N6), Gamborg B5 and MS nutrient media were used for seed germination and callus mass production. For callus formation, mature rice seeds cleaned of the seed coat were selected and then cultured on nutrient media with different compositions. The plant material was maintained on light installations in a 16/8 h daylight mode at a temperature of 23–24°C and 25,000 lux illumination.

Results. A protocol for sterilization of seeds for subsequent introduction into aseptic *in vitro* conditions was developed. Plants of all 40 rice accessions germinated in aseptic culture. Callus culture was obtained from plants of subsp. *indica* (41% of callus formation) and subsp. *japonica* (38%). Protocols for nutrient media were obtained to maintain and proliferate callus mass cells, and to produce regenerated plants.

Conclusion. Protocols for obtaining callus culture from two rice subspecies were developed and modified. The Chu (N6) nutrient medium supplemented with 2 mg/L of 2,4D and 0.5 g/L of casein was selected for subsp. *indica* accessions. The most suitable medium for inducing callus formation in subsp. *japonica* accessions was the $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with 0.2 g/L of proline, 0.4 mg/L of kinetin, and 0.8 mg/L of 2,4D. Addition of proline (0.5 g/L) and casein hydrolysate (0.3 g/L) to the MS nutrient medium helped to initiate the starting stage of shoot and root regeneration.

Keywords: rice, callus, shoot and root regeneration, *in vitro* protocols

Acknowledgements: the work was carried out within the framework of the research theme under VIR's Project № FGEM-2022-0007 "Identifying new genetic markers of significant traits for breeding and new allelic versions of agronomically important genes in the genetic diversity of cultivated plants and their wild relatives using genomic and postgenomic technologies". The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Nesterova E.A., Povalyaev A.V., Romanova O.I., Gorbunova K.N., Shvachko N.A. Development of protocols for introducing mature seeds of rice (*Oryza sativa* L. subsp. *indica* and subsp. *japonica*) into aseptic conditions and obtaining callus culture. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2025;186(4):98-109. (In Russ.). DOI:10.30901/2227-8834-2025-4-98-109

Введение

Рост численности населения приводит к увеличению спроса на продукты питания, что требует более глубокого и комплексного изучения сельскохозяйственных культур (Van den Berg, Walsh, 2023). Для преодоления продовольственного дефицита и снижения негативного воздействия человека на природу необходимо одновременно искать пути повышения урожайности и сохранения биологического разнообразия (Liao, Cao, 2024). Однако ограниченность пахотных земель и ухудшение состояния экосистем вследствие антропогенных факторов не позволяют расширять площади под посевы. Конец XX – начало XXI века ознаменовались большим прогрессом в генетике, селекции и биотехнологии: расшифровка геномов важных сельскохозяйственных культур, расширение спектра наследственной изменчивости посредством искусственного мутагенеза, повышение эффективности отбора за счет молекулярного маркирования, сокращение сроков создания сортов и гибридов (Young, Tanksley, 1989; Kilchevsky et al., 2008). Рис посевной (*Oryza sativa L.*) является не только важной продовольственной культурой, но и модельным растением при работе с представителями класса однодольных. Использование современных методов могло бы помочь увеличить объемы производства риса, не прибегая к увеличению посевых площадей. Исследование культуры в условиях *in vitro* играет огромную роль для биотехнологии, генетики и селекции и может быть использовано не только для изучения и улучшения существующих сортов, но и для создания новых высокопродуктивных растений, устойчивых к абиотическим и биотическим факторам среды (Tariq et al., 2008). Индукция каллусообразования является важным этапом в работах по генетической трансформации растений. Культивирование тканей двудольных растений проходит проще по сравнению с однодольными (Reinert, Bajaj, 1977; Do et al., 2024). Выбор состава сред для каждой культуры индивидуален, а при работе с рисом необходимо учитывать его подвид (*subsp. japonica* S. Kato и *subsp. indica* S. Kato), поскольку представители *subsp. indica* имеют низкий процент индукции образования каллуса и регенерации зеленых растений (Miah et al., 1985; Ali et al., 2021; Mayakaduwa, Silva, 2023). Целью данного исследования было определение наиболее подходящих методов стерилизации семян риса, состава сред и концентраций регуляторов роста для введения культуры в условия *in vitro*, индукции каллусообразования, поддержания и развития каллусной культуры и получения растений-регенерантов.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на 40 образцах риса коллекции ВИР (*subsp. japonica* и *subsp. indica*) (табл. 1). Семена предоставлены О. И. Романовой, и. о. зав. отдела генетических ресурсов крупяных культур Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), и К. Н. Горбуновой, куратором коллекции риса ВИР.

Рис – микробиотик, быстро теряющий всхожесть. Образцы хранятся в контролируемых условиях, на оперативном хранении (0Х) при отрицательной температуре -10°C. Перед закладкой у семян проверяется всхожесть (см. табл. 1). Всхожесть определяется процентом проросших семян. Отбирают 100 здоровых семян и заме-

ряют, сколько из них дали всходы. Данные приведены в таблице 1.

Важно обеспечить низкую влажность семян перед закладкой на хранение. Избыточная влага может привести к образованию микротрещин при замораживании и последующей потере всхожести. Семена перед закладкой сушат в холода два – три месяца. При влажности от трех до семи процентов семена закладываются в пакеты из фольги под вакуумом.

С целью введения в асептические условия составлены протоколы стерилизации семян и в дальнейшем выбран наилучший метод стерилизации. В таблице 2 приведены протоколы, апробированные в ходе работы. Стерилизующим агентом выбрали раствор белизны («Белизна» от ООО «ПЭТ-ФОРМ»), содержащий 15% гипохлорита натрия. Для шести вариантов стерилизации разбавление раствора белизны проводили следующим образом: варианты первый и четвертый – 10 мл раствора белизны / 90 мл дистиллированной воды; варианты второй и пятый – 30 мл раствора белизны / 70 мл дистиллированной воды; варианты третий и шестой – 50 мл раствора белизны / 50 мл дистиллированной воды. В работе по вариантам стерилизации использовали неочищенные семена, а также семена, у которых удаляли семенную оболочку. В каждом варианте использовали по 10 штук семян.

После стерилизации семена проращивали на питательной среде Мурасиге и Скуга (MS) от компании Sigma-Aldrich (США) с половинной концентрацией макро-, микроэлементов и витаминов (Murashige, Skoog, 1962).

Через 10 суток оценивали процент полученных здоровых, визуально не инфицированных семян. Листья, корни и междуузлия пересаживали на среды для индукции каллусообразования.

В ходе исследования апробированы 15 составов сред для индукции каллусообразования. Для дальнейшего культивирования эксплантов с целью образования на них каллуса в качестве основы использовались следующие питательные среды: MS (Murashige, Skoog, 1962) (Sigma-Aldrich, США), Gamborg (B5) (Gamborg, Eveleigh, 1968) (Duchefa Biochemie, Нидерланды) и Chu (N6) (Chu, 1978) (Duchefa Biochemie, Нидерланды). В состав сред Chu (N6) и Gamborg (B5) не входили витамины.

Для инициации каллусообразования составлено и апробировано 15 питательных сред (табл. 3). Состав сред выбирали, используя источники: Tariq et al., 2008; Majumder et al., 2021; Rojas-Vásquez et al., 2024.

В качестве эксплантов для индукции каллусообразования использовали листья, междуузлия, корни и зрелые семена риса. Подсчитывали процент эксплантов, образовавших каллус, от числа высаженных эксплантов. Каллусы пересаживали раз в месяц на свежие питательные среды с целью дальнейшего развития и поддержания.

Для индукции органогенеза каллусные клетки пересаживали на среды для получения растений-регенерантов. Пересадка каллуса происходила после месяца субкультивирования на питательной среде. Питательные среды для органогенеза не содержали фитогормоны, в качестве дополнительного источника азота добавляли пролин и гидролизат казеина. Состав сред представлен в таблице 4.

Доводили pH сред до 5,8. Экспланты на средах помещались в условия длинного светового дня 16/8 ч при освещении 25 000 люкс.

Таблица 1. Список образцов риса, использованных в исследовании

Table 1. Rice accessions used in the study

Подвид (subsp.)	Номер по каталогу ВИР	Сорт, линия	Год репродукции	Всхожесть (%)
<i>japonica</i>	19	'Арпа-Шалы'	2022	98
	395	Без названия	2018	95
	415	Без названия	2015	85
	482	'Ольбе' (оливковый бархат)	2018	98
	495	Без названия	2018	97
	558	'Хоккайдо'	2007	92
	577	Без названия	2018	100
	580	'Чалтык'	2018	99
	611	Без названия	2018	99
	656	Без названия	2014	96
	1537	Местный, без названия	2022	96
	1610	Без названия	2022	96
	1620	'Амбарбу (Амбарду)'	2022	96
	1755	'Шестрест'	2022	96
	1795	'Ми'	2022	95
	1962	Местный, без названия	2022	98
	3352	Местный, без названия	2022	91
	3733	'ВРОС Крупнозерный 384/43'	2022	87
	3773	'Дальневосточный 5'	2022	85
	3799	'Нативе Сировасики'	2022	91
	3851	'Паллаги 77'	2022	90
	3958	'Эритроцерос 12280'	2022	99
	4156	'Клейкий'	2022	95
	4611	'Хаяминори'	2022	83
	5030	'Сиэбаэ Бидаун (Риз дэ монтейн)'	2022	100
	5050	'№ 66'	2022	86
	5097	Без названия	2022	100
	7407	'Чендейне'	2022	99
	9079	'Новатор-стандарт'	2005	98
<i>indica</i>	3268	'Садри'	2022	97
	3647	'Чалтык'	2022	91
	3999	'Чжэ-чан 505'	2022	87
	5349	'Анзеатико 187/65'	2022	98
	5425	'Басмати 6542'	2022	95
	6249	'ОТП-2'	2022	87
	6618	'ИР 485-2-19-1'	2022	95
	7655	'PHP 7306'	2022	98
	9446	'Ассоль'	2019	100
	9447	'Аврора'	2019	90
	9451	'Мулатка'	2019	96

Таблица 2. Протоколы стерилизации для введения семян риса в условиях *in vitro***Table 2. Sterilization protocols for the *in vitro* introduction of rice seeds**

Варианты	1	2	3	4	5	6
	Неочищенные семена			Очищенные семена		
Предварительная промывка в мыльном растворе	10 мин	10 мин	-	-	-	-
Время стерилизации, концентрация гипохлорита натрия	20 мин, 1,5%	30 мин, 4,5%	40 мин, 7,5%	два раза по 20 мин 1,5%	два раза по 20 мин 4,5%	два раза по 20 мин 7,5%
Добавление Tween20* (1-2 капли)	-	-	+	+	+	+
70-процентный этиловый спирт (C_2H_5OH)	-	-	1 мин	1 мин	1 мин	1 мин
3-процентная перекись водорода (H_2O_2)	1 мин	1 мин	3 мин	1 мин	1 мин	1 мин

Примечание: * – Tween20 (полисорбат 20) – неионогенное поверхностно-активное вещество

Note: * – Tween20 (polysorbate 20) is a non-ionic surfactant

Таблица 3. Состав сред для индукции каллусообразования *in vitro***Table 3. Composition of media for the *in vitro* induction of callus formation**

Питательная среда	Дополнения к основному составу питательных сред				
	A1	A2	A3	A4	A5
MS; Сахароза – 30 г/л	Пролин – 0.224 г/л 2,4D – 0.8 мг/л НУК – 5.0 мг/л	Пролин – 0.224 г/л 2,4D – 1.0 мг/л НУК – 8.0 мг/л	2,4D – 0.5 мг/л НУК – 2.0 мг/л	2,4D – 1.0 мг/л НУК – 5.0 мг/л	2,4D – 1.0 мг/л НУК – 8.0 мг/л
Chu (№6); Сахароза – 30 г/л	C1 НУК – 1.0 мг/л БАП – 2.5 мг/л	C2 2,4D – 2.5 мг/л	C3 2,4D – 3.0 мг/л Казеин – 0.5 г/л БАП – 1.5 мг/л	C4 2,4D – 1.5 мг/л Пролин – 0.224 г/л	C5 2,4D – 2 мг/л Казеин – 0.5 г/л
Gamborg B5; Сахароза – 30 г/л Пролин – 0.5 г/л Казеин – 0.5 г/л	G1 Кинетин – 1.0 мг/л 2,4D – 2.5 мг/л	G2 Кинетин – 1.0 мг/л 2,4D – 3.0 мг/л	G3 2,4D – 3.5 мг/л	G4 2,4D – 4 мг/л	
½MS; Сахароза – 30 г/л	M1 Пролин – 0.224 г/л Кинетин – 0.4 мг/л 2,4D – 0.8 мг/л				

Примечание: 2, 4D – 2,4-дихлорфеноксиусная кислота; НУК – 1-нафтилусная кислота; БАП – 6-бензиламинопурин

Note: 2, 4D – 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; НУК – 1-naphthylacetic acid; БАП – 6-benzylaminopurine

Таблица 4. Состав сред для поддержания, размножения каллуса и регенерации побегов *in vitro***Table 4. Composition of media for *in vitro* callus maintenance and reproduction, and for regeneration of shoots**

Питательные среды	Варианты протоколов	
	1. Среда для поддержания и размножения каллуса	2. Среда для регенерации побегов
A. Gamborg B ₅		
Б. MS	Сахароза – 30 г/л Пролин – 0.5 г/л	Сахароза – 30 г/л Пролин – 0.5 г/л Гидролизат казеина – 0.3 г/л
В. Chu (N6)		

После приготовления матричного раствора и установления pH добавляли 5 г/л агара и кипятили до однородности.

Результаты и обсуждение

Результатом эксперимента стали разработка протоколов по стерилизации семян риса, выявление оптимального состава питательных сред для индукции каллусообразования и дальнейшего поддержания и регенерации каллусов *in vitro*.

1. Определение всхожести семян риса *subsp. indica* и *subsp. japonica*. Согласно данным, полученным в отделе генетических ресурсов крупяных культур ВИР, всхожесть образцов составляет 80–100%.

2. Методы стерилизации семян. Семенная оболочка риса имеет ребристую поверхность, труднодоступную для проникновения дезинфицирующих агентов. Предварительная очистка семян от семенной оболочки дала положительные результаты (рис. 1). Согласно источникам, в протокол по стерилизации семян риса может входить очистка от семенной оболочки (Wani et al., 2011; Khanda-gale et al., 2020; Rojas-Vásquez et al., 2024). Таким образом, наши данные подтверждают результаты методов, описанных в статьях.

После очищения семян от семенной оболочки стерилизация прошла успешно. Результаты сравнения эффективности протоколов стерилизации, в зависимости от наличия семенной оболочки и концентрации стерилизующего агента, представлены в таблице 5. В таблице приведены условия стерилизации и методы обработки семян. В ячейках представлен процент здоровых семян без бактериальных и грибковых заражений.

Выбрали наиболее щадящий, но эффективный процент стерилизующего агента гипохлорита натрия – 4.5%. Это повышает всхожесть в сравнении с жестким методом с концентрацией гипохлорита натрия до 7.5%, и в то же время процент здоровых семян без заражений составил 90–100%.

Для введения семян риса в культуру *in vitro* использовали следующий протокол стерилизации:

2.1. Очистить зерна риса от семенной оболочки с помощью ступки и пестика.

2.2. Очищенный материал поместить в колбы с раствором гипохлорита натрия (4.5%) с добавлением нескольких капель Tween20 и выдержать в шейкере 20 мин при 220 об/мин.

2.3. Слить стерилизующий раствор и промыть семена дистиллированной водой.



Рис. 1. Проростки стерилизованных семян риса, очищенных от семенной оболочки, на среде 1/2MS в условиях *in vitro*

Fig. 1. Plantlets regenerated from sterilized rice seeds peeled from the seed coat on the 1/2MS medium under *in vitro* conditions

Таблица 5. Результаты введения образцов риса в асептические условия
Table 5. Results of introducing rice accessions into aseptic conditions

Процент гипохлорита натрия в растворе	Обработка семян			
	Неочищенные семена	Неочищенные семена с обработкой спиртом 70% и перекисью перед введением	Очищенные семена	Очищенные семена с обработкой спиртом 70% и перекисью перед введением
1.5%	0	0	65%	70%
4.5%	10%	12%	94%	95%
7.5%	15%	15%	98%	97%

2.4. Слить дистиллированную воду, повторно залить семена стерилизующим раствором и поместить в шейкер на 20 мин при 220 об/мин.

Дальнейшие этапы очистки проводить в ламинарном боксе.

2.5. Зерна риса промыть в стерильной дистиллированной воде 5 раз по 3 мин и оставить в последней порции автоклавированной воды на 1–2 ч.

2.6. Стерилизованный материал дополнительно обработать 70-процентным раствором этанола в течение 1 мин, далее промыть 3-процентным раствором перекиси водорода в течение 1 мин.

Следуя данному протоколу, в условия *in vitro* успешно ввели 40 образцов риса *subsp. indica* и *subsp. japonica*. Протокол составлялся с опорой на источник (Rojas-Vásquez et al., 2024), с модификацией пунктов 1, 2, и 6.

3. Следующим этапом работы стала отработка протокола по составу сред для индукции каллусообразования. Согласно литературным данным, в качестве среды для введения и индукции каллусогенеза риса из зрелых семян и пыльников в условиях *in vitro* часто используется среда MS (Wani et al., 2011; Rojas-Vásquez et al., 2024).

Также есть источники, утверждающие, что более подходящей средой для индукции каллусообразования является Chu (N6) (Raval, Chattoo, 1993; Tariq et al., 2008; Sakina et al., 2020). Другой сложностью для риса является то, что образцы посевного риса подвида *japonica* демонстрируют более высокую способность к росту каллусов, чем образцы риса подвида *indica* (Mikami, Kinoshita, 1988). С данной проблемой мы столкнулись и в наших исследованиях. Первые попытки инициации каллусообразования проводились нами на листьях молодых растений, выращенных в асептических условиях на среде $\frac{1}{2}$ MS. Однако у листьев быстро начинался некроз, и они погибали. Также предпринимали попытки инициировать каллусообразование из междуузлий и корней. При этом процент образования каллуса был очень низким. Наибольший процент индукции каллуса показали семена (табл. 6). В дальнейшей работе в качестве эксплантов использовали зрелые семена риса (рис. 2–5).

Некоторые семена инициировали каллусообразование в течение длительного периода времени: (полтора – два месяца). Каллус образовывался из проросшего семени на среде для каллусогенеза.

Таблица 6. Процент каллусообразования в зависимости от типа экспланта

Table 6. Percentage of callus formation depending on the type of the explant

Тип экспланта	N ₁	N ₂	C
Листья	20	0	0%
Междоузлия	20	0	0%
Корни	20	2	1%
Зрелые семена	20	11	55%

Примечание: N₁ – количество эксплантов, высаженных на среду; N₂ – количество эксплантов, образовавших каллус; C – общий процент каллусообразования

Note: N₁ – the number of explants planted on the medium; N₂ – the number of explants that formed a callus; C – the total percentage of callus formation

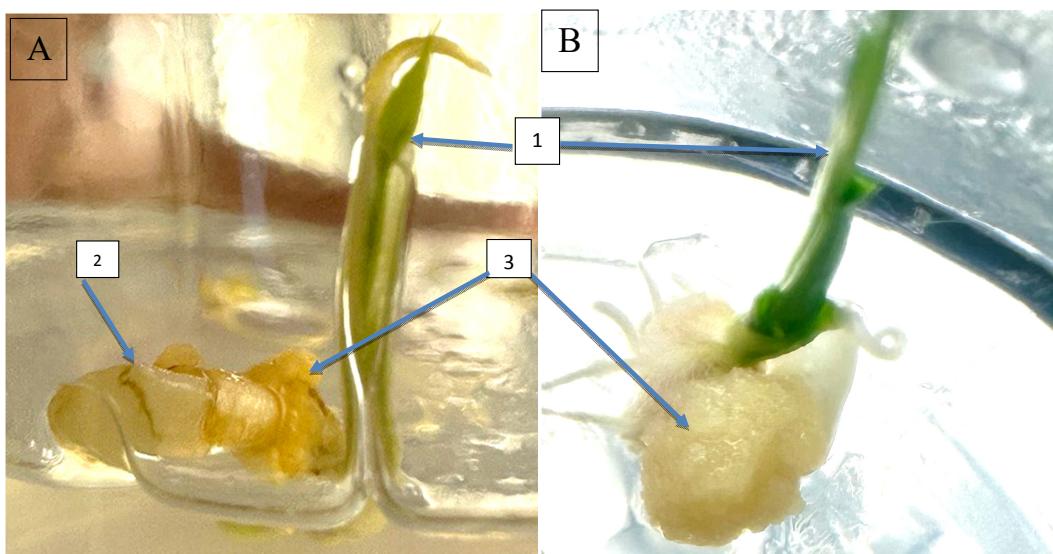


Рис. 2. Каллус, образовавшийся из семян *Oryza sativa* L.:

A – *subsp. japonica* (к-1610) на 20-й день культивирования, среда M1; **B** – *subsp. indica* (к-3647) на 20-й день культивирования, среда C5 (1 – проросший побег, 2 – семя риса, 3 – каллусная масса)

Fig 2. The callus formed from the seeds of *Oryza sativa* L.:

A – *subsp. japonica* (k-1610) on the 20th day of cultivation, M1 medium; **B** – *subsp. indica* (k-3647) on the 20th day of cultivation, C5 medium (1 – sprouted shoot, 2 – rice seed, and 3 – callus mass)

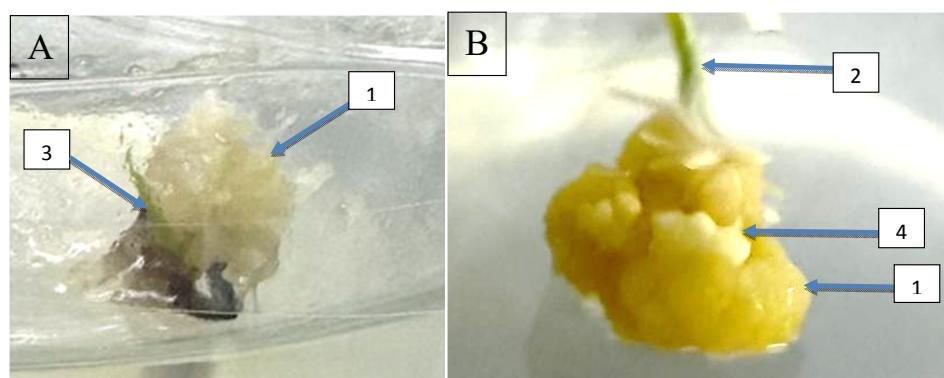


Рис. 3. Каллус, образовавшийся из семян *Oryza sativa L.* на среде M1:

A – subsp. *japonica* (к-1755) на 50-й день культивирования; **B** – subsp. *indica* (к-9451) на 26-й день культивирования
(1 – каллусная масса, 2 – проросший побег, 3 – зачаточный лист, 4 – новообразующиеся клетки каллуса)

Fig. 3. The callus formed from the seeds of *Oryza sativa L.* on the M1 medium:

A – subsp. *japonica* (к-1755) on the 50th day of cultivation; **B** – subsp. *indica* (к-9451) on the 26th day of cultivation
(1 – callus mass, 2 – sprouted shoot, 3 – rudimentary leaf, and 4 – newly formed callus cells)

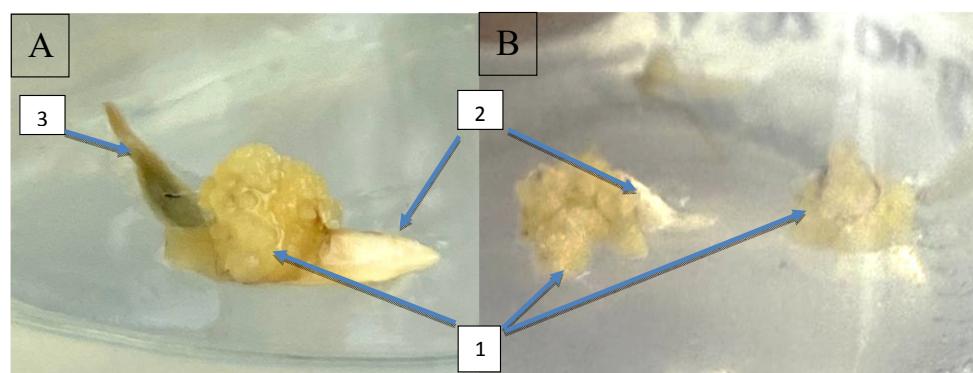


Рис. 4. Каллус, образовавшийся из семян *Oryza sativa L.* subsp. *indica*:

A – образец к-3268 на 10-й день культивирования на среде А1; **B** – образец к-5425 на 5-ю неделю культивирования на среде С2 (1 – каллусная масса, 2 – семена риса, 3 – зачаточный лист)

Fig. 4. The callus formed from the seeds of *Oryza sativa L.* subsp. *indica*:

A – accession k-3268 on the 10th day of cultivation on the A1 medium; **B** – accession k-5425 on the 5th week of cultivation on the C2 medium (1 – callus mass, 2 – rice seeds, and 3 – rudimentary leaf)

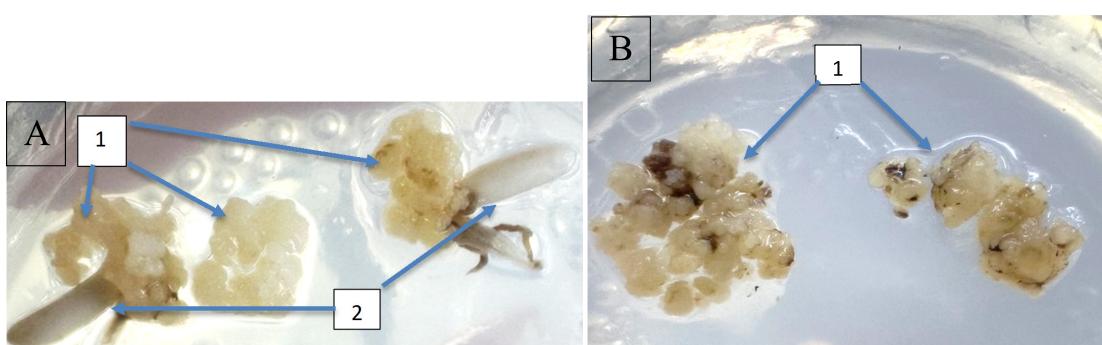


Рис. 5. Каллус, образовавшийся из семян *Oryza sativa L.* subsp. *indica*:

A – образец к-5425 на 6-ю неделю культивирования на среде С2; **B** – образец к-3268 на среде С3
(1 – каллусная масса, 2 – семена риса)

Fig. 5. The callus formed from the seeds of *Oryza sativa L.* subsp. *indica*:

A – accession k-5425 on the 6th week of cultivation on the C2 medium; **B** – accession k-3268 on the C3 medium with further transplantation on the MS medium with added proline and casein (1 – callus mass, and 2 – rice seeds)

Некоторые образцы *subsp. indica* образовывали слишком мало каллусной массы для дальнейшего культивирования и регенерации и очень быстро погибали на средах для индукции каллусообразования. Образцы были пересажены на среду для регенерации растений из каллуса (среда Б.2, см. табл. 5), что благотворно повлияло на каллусную массу (см. рис. 6). В данном случае казеин выступил в качестве дополнительного источника азота и помог клеткам каллуса выжить и пролиферировать.

Различные образцы образовывали каллусную массу в разные сроки и с разной скоростью, что может быть напрямую связано с особенностями генотипа, как было показано в исследовании Z. Zhang et al. (2019). Это необ-

ходимо учитывать при анализе сроков каллусообразования (табл. 7).

Таким образом, с применением составленных протоколов получен каллус у 21 образца риса. В таблице представлены образцы, у которых удалось получить каллус.

Согласно данным, приведенным в таблице 7, из 15 сред наиболее эффективными оказались А1, М1, С2 и С5. Влияние состава сред на процент семян, давших каллусную массу у риса *subsp. japonica* и *subsp. indica*, указано в таблице 8.

Согласно статистическим данным, представленным в таблице 8, наиболее благоприятной средой для индукции каллусообразования *subsp. indica* является Chu (N6)

Таблица 7. Образцы риса, индуцирующие каллус на питательных средах разного состава

Table 7. Rice accessions inducing a callus on nutrient media with different compositions

Подвид (subsp.)	Номер по каталогу ВИР	Тип экспланта	N ₂ /N ₁	S	Среда	Период начала образования каллуса (дни)	Тип и цвет каллуса
<i>japonica</i>	0558	Семена	5/9	3	M1	20–30	Плотный, желтый
	1610	Семена	2/10	3	M1	20	Плотный, бежевый/зеленый
	1620	Семена	3/9	3	C2	30	Плотный, белый/зеленый
	1620	Корни	2/8	3	G4	50	Рыхлый, белый/зеленый
	1755	Семена	4/10	3	M1	50	Плотный, белый
	1795	Семена	5/11	3	M1	42	Рыхлый, бежевый
	1962	Семена	1/9	3	A4	50	Рыхлый, бежевый
	3352	Семена	5/10	3	A1	42	Плотный, бежевый
	3733	Семена	3/8	3	A2	40	Плотный, белый
	3773	Семена	6/10	3	A1	42	Плотный, белый
	3799	Семена	4/9	3	A2	25	Рыхлый, оранжевый
	5030	Семена	4/10	2	C4	12	Плотный, бежевый/зеленый
<i>indica</i>	5097	Семена	6/9	2	C5	10	Плотный, бежевый
	9079	Корни	2/7	2	M1	20–30	Рыхлый, белый/зеленый
	3268	Семена	5/10	3	A1	10–20	Плотный, желтый/бежевый
	3268	Семена	4/10	3	C3	20–30	Плотный, желтый/бежевый
	3647	Семена	6/10	2	C5	11	Плотный, белый
	5425	Семена	6/9	3	C2	25–40	Рыхлый, бежевый
	5425	Семена	7/10	2	C5	25–40	Плотный, бежевый
	6618	Семена	6/9	2	C5	20–30	Плотный, бежевый
	7655	Семена	4/10	2	A1	20–30	Плотный, белый/зеленый
	9446	Семена	3/11	3	A1	20–30	Плотный, бежевый
	9447	Семена	5/10	2	C2	28	Плотный, желтый/зеленый
	9451	Семена	6/10	3	M1	26	Плотный, желтый

Примечание: N₁ – количество эксплантов, высаженных на среду; N₂ – количество эксплантов, образовавших каллус; S – количество субкультивирований; жирным шрифтом выделены образцы, у которых началась регенерация побегов и корней

Note: N₁ – the number of explants planted on the medium; N₂ – the number of explants that formed a callus; S – the number of subcultures; boldfaced are the accessions in which regeneration of shoots and roots has begun

Таблица 8. Процент индукции каллусообразования из зрелых семян на разных средах
Table 8. Percentage of the induction of callus formation from mature seeds on different media

Среда	N ₁		N ₂		N ₃		С	
	japonica	indica	japonica	indica	japonica	indica	japonica	indica
A1	47	46	11	12	45	46	23%	26%
M1	48	49	18	6	47	45	38%	12%
C2	48	50	3	11	46	48	6%	22%
C5	45	46	6	19	43	45	13%	41%

Примечание: N₁ – количество эксплантов, высаженных на среду; N₂ – количество эксплантов, образовавших каллус; N₃ – количество неинфицированных эксплантов

Note: N₁ – the number of explants planted on the medium; N₂ – the number of explants that formed a callus; N₃ – the number of uninfected explants; C – the total percentage of callus formation

с добавлением 2 мг/л 2,4D и 0,5 г/л казеина. Для subsp. *japonica* наиболее предпочтительной средой оказалась ½MS с добавлением 0,2 г/л пролина, 0,4 мг/л кинетина и 0,8 мг/л 2,4D. Для изучения генотипических влияний каждого образца необходимы дальнейшие исследования. На данный момент из 29 образцов subsp. *japonica* жизнеспособный каллус удалось получить у 13 образцов. Важнейшим результатом можно считать получение каллуса у восьми из одиннадцати образцов subsp. *indica*. Однако уже сейчас можно сказать, что самый высокий процент каллусообразования показали образцы к-3773, к-5097 (оба – subsp. *japonica*), к-3647, к-5425, к-6618, к-9451 (все четыре – subsp. *indica*) (см. табл. 7).

Для поддержания и культивирования каллуса использовали еще один протокол питательной среды (см. табл. 5). На среде Б.2 (MS с добавлением 0,5 г/л пролина и 0,3 г/л казеина) наилучшую жизнеспособность и последующий рост каллуса показал образец к-3268 (см. рис. 6).

Каллусы, образовавшиеся из семян образцов к-558, к-9451 и к-5097, показали высокую способность к регенерации на средах с добавлением пролина и казеина

(рис. 6).

У образцов к-558 и к-5097 появились первые регенерирующие корни и побеги. В дальнейшем планируется продолжать работу над культивированием каллуса и регенерацией растений из каллуса. По результатам работы будут выбраны оптимальные среды для получения каллусной массы и регенерации растений. Планируется серия субкультивирований для выявления наилучших условий для каллусогенеза и размножения. Происходит подбор сред для индукции органогенеза, а также продолжается работа с имеющимися образцами, увеличивается выборка.

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования разработан протокол стерилизации семян для введения в асептические условия. Для индукции каллусообразования в качестве эксплантов были выбраны зрелые семена риса, что при дальнейшей оценке показало выход

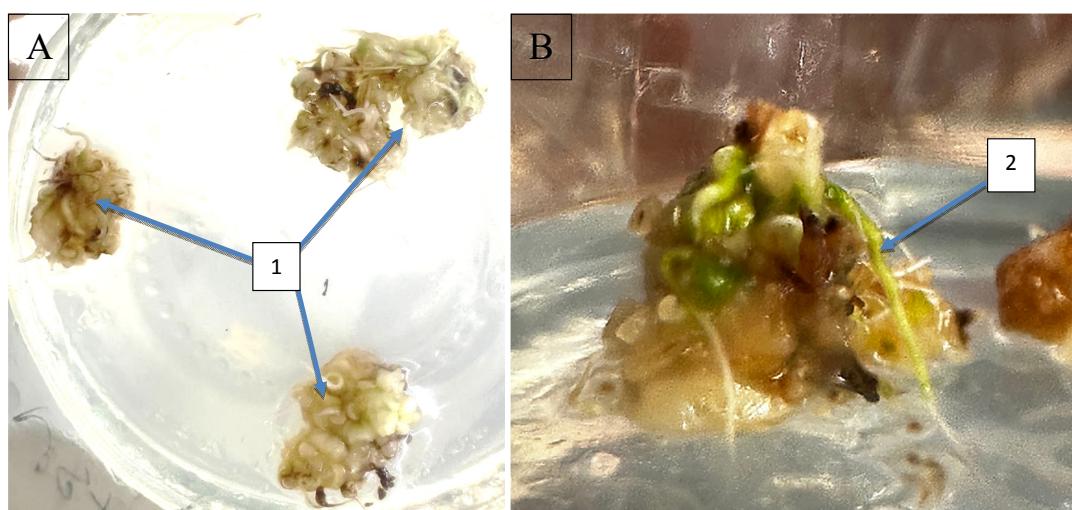


Рис. 6. Регенерирующий каллус, образовавшийся из семян *Oryza sativa* L. на средах MS с добавлением пролина и казеина: А – образец к-558, 5-я неделя культивирования; В – образец к-5097, 6-я неделя культивирования (1 – регенерирующие корни, 2 – побег на начальной стадии регенерации)

Fig. 6. The regenerating callus formed from *Oryza sativa* L. seeds on MS media with added proline and casein: A – accession k-558 on the 5th week of cultivation; B – accession k-5097 on the 6th week of cultivation (1 – regenerating roots, and 2 – shoot at the initial stage of regeneration)

более крупной и менее рыхлой каллусной массы, чем при использовании листьев, междуузлий и корней. По влиянию питательных сред на каллусогенез выявлены различия в образовании каллуса у *subsp. indica* и *subsp. japonica*, разработаны протоколы для индукции каллусообразования, дальнейшего поддержания и пролиферации клеток каллусной массы для риса *subsp. indica* и *subsp. japonica*. Показано влияние казеина на пролиферацию клеток каллуса и регенерацию побегов из каллусной массы.

Протоколы, составленные в данном исследовании, будут полезны в дальнейших работах по селекции риса и получению новых сортов с заданными свойствами с применением методов биотехнологии, в частности для работ по геномному редактированию данной культуры.

References / Литература

Ali J., Nicolas K.L.C., Akther S., Torabi A., Ebadi A.A., Marfori-Nazarea C.M. et al. Improved anther culture media for enhanced callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). *Plants (Basel)*. 2021;10(5):839. DOI: 10.3390/plants10050839

Chu C.C. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture, 25–30 May 1978*. Peking: Science Press; 1978. p.43–50.

Do V.G., Kim S., Win N.M., Kwon S.I., Kweon H., Yang S. et al. Efficient regeneration of transgenic rice from embryogenic callus via *Agrobacterium*-mediated transformation: a case study using *GFP* and apple *MdFT1* genes. *Plants (Basel)*. 2024;13(19):2803. DOI: 10.3390/plants13192803

Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Canadian Journal of Biochemistry*. 1968;46(5):417-421. DOI: 10.1139/o68-063

Khandagale K.S., Chavhan R., Nadaf A.B. RNAi-mediated down regulation of *BADH2* gene for expression of 2-acetyl-1-pyrroline in non-scented *indica* rice IR-64 (*Oryza sativa* L.). *3 Biotech*. 2020;10(4):145. DOI: 10.1007/s13205-020-2131-8

Kilchevsky A.V., Leshchina N.Y., Pugacheva I.G. Results of tomato breeding for cold resistance and productivity using gametophytic-sporophytic selection. *Vegetable Growing*. 2008;14:166-175. [in Russian] (Кильчевский А.В., Лещина Н.Ю., Пугачева И.Г. Результаты селекции томата на холодостойкость и продуктивность с использованием гаметофитно-спорофитного отбора. *Овощеводство*. 2008;14:166-175).

Liao W., Cao L. Conservation and evolution of wildlife in the context of climate change and human population growth. *Biology (Basel)*. 2024;13(6):440. DOI: 10.3390/biology13060440

Majumder S., Datta K., Datta S.K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of rice by *hygromycin phosphotransferase (hptII)* gene containing CRISPR/Cas9 vector. *Methods in Molecular Biology*. 2021;2238:69-79. DOI: 10.1007/978-1-0716-1068-8_5

Mayakaduwa R., Silva T. Haploid induction in *indica* rice: exploring new opportunities. *Plants (Basel)*. 2023;12(17):3118. DOI: 10.3390/plants12173118

Miah M.A.A., Earle E.D., Khush G.S. Inheritance of callus formation ability in anther cultures of rice, *Oryza sativa* L. *Theoretical and Applied Genetics*. 1985;70(2):113-116. DOI: 10.1007/BF00275308

Mikami T., Kinoshita T. Genotypic effects on the callus formation from different explants of rice, *Oryza sativa* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1988;12(3):311-314. DOI: 10.1007/BF00034374

Murashige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Raval M., Chattoo B.B. Role of media constituents and proline in callus growth, somatic embryogenesis and regeneration of *Oryza sativa* cv *Indica*. *Indian Journal of Experimental Biology*. 1993;31(7):600-603.

Reinert J., Bajaj Y.P.S. (eds). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Berlin; Heidelberg; New York: Springer; 1977.

Rojas-Vásquez R., Hernández-Soto A., Arrieta-Espinoza G., Gatica-Arias A. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *indica* rice (*Oryza sativa* L. *subsp. indica* var. CR-5272). *Methods in Molecular Biology*. 2024;2788:257-271. DOI: 10.1007/978-1-0716-3782-1_15

Sakina A., Mir S., Naeem S., Zargar S.M., Nehvi F.A., Rather Z.A. et al. Improved protocol for efficacious *in vitro* androgenesis and development of doubled haploids in temperate *japonica* rice. *PLoS One*. 2020;15(11):e0241292. DOI: 10.1371/journal.pone.0241292

Tariq M., Ali G., Hadi F., Ahmad S., Ali N., Shah A.A. Callus induction and *in vitro* plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) under various conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2008;11(2):255-259. DOI: 10.3923/pjbs.2008.255.259

Van den Berg L., Walsh C.M. Household food insecurity in South Africa from 1999 to 2021: a metrics perspective. *Public Health Nutrition*. 2023;26(11):2183-2199. DOI: 10.1017/S1368980023001878

Wani S.H., Sanghera G.S., Gosal S.S. An efficient and reproducible method for regeneration of whole plants from mature seeds of a high yielding *Indica* rice (*Oryza sativa* L.) variety PAU 201. *New Biotechnology*. 2011;28(4):418-422. DOI:10.1016/j.nbt.2011.02.006

Young N.D., Tanksley S.D. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*. 1989;77(1):95-101. DOI: 10.1007/BF00292322

Zhang Z., Zhao H., Li W., Wu J., Zhou Z., Zhou F. et al. Genome-wide association study of callus induction variation to explore the callus formation mechanism of rice. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2019;61(11):1134-1150. DOI: 10.1111/jipb.12759

Информация об авторах

Екатерина Артемовна Нестерова, и. о. младшего научного сотрудника, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, ea.nesterova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0009-0006-7806-4647>

Александр Вячеславович Поваляев, студент, Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 196084 Россия, Санкт-Петербург, ул. Черниговская, 5, sascha.povaliaeff@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0005-8099-1274>

Ольга Ивановна Романова, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, и. о. заведующего отдела, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, o.romanova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3509-4655>

Ксения Николаевна Горбунова, специалист, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, k.gorbunova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0009-0002-0930-3481>

Наталья Альбертовна Швачко, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, и. о. заведующего лабораторией, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, n.shvachko@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1958-5008>

Information about the authors

Ekaterina A. Nesterova, Acting Associate Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, ea.nesterova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0009-0006-7806-4647>

Alexander V. Povalyaev, Student, St. Petersburg State University of Veterinary Medicine, 5 Chernigovskaya Street, St. Petersburg 196084, Russia, sascha.povaliaeff@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0005-8099-1274>

Olga I. Romanova, Cand. Sci. (Agriculture), Leading Researcher, Acting Head of a Department, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, o.romanova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3509-4655>

Ksenia N. Gorbunova, Specialist, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, k.gorbunova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0009-0002-0930-3481>

Nataliya A. Shvachko, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Acting Head of a Laboratory, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, n.shvachko@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1958-5008>

Вклад авторов: Нестерова Е. А. – обработка данных; формальный анализ; исследования; подготовка первоначального проекта, написание и обзор. Пovalяев А. В. – исследования. Романова О. Р. – ресурсы. Горбунова К. Н. – обработка данных; ресурсы; подготовка первоначального проекта и написание. Швачко Н. А. – концептуализация; проверка; редактирование.

Contribution of the authors: Nesterova E. A. – data processing; formal analysis; investigation; original draft preparation, writing, and review. Povalyaev A. V. – investigation. Romanova O. R. – resources. Gorbunova K. N. – data processing; resources; original draft preparation, and writing. Shvachko N. A. – conceptualization; revising; editing.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 21.01.2025; одобрена после рецензирования 30.09.2025; принятая к публикации 14.10.2025. The article was submitted on 21.01.2025; approved after reviewing on 30.09.2025; accepted for publication on 14.10.2025.