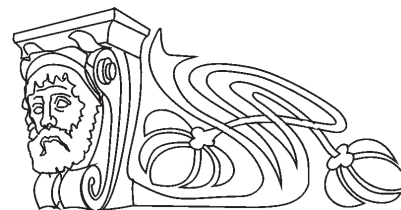




Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2022. Т. 22, вып. 4. С. 445–454
Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2022, vol. 22, iss. 4, pp. 445–454
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-4-445-454>, EDN: UTPGJS

Научная статья
УДК 576.08.572.22

Оптимизация методики получения протопластов кукурузы и их нативность после электропорации



Ю. В. Красова^{1,2}, В. В. Фадеев^{1,2}, Е. М. Моисеева², Ю. С. Гусев^{1,2}✉, М. И. Чумаков²

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ «Саратовский научный центр РАН» (ИБФРМ РАН), Россия, 410049, г. Саратов, пр. Энтузиастов, д. 13

Красова Юлия Викторовна, ¹инженер учебно-научной лаборатории биотехнологии и репродуктивной биологии; ²младший научный сотрудник лаборатории биоинженерии, krasova.yuv@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1461-7613>

Фадеев Владимир Васильевич, ¹инженер учебно-научной лаборатории биотехнологии и репродуктивной биологии; ²младший научный сотрудник лаборатории биоинженерии, vvf2593@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9725-3439>

Моисеева Елизавета Михайловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биоинженерии, em-moiseeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9234-4000>

Гусев Юрий Сергеевич, кандидат биологических наук, ¹ведущий биолог учебно-научной лаборатории биотехнологии и репродуктивной биологии; ²старший научный сотрудник лаборатории биоинженерии, gusev_yu@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7379-484X>

Чумаков Михаил Иосифович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биоинженерии, chumakov_m@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6396-2851>

Аннотация. Приведены результаты оптимизации методики изоляции протопластов из эпидермальных клеток корней кукурузы (*Zea mays* L.) линии Коричневый маркер (КМ), в ходе которой были проведены скрининговые исследования по подбору состава и концентрации ферментов, соотношения времени ферментативной обработки растительного материала и объема ферментной смеси, концентрации осмотического агента, режима центрифугирования и размера пор фильтра, применяемого при очистке суспензии протопластов. Выявлено, что оптимальное время для мацерации корневой ткани массой ~ 150 мг – 150 минут. Выход интактных протопластов составил ~ $4,4 \pm 0,2 \times 10^5$ кл/мл при следующих концентрациях ферментов и осмотического стабилизатора: целлюлаза – 17,4, пектолаза – 1,2, гемицеллюлаза – 0,07, D-маннит – 9,3%. Концентрация протопластов была в 23 раза выше ($p < 0,05$) при обработке растительной ткани в объеме 800 мкл ферментной смеси по сравнению с 200 мкл при равных концентрациях ферментов и осмотического стабилизатора. Установлено, что фильтрация 800 мкл суспензии протопластов через фильтр с размерами пор 15×15 мкм увеличивает в 3,3 раза выход протопластов при концентрации ферментов: целлюлаза – 8,7, пектолаза – 0,6, гемицеллюлаза 0,035% по сравнению с фильтром с размерами пор 15×39 мкм. Дробное центрифугирование без предварительной фильтрации раствора и метод флотации не увеличивали количество протопластов при очистке суспензии от дебриса. В рамках исследования была проведена оценка остаточного количества протопластов и определена их сохранность после инкубации в течение ~ 20 ч при +3 °С. После электропорации наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) уменьшение количества протопластов в 2 раза.

Ключевые слова: протопласты, кукуруза, электропорация, нативность протопластов

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента МК-4527.2022.1.4 и Программы фундаментальных исследований Государственных академий наук на 2021–2023 годы (№ 121031700141-7).

Для цитирования: Красова Ю. В., Фадеев В. В., Моисеева Е. М., Гусев Ю. С., Чумаков М. И. Оптимизация методики получения протопластов кукурузы и их нативность после электропорации // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2022. Т. 22, вып. 4. С. 445–454. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-4-445-454>, EDN: UTPGJS

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Optimization of the technique for maize protoplast isolation and their nativity after electroporation

Yu. V. Krasova^{1,2}, V. V. Fadeev^{1,2}, Ye. M. Moiseeva², Yu. S. Gusev^{1,2}✉, M. I. Chumakov²

¹Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

²Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), 13 Prospekt Entuziastov, Saratov 410049, Russia



Yuliya V. Krasova, krasova.yuv@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1461-7613>

Vladimir V. Fadeev, vvf2593@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9725-3439>

Yelizaveta M. Moiseeva, em-moiseeva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9234-4000>

Yury S. Gusev, gusev_yu@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7379-484X>

Mikhail I. Chumakov, chumakov_m@ibppm.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6396-2851>

Abstract. We optimized the composition and concentration of the enzymes, the time for enzymatic treatment and the volume of the enzyme mixture. We also optimized the concentration osmotic of agent, the centrifugation mode, and filter pore size for protoplasts isolating from epidermal cells of maize roots (*Zea mays* L.) of the Brown Marker (BM) line. It was found that 150 minutes is the optimal time for 150 mg root tissue maceration. The yield of intact protoplasts was $\sim 4.4 \pm 0.2 \times 10^5$ cells/mL at the following concentrations of enzymes and osmotic stabilizer: cellulase – 17.4, pectolase – 1.2, hemicellulase – 0.07, D-mannitol – 9.3%. The concentration of protoplasts was 23 times higher ($p < 0.05$) in 800 μ l, compared with 200 μ l of the enzyme mixture with equal concentrations of enzymes and osmotic stabilizer. It was found that filtration of 800 μ l protoplast suspension through a filter with a pore size of 15×15 microns increases the yield of protoplasts up to 3.3 times, compared with a filter with a pore size of 15×39 . Fractional centrifugation without preliminary filtration of the solution and the flotation method did not produce an increase in the yield of protoplasts. The residual number and protoplast wholeness after ~ 20 hours at $+3$ °C incubation was evaluated. The protoplast number decreased up to 2 times ($p < 0.05$) after electroporation.

Keywords: maize, protoplasts isolation, electroporation, protoplast nativity

Acknowledgements: This work was supported from the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists – PhDs (No. grant. MK-4527.2022.1.4) and by the 2021–2023 Basic Research Program of the State Academies of Sciences (No. 121031700141-7).

For citation: Krasova Yu. V., Fadeev V. V., Moiseeva Ye. M., Gusev Yu. S., Chumakov M. I. Optimization of the technique for obtaining maize protoplasts and their nativity after electroporation. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2022, vol. 22, iss. 4, pp. 445–454 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-4-445-454>, EDN: UTPGJS

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

На современном этапе развития биотехнологии изолированные протопласты растительных клеток широко используются для научных исследований и в биотехнологических процессах [1]. В протопласты можно относительно легко вводить не только чужеродную ДНК/РНК [2], но и компоненты большего размера, например, хлопороласты [3], антитела [4] и малые молекулы [5], что может существенно повысить эффективность получения новых форм сельскохозяйственных культур. В связи с этим возникает необходимость получения протопластов клеток растений с неповрежденными органеллами, сохраненными функциями плазматической мембраны и процессами метаболизма, что делает актуальными как подбор реактивов и режимов обработки исходного растительного материала, так и оценку нативности получаемых протопластов.

Выбор растительного материала может оказывать решающее влияние на количество, размер, жизнеспособность и способность к регенерации выделенных протопластов. В литературе есть данные о получении протопластов из различных частей растения – листьев, корней, семядолей, гипокотилей, лепестков, черешков, пыльцевых зерен, плодов, а также из каллусных и суспензионных культур (на поздней стадии логарифмического роста, когда клеточные стенки легче поддаются деструкции), клеток водорослей, клубеньков бобовых растений, растительных опухолей различного происхождения [6, 7].

Показано, что при выделении протопластов облипихи (*Hippophae rhamnoides* L.) оптимальным является использование в качестве исходного материала каллусной массы, что обеспечивает высокую жизнеспособность интактных клеток и быстрое восстановление клеточной стенки в осмотически нейтральной среде [8].

Существует два основных способа получения протопластов клеток – механический (впервые применил Клеркер в 1892 г. [цит. по 9] при выделении протопластов клеток листа телореза *Stratiotes aloides*), когда у плазмолированных клеток надрезается клеточная стенка и протопласты выходят в среду, и принципиально отличающийся – энзиматический способ получения протопластов (Коккинг, в 1960 г. применил целлюлазу, выделенную из гриба *Myrothecium verrucaria* [10]), при котором клеточная стенка удаляется с помощью ферментов. Ферментативные методы получения протопластов имеют определенные преимущества по сравнению с механическими, такие как возможность одновременного получения большого количества протопластов, отсутствие высокого осмотического давления на формирующиеся протопласты, низкая степень повреждения клеток, сравнительная быстрота метода [11]. В литературе наиболее часто можно встретить описание смешанных (механическо-энзиматических) способов изоляции протопластов, сочетающих в себе ферментативное разрушение клеточной стенки с предварительным измельчением растительной ткани. Для удаления



клеточной стенки используются ферменты трех типов – целлюлазы, гемицеллюлазы и пектиназы. Действие этих ферментов состоит в деструкции основных компонентов клеточной стенки, обеспечивающих ее механическую прочность. Как правило, это препараты зарубежного производства – opozuka R10 (Япония), cellulysin (Швейцария), macerozyme R10 (США), helicase (Франция) или отечественные препараты – ксиланигрин и ксиланаза [12]. Однако в ряде случаев применение пектолитических и целлюлолитических ферментов может не дать положительного результата из-за наличия в клеточных стенках компонентов, не подвергающихся разрушению под действием классических ферментных препаратов. Поэтому подбор ферментов проводят на основании сведений об особенностях тканей и данных, имеющихся в литературе для тканей подобного типа.

Оптимально подобранная концентрация ферментов, рН среды, а также время экспозиции измельченной растительной ткани на среде с ферментами и площадь поверхности фрагмента растительного материала, подвергающейся обработке ферментами, значительно влияют на выход протопластов [13].

Предполагается, что значительные повреждения протопластов при механическо-энзиматическом способе изоляции достигаются не только за счет механических воздействий при измельчении растительной ткани, но и вследствие выделения полифенольных продуктов жизнедеятельности и распада компонентов клеток. Снижению эффекта негативного воздействия веществ, выделяемых клетками в процессе высвобождения протопластов, способствует добавление дитиотреитола (DTT), гидролизата казеина, поливинилпирролидона, бычьего сывороточного альбумина (BSA) и цистеина в среду на различных этапах изоляции и культивирования *in vitro* [8, 13–15]. Показано, что включение в ферментные препараты 0,05% раствора BSA и 0,5 мМ раствора DTT улучшает выход протопластов из корней кукурузы примерно на 80% [13], а присутствие BSA улучшает выход протопластов также из ткани листьев кукурузы [14]. Предварительная обработка ткани корней кукурузы в 20 мМ растворе цистеина существенно улучшает выход изолированных протопластов, предположительно предотвращая ингибирование ферментов, разрушающих клеточную стенку [15]. В то же время существуют противоречивые данные, доказывающие, что предварительная обработка цистеином малоэффективна в отношении увеличения выхода

протопластов из клеток корней кукурузы, что может быть связано с включением в раствор, содержащий ферменты, BSA и DTT в качестве протекторов [13].

Важным фактором, обеспечивающим максимальный выход протопластов, является правильный подбор концентрации D-маннита, выступающего в качестве осмотического стабилизатора, предотвращающего лизис или плазмолиз протопластов [1]. Стабильности протопластов также способствуют высокие концентрации двухвалентных ионов, воздействующих на мембранные системы клетки (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Использование тиосульфата натрия в качестве антиоксиданта предотвращает повреждение здоровых протопластов гидролитическими ферментами, которые экскретируются поврежденными или лизированными во время выделения клетками [8, 16, 17].

Температурные условия изолирования протопластов могут варьировать в довольно широких пределах и их подбор осуществляется в индивидуальном порядке для определенного вида растительного материала. Снижение температуры инкубации растительной ткани мезофилла листа катарантуса розового (*Catharanthus roseus* L.) в ферментной смеси до 10 °С приводит к заметному возрастанию выхода протопластов, что может быть связано с уменьшением интенсивности деструктивных процессов. В случае чувствительных систем выделение протопластов также проводят при пониженной температуре (8–15° С) [18]. Инкубация ткани листьев табака (*Nicotiana tabacum*) в среде ферментного препарата при 28–30° С [19] и мезофильных тканей листа озимой пшеницы при 50° С в условиях термостата [12] также приводит к максимальному количеству изолированных протопластов. Показано, что большинство протопластов являются стабильными при комнатной температуре (23–28° С) [7].

Таким образом, условия для получения жизнеспособных протопластов растительных клеток со сниженным уровнем повреждения весьма индивидуальны для различных тканей и в каждом случае необходима предварительная работа по их оптимизации [20]. Достоверную оценку жизнеспособности растительных клеток и протопластов дает изучение их способности к регенерации клеточной стенки, делению и последующему органогенезу. Также доступен ряд экспресс-методов, которые позволяют оценить процент жизнеспособных протопластов в суспензии. Эти методы основываются на регистрации метаболической активности, а также



целостности и нативности плазматической мембраны клеток и протопластов [3]. В литературе описаны различного рода витальные красители, часто применяемые для выявления сохранения биохимических процессов и изменяющие свои оптические свойства в результате химических модификаций их структуры. Жизнеспособность выделенных протопластов может быть исследована добавлением красителя Эванса синего, флуоресцеина диацетата и нейтрального красного, накапливающегося в вакуолях, акридинового оранжевого, пропилий йодида [3, 13, 21].

Для оценки количества жизнеспособных протопластов также используется метод, основанный на разделении протопластов во время их осаждения в 30% растворе глюкозы в связи с различной плотностью (жизнеспособные протопласты имеют меньшую плотность, чем разрушенные и дебрис), в результате чего интактные клетки формируют компактную зону на поверхности раствора [16]. Показателем жизнеспособности протопластов также является способность к набуханию в гипотонических средах. С помощью метода деплазмолиза в средах со сниженной концентрацией осмотического компонента можно не только определить жизнеспособность протопластов, но и оценить степень повреждения плазмалеммы, в то время как применение витальных красителей не всегда возможно и в ряде случаев дает противоречивые результаты (фрагменты разрушенных клеток могут окрашиваться даже более интенсивно, чем нативные протопласты) [3].

Показано, что протопласты остаются жизнеспособными после трансфекции, что делает возможным их дальнейшее культивирование и размножение растительных тканей [22]. В литературе присутствуют данные об успешном редактировании геномов различных растений, таких как табак, арабидопсис, салат, рис [23], виноград, яблоня [24], картофель [25], пшеница [26], соя и табак [27].

В рамках исследования временной экспрессии генов, получения стабильной трансформации и изучения клеточной физиологии как прокариотических, так и эукариотических (в том числе растительных) организмов широкое применение находит метод электропорации [28–31]. В 1988 г. были получены первые полноценные трансгенные растения кукурузы из изолированных протопластов суспензионной культуры эмбрионных клеток кукурузы инбредной линии А188, успешно трансформированных методом электропорации [32].

В основе метода электропорации лежит воздействие на клетку электрического поля высокой интенсивности, которое временно дестабилизирует мембрану и приводит к образованию пор, при этом мембрана становится проницаема для экзогенных молекул, присутствующих в реакционной среде. В литературе есть данные о гибели около 50% обрабатываемых клеток в результате неравномерной интенсивности воздействующего электрического поля [31]. При этом трансформации подвергаются от 30 до 70% выживших клеток [33] и количество трансформированных клеток находится в зависимости от таких параметров, как напряжение, подаваемое на электрод, напряженность электрического поля, размеры кюветы и время импульса [34]. В связи с этим подбор параметров и условий проведения электропорации может дать приоритетные данные о возможности повышения эффективности геномного редактирования живых организмов.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили растения кукурузы (*Zea mays* L.) линии Коричневый маркер (КМ), созданной Чейзом [35] и полученной из Национального зернового центра имени П. П. Лукьяненко (Краснодар, Россия). Протопласты выделяли из эпидермальных клеток корней кукурузы в два этапа по методике [36] с нашими модификациями. На первом этапе зерновки (~175 шт.) стерилизовали в 250 мл «Белизны» (действующее вещество – гипохлорит натрия) в стеклянном стакане с периодическим встряхиванием в течение 8 минут. Семена 5-кратно промывали эквивалентным объемом (250 мл) воды и помещали на лист смоченной водой фильтровальной бумаги, распределяли в ряд по краю длинной стороны бумаги, сверху накрывали листом бумаги. Листы бумаги сворачивали в рулон и обвязывали лентой чуть ниже уровня семян, на уровне нижней части бумаги. Каждый рулон заворачивали в слой фольги для предотвращения попадания на корни прямых солнечных лучей и помещали в пластиковый контейнер, наполненный водой до уровня $\frac{1}{4}$ высоты рулона (7 рулонов по ~25 зерен). Зерновки инкубировали в течение 5 суток при 24° С при интенсивности освещенности 4400 лк (продолжительность светового дня – 16 ч). На 6-е сутки наблюдали хорошо развитые первичные, вторичные и придаточные корни.

На втором этапе производили измельчение корневой ткани с помощью скальпеля для облегчения доступа смеси ферментов к клеткам



корня и получения протопластов в растворе ферментной смеси. Первичные корни длиной 4–5 мм (~ 150 мг) переносили в пробирку Eppendorf (0,6 мл), содержащую 200 мкл раствора для предварительной обработки (сорбит D (+) (Реахим, Россия (ч)), 2,9%; L-цистеин (Диаэм, Россия), 0,03%, и инкубировали при комнатной температуре в течение 45 мин.

После обработки раствор удаляли пипеткой, избегая повреждения ткани корней, корни промывали дистиллированной водой, помещали на чашку Петри, содержащую 200, 800 мкл раствора для ферментной обработки (маннитол D (-) (Реахим, Россия (ч)), 7,3%; 2-morpholin-4-ylethanesulfonic acid (MES) (Helicon, Россия), 0,4%; KCl (Реахим, Россия (ч)) 0,06%, CaCl₂ (Реахим, Россия) 0,04%; BSA (Serva, Германия), 0,00004%, pH раствора – 5,7; целлюлаза из *Trichoderma viride* 1,8 ед/мг (Serva, Германия), 8,7%; 17,4%; пектолаза из *Rhizopus* sp. 0,456 ед/мг (Sigma, США), 0,6%; 1,2%; гемицеллюлаза из *Aspergillus niger* 1,5 ед/мг (Sigma, США), 0,035%; 0,07%) и разрезали скальпелем на сегменты ~ 1 мм, затем переносили в стеклянную пробирку 5 мл и инкубировали под наклоном при покачивании 60 об/мин (временной интервал – от 90 мин до ~ 20 ч). Предварительно проводили скрининговые исследования для поиска оптимальных концентраций ферментов и осмотического агента для наибольшего выхода жизнеспособных клеток.

После инкубации среду несколько раз перемешивали до помутнения. Раствор, содержащий корни и протопласты, фильтровали через нейлоновые фильтры с размерами пор 15 × 15 мкм, 15 × 39 мкм. Также применяли дробное центрифугирование без предварительной фильтрации раствора с протопластами по схеме: центрифугирование 300 g в течение 5 мин далее центрифугирование супернатанта 500 g в течение 3 мин.

С целью очистки раствора протопластов от клеточных обломков был применен метод флотации, основанный на более низкой плотности протопластов, чем плотность органелл или остатков клеточных стенок. После фильтрации раствор, содержащий протопласты, центрифугировали (500 g в течение 3 мин), осадок ресуспендировали в 100 мкл раствора для отмывки: маннитол D (-) (Реахим, Россия), 7,3%, 8,3%, 9,3%, 10,3%, 11,3%; MES (Helicon, Россия), 0,4%; KCl (Реахим, Россия (ч)), 0,15%; CaCl₂ (Реахим, Россия), 0,11%; BSA (Serva, Германия), 0,00001%; pH раствора 5,7. Далее отфильтрованный раствор наслаивали

(пипеткой по стенке, не смешивая с раствором маннитола) поверх 200 мкл 20% раствора маннитола и центрифугировали (300 g в течение 3 мин). Пипеткой на 200 мкл отбирали интерфазу, расположенную между слоем раствора маннитола и слоем отмывочного раствора.

Подсчет протопластов проводили на микроскопе DM 2500 (Leica, Германия) при увеличении 100 – 400× на камере Горяева по 16 большим (S = 0,16 мм²) квадратам, включающим 256 малых квадрата, расположенным по диагонали (учитывали протопласты, расположенные либо полностью внутри квадрата, либо на верхней и правой границах квадрата). При подсчете использовали формулу [37]:

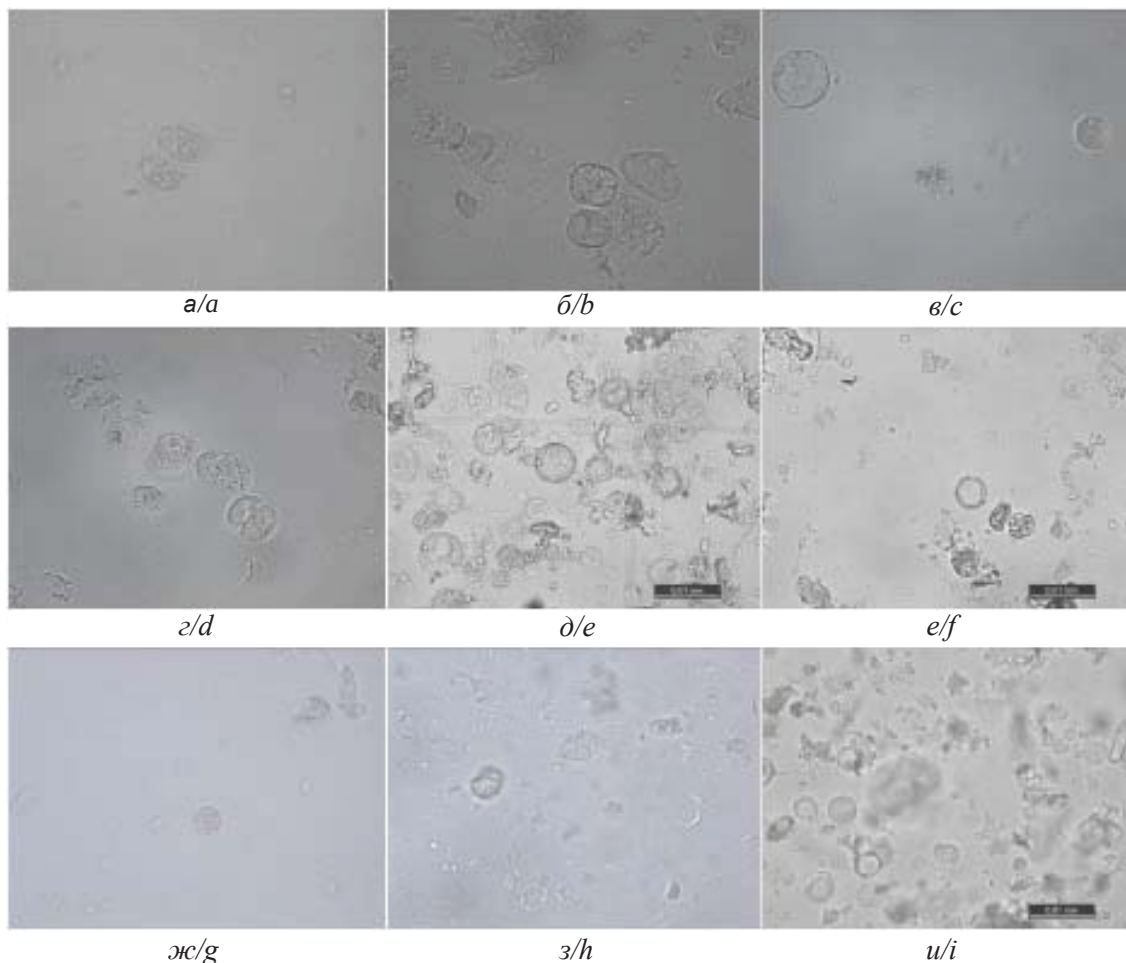
$$N = a \times 10^3 / h \times S,$$

где N – искомое количество протопластов в 1 мл суспензии, a – среднее количество клеток в квадрате сетки, 10^3 – коэффициент перевода [см³] в [мм³], h – глубина камеры, мм, S – площадь квадрата сетки, мм².

Электропорацию протопластов проводили с помощью электропоратора MicroPulser (BioRad, США) в кювете с шириной зазора между электродами 5 мм. Кювету предварительно охлаждали на льду, 150 мкл суспензии протопластов помещали в кювету и подвергали электропорации при напряжении 250 В и времени импульса 5 мс (0,5 кВ/см). После электропорации кювету переносили на лед, отбирали 20 мкл и проводили оценку количества протопластов на микроскопе DM 2500 (Leica, Германия) при помощи камеры Горяева. Оставшееся количество суспензии протопластов инкубировали в течение ночи при температуре + 3°C для проведения оценки остаточного количества протопластов. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программ Microsoft Office Excel 2010.

Результаты и их обсуждение

Существенным моментом, обеспечивающим выделение максимального количества протопластов, является правильное сочетание ферментов, разрушающих клеточную стенку растений, а также поддержание клетки в состоянии плазмолиза путем создания повышенного осмотического давления снаружи клетки. На степень мацерации растительной ткани также в значительной степени влияет время ферментативной обработки. Зависимость количества изолированных клеток от длительности обработки была исследована во временном интервале 90–180 мин (рисунок, а–г).



Протопласты, полученные после ферментативной обработки в течение 90 мин (а), 120 мин (б), 150 мин (в), 180 мин (г); протопласты, полученные после ферментативной обработки в течение 150 мин в объеме 800 мкл ферментативного раствора с концентрацией ферментов 1 ($3,6 \times 10^5$ кл/мл) (д), в объеме 200 мкл ферментативного раствора с концентрацией ферментов 1 ($15,6 \times 10^3$ кл/мл) (е); протопласты, обнаруженные в осадке после ферментативной обработки в течение 150 мин и первого раунда дробного центрифугирования $300 \text{ g} \times 5 \text{ min}$ (ж); протопласты, обнаруженные в интерфазе после ферментативной обработки в течение 150 мин и второго раунда дробного центрифугирования с 20% раствором маннитола $300 \text{ g} \times 3 \text{ min}$ (з); протопласты (800 мкл ферментативного раствора, конц. 2) после инкубации при $+3 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение ночи ($3,4 \times 10^5$ кл/мл) (и). Микроскопия выполнена на микроскопе DM 2500 (Leica, Германия) при увеличении $400\times$

Figure. Protoplasts obtained after enzymatic treatment during 90 min (a), 120 min (b), 150 min (c), 180 min (d); protoplasts obtained after enzymatic treatment during 150 min in 800 μl of an enzymatic solution with an enzyme concentration No.1 ($3,6 \times 10^5$ cell/mL) (e), in 200 μl of an enzymatic solution with an enzyme concentration No. 1 ($15,6 \times 10^3$ cell/mL) (f); protoplasts found in sediment after enzymatic treatment during 150 min and the first centrifugation (300 g for 5 min) (g); protoplasts found in the interphase after enzymatic treatment during 150 min and the second centrifugation with 20% mannitol solution (300 g for 3 min) (h); protoplasts (800 μl of enzyme solution, conc. 2) after overnight incubation at $+3 \text{ }^\circ\text{C}$ ($3,4 \times 10^5$ cells/mL) (i). Microscopy was performed at DM 2500 microscope (Leica, Germany) with a $400\times$ magnification

Показано, что оптимальное время для мацерации корневой ткани кукурузы (*Zea mays* L.) линии КМ массой ~ 150 мг составляет 150 мин., при этом максимальный выход протопластов эпидермальных клеток достигается при концентрации осмотического стабилизатора – 9,3% (D-маннит).

Объем смеси, в котором происходит процесс ферментации, также оказывал существенное влияние на выход протопластов. В варианте объема 800 мкл наблюдали концентрацию протопластов достоверно ($p < 0,05$) в 23 раза выше относительно варианта 200 мкл при прочих равных условиях (см. рисунок,



д–е). В таблице приведены данные по выходу протопластов в зависимости от концентрации ферментов, объема ферментной смеси

и размера пор фильтра (время экспозиции корневой ткани при ферментной обработке – 150 мин).

Выход протопластов (кл/мл) в зависимости от концентрации ферментов, объема ферментной смеси и типа фильтра

Table. Yield of protoplasts (cells/mL) depending on the concentration of enzymes, the volume of the enzyme mixture and the type of filter

Концентрация ферментов в составе ферментной смеси, % / The concentration of enzymes in the composition of the enzyme mixture, %	Выход протопластов при ферментной обработке корневой ткани, 10 ³ кл/мл Yield of protoplasts during enzymatic treatment of root tissue, 10 ³ cells/mL			
	Объем ферментативной смеси, мкл / Enzyme mixture volume, µl			
	200 мкл / 200 µl		800 мкл / 800 µl	
	Размер пор фильтра, мкм / Filter pore size, µm			
	15×15	15×39	15×15	15×39
Целлюлаза / Cellulase – 8,7, Пектолаза / Pectolase – 0,6, Гемицеллюлаза / Hemicellulase – 0,035	15,6 ± 6,5	НО / ND	360 ± 30	110 ± 10
Целлюлаза / Cellulase – 17,4, Пектолаза / Pectolase – 1,2, Гемицеллюлаза / Hemicellulase – 0,07	51 ± 10	63 ± 10	НО / ND	440 ± 20

Примечание. НО – не определяли.
Note. ND – did not define.

Концентрация ферментов, рассчитанная согласно методике [36] на объем ферментативной смеси 200 мкл (целлюлаза – 17,4%, пектолаза – 1,2%, гемицеллюлаза – 0,07% (конц. 2)), дает в 3–4 раз больший выход протопластов по сравнению с вдвое сниженной концентрацией (целлюлаза – 8,7%, пектолаза – 0,6%, гемицеллюлаза – 0,035% (конц. 1)) (см. таблицу). Следует отметить, что среди выделенных протопластов присутствовало множество клеток с поврежденной клеточной стенкой, не поддающихся деплазмолиту.

В работе были также применены различные фильтры при очистке суспензии протопластов от немацерированной ткани и дебриса (размеры пор – 15 × 15, 15 × 39). Установлено, что при фильтрации 800 мкл суспензии протопластов использование фильтра с размерами пор 15 × 15 мкм увеличивает выход протопластов в 3,3 раза, по сравнению с фильтром с размерами пор 15 × 39 мкм.

С целью очистки раствора протопластов от клеточных обломков наряду с фильтрами с размерами пор 15 × 15 и 15 × 39 мкм было применено дробное центрифугирование без предварительной фильтрации. При этом предполагалось, что непереваренная ткань и дебрис остаются в супернатанте после второго раунда центрифугирования, а протопласты выпадают в осадок. Тем не менее, протопласты уходили в осадок уже

при первом центрифугировании (см. рисунок, ж). Апробирован метод флотации, основанный на более низкой плотности протопластов, чем плотность органелл или остатков клеточных стенок. Протопласты были обнаружены в осадке после первого раунда центрифугирования и в интерфазе после центрифугирования с 20 % раствором маннитола (с тем же количеством клеточных обломков, которое было до флотации) (см. рисунок, з).

Микроскопическая оценка в камере Горяева остаточного количества протопластов, полученных после ферментной обработки в 800 мкл ферментного раствора с повышенной концентрацией ферментов (конц. 2), показала сохранность клеток после инкубации при +3 °С в течение ~20 ч (см. рисунок, и). Остаточное количество протопластов после проведения электропорации достоверно ($p < 0,05$) снижалось в 1,7 раза до $\sim 1,2 \pm 0,1 \times 10^5$ кл/мл (при исходной концентрации протопластов в суспензии $\sim 2 \pm 0,2 \times 10^5$ кл/мл).

Заключение

При оптимизации методики получения протопластов эпидермальных клеток корней кукурузы (*Zea mays* L.) линии КМ были проведены скрининговые исследования по подбору состава и концентрации ферментов, соотношения времени ферментативной обработки расти-



тельного материала и объема ферментной смеси, концентрации осмотического агента, режима центрифугирования и размера пор фильтра, применяемого при очистке суспензии протопластов. Выход интактных протопластов составил $\sim 4,4 \times 10^5$ кл/мл (концентрация ферментов и осмотического стабилизатора: целлюлаза – 17,4%, пектолаза – 1,2%, гемицеллюлаза – 0,07%, D-маннит – 9,3%; объем ферментативной смеси – 800 мкл; размеры пор фильтра – 15×39 мкм). Концентрация протопластов наблюдалась в 23 раза выше ($p < 0,05$) при обработке растительной ткани в объеме 800 мкл ферментной смеси по сравнению с 200 мкл при равных концентрациях ферментов и осмотического стабилизатора. Оценка остаточного количества протопластов показала сохранность клеток после инкубации в течение ~ 20 ч при $+3^\circ \text{C}$. После проведения электропорации количество протопластов достоверно уменьшалось в 2 раза ($p < 0,05$).

Список литературы

1. Davey M. R., Anthony P., Patel D., Power J. B. Plant protoplasts: isolation, culture and plant regeneration // Plant Cell Culture: Essential Methods. New York : Wiley-Blackwell, 2010. P. 153–173.
2. Bailey-Serres J., Dawe R. K. Both 5' and 3' sequences of maize *adh1* mRNA are required for enhanced translation under low-oxygen conditions // Plant Physiol. 1996. Vol. 112. P. 685–695. <https://doi.org/10.1104/pp.112.2.685>
3. Кудряшов А. П., Шапчиц М. П. Оценка нативности протопластов и клеток растений // Труды Белорусского государственного университета: научный журнал. 2009. Т. 4, № 2. С. 1–6.
4. Maccarrone M., Veldink G. A., Agro A. F., Vliegthart J. F. G. Lentil root protoplasts, a transient expression system suitable for coelectroporation of monoclonal antibodies and plasmid molecules // Biochem. Biophys. Acta. (BBA). 1995. Vol. 1243. P. 136–142. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(94\)00124-G](https://doi.org/10.1016/0304-4165(94)00124-G)
5. Jang J.-C., Sheen J. Sugar sensing in higher plants // Plant Cell. 1994. Vol. 6. P. 1665–1679. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.11.1665>
6. Ziv M., Altman A. Tissue culture General Principles // Encyclopedia of Applied Plant Sciences Elsevier Science Ltd. 2003. P. 1341–1353. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227050-9/00213-1>
7. Reed K. M., Bargmann B. O. R. Protoplast regeneration and its use in new plant breeding technologies // Frontiers in Genome Editing. 2021. Vol. 3. P. 1–26. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.734951>
8. Скапцов М. В., Смирнов С. В., Куцев М. Г. Получение протопластов облепихи (*Hippophae rhamnoides* L.) // Turczaninowia. 2013. Т. 16, № 3. С. 152–156. <https://doi.org/10.14258/turczaninowia.16.3.20>
9. Papadakis A., Reustle G., Roubelakis-Angelakis K. A. Protoplast technology in grapevine // Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine. Springer, Dordrecht, 2001. Ch. 14. P. 353–392. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2308-4_14
10. Cocking E. A. Method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles // Nature. 1960. Vol. 187. P. 962–963.
11. Bhojwani S. S., Razdan M. K. Protoplast isolation and culture // Studies in Plant Science. 1996. Vol. 5, ch. 12. P. 337–372.
12. Кузнецова Е. А., Парамонов И. Н., Зомитев В. Ю. Оценка использования ферментов целлюлазного комплекса при получении протопластов растений // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. 2013. № 5. С. 9–12.
13. Gronwald J. W., Leonard R. T. Isolation and transport properties of protoplasts from cortical cells of corn roots // Plant Physiology. 1982. Vol. 70, № 5. P. 1391–1395.
14. Perlin D. S., Spanswick R. M. Labeling and isolation of plasma membranes from corn leaf protoplasts // Plant Physiology. 1980. Vol. 65, № 6. P. 1053–1057.
15. Senn A., Pilet P. E. Isolation and some morphological properties of maize root protoplasts // Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. 1980. Bd. 100, № 4. S. 299–310.
16. Скапцов М. В., Куцев М. Г. Получение мезофильных протопластов *Rumex aquaticus* и *Rumex acetosa* сорт «широколиственный» // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. 2011. № 10. С. 170–173.
17. Ochatt S. J., Caso O. H. Shoot regeneration from leaf mesophyll protoplasts of wild pear (*Pyrus communis* var. *pyraster* L.) // Journal of Plant Physiology. 1986. Vol. 122, № 3. P. 243–249. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(86\)80123-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(86)80123-7)
18. Молчан О. В., Ромашко С. Н., Кенькова М. А., Юрин В. М. Иммунизация протопластов мезофилла листа *Catharanthus roseus* // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. 2010. № 4. С. 45–49.
19. Rao K. S., Prakash A. H. A simple method for the isolation of plant protoplasts // Journal of Biosciences. 1995. Vol. 20. P. 645–655. <https://doi.org/10.1007/BF02703304>
20. Evans D. A., Bravo J. E. Plant protoplast isolation and culture // Intern. Rev. Cytol. Suppl. 2013. Vol. 16. P. 33–53.
21. Прилепский А. Ю., Дроздов А. С., Богатырев В. А., Староверов С. А. Методы работы с клеточными культурами и определение токсичности наноматериалов. СПб. : Университет ИТМО, 2019. 43 с.
22. Kanchiswamy C. N. DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement // Plant Cell Rep. 2016. Vol. 35. P. 1469–1474.
23. Woo J. W., Kim J., Kwon S. I., Corvalán C., Cho S. W., Kim H., Kim S.-G., Kim S.-T., Choe S., Kim J.-S. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins // Nat. Biotechnol. 2015. Vol. 33. P. 1162–1164. <https://doi.org/10.1038/nbt.3389>
24. Malnoy M., Viola R., Jung M. H., Koo O.-J., Kim S., Kim J.-S., Velasco R., Kanchiswamy C. N. DNA-free



- genetically edited grapevine and apple protoplast using Crispr/Cas9 ribonucleoproteins // *Frontiers Plant Sci.* 2016. Vol. 7, № 1904. P. 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01904>
25. Andersson M., Turesson H., Olsson N., Fält A.-S., Ohlsson P., Gonzalez M. N., Samuelsson M., Hofvander P. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery // *Physiol. Plant.* 2018. Vol. 164, № 4. P. 378–384. <https://doi.org/10.1111/ppl.12731>
 26. Liang Z., Chen K., Gao C. Biolistic delivery of CRISPR/Cas9 with ribonucleoprotein complex in wheat // *Methods Mol. Biol.* 2019. Vol. 1917. P. 327–335. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8991-1_24
 27. Kim H., Kim S. T., Ryu J., Kang B.-C., Kim J.-S., Kim S.-G. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8, № 14406. P. 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms14406>
 28. Данилова С. А. Методы генетической трансформации зерновых культур // *Физиология растений.* 2007. Т. 54, № 5. С. 645–658.
 29. Чесноков Ю. В. Проблемы генетической трансформации растений. Методические подходы (обзор) // *Сельскохозяйственная биология.* 2004. Т. 39, № 1. С. 26–40.
 30. Fromm M., Taylor L. P., Walbot V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 1985. Vol. 82, № 17. P. 5824–5828.
 31. Bates G. W. Plant transformation via protoplast electroporation // *Plant Cell Culture Protocols.* 1999. Vol. 111. P. 359–366. <https://doi.org/10.1385/1-59259-583-9:359>
 32. Rhodes C. A., Pierce D. A., Mettler I. J., Mascarenhas D., Detmer J. J. Genetically transformed maize plants from protoplasts // *Science.* 1988. Vol. 240, № 4849. P. 204–207. <https://doi.org/10.1126/science.283294>
 33. Gomez-Cano L., Yang F., Grotewold E. Isolation and efficient maize protoplast transformation // *Bio-protocol.* 2019. P. e3346–e3346. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3346>
 34. Lyznik L. A., Kamo K. K., Grimes H. D., Ryan R., Chang K.-L., Hodges T. K. Stable transformation of maize: The impact of feeder cells on protoplast growth and transformation efficiency // *Plant Cell Reports.* 1989. Vol. 8. P. 292–295. <https://doi.org/10.1007/BF00274133>
 35. Chase S. S. Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.) // *The Botanical Review.* 1969. Vol. 35, № 2. P. 117–168. <https://doi.org/10.1007/BF02858912>
 36. Ortiz-Ramírez C., Arevalo E. D., Xu X., Jackson D. P., Birnbaum K. D. An efficient cell sorting protocol for maize protoplasts // *Current Protocols in Plant Biology.* 2018. Vol. 3, № 3. P. e20072. <https://doi.org/10.1002/cppb.20072>
 37. Пескова Н. Н., Балалаева И. В., Брилкина А. А., Шлягина Н. Ю., Масленникова А. В., Мысягин С. А. Оценка жизнеспособности клеток *in vitro*: учеб.-метод. пособие. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2020. 25 с.

References

1. Davey M. R., Anthony P., Patel D., Power J. B. Plant protoplasts: isolation, culture and plant regeneration. In: *Plant Cell Culture: Essential Methods.* New York, Wiley-Blackwell, 2010, pp. 153–173.
2. Bailey-Serres J., Dawe R. K. Both 5' and 3' sequences of maize *adh1* mRNA are required for enhanced translation under low-oxygen conditions. *Plant Physiol.*, 1996, vol. 112, pp. 685–695. <https://doi.org/10.1104/pp.112.2.685>
3. Kudriashov A. P., Shapchits M. P. Assessment of the nativeness of protoplasts and plant cells. *Proceedings of the Belarusian State University: Scientific journal*, 2009, vol. 4, no. 2, pp. 1–6 (in Russian).
4. Maccarrone M., Veldink G. A., Agro A. F., Vliegthart J. F. G. Lentil root protoplasts, a transient expression system suitable for coelectroporation of monoclonal antibodies and plasmid molecules. *Biochem. Biophys. Acta (BBA)*, 1995, vol. 1243, pp. 136–142. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(94\)00124-G](https://doi.org/10.1016/0304-4165(94)00124-G)
5. Jang J.-C., Sheen J. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell*, 1994, vol. 6, pp. 1665–1679. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.11.1665>
6. Ziv M., Altman A. Tissue culture General Principles. In: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences Elsevier Science Ltd.*, 2003, pp. 1341–1353. <https://doi.org/10.1016/B012-227050-9/00213-1>
7. Reed K. M., Bargmann B. O. R. Protoplast regeneration and its use in new plant breeding technologies. *Frontiers in Genome Editing*, 2021, vol. 3, pp. 1–26. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.734951>
8. Skaptsov M. V., Smirnov S. V., Kutsev M. G. Obtaining sea buckthorn protoplasts (*Hippophae rhamnoides* L.). *Turczaninowia*, 2013, vol. 16, no. 3, pp. 152–156 (in Russian). <https://doi.org/10.14258/turczaninowia.16.3.20>
9. Papadakis A., Reustle G., Roubelakis-Angelakis K. A. Protoplast technology in grapevine. In: *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine.* Springer, Dordrecht, 2001, ch. 14, pp. 353–392. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2308-4_14
10. Cocking E. A. Method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 1960, vol. 187, pp. 962–963.
11. Bhojwani S. S., Razdan M. K. Protoplast isolation and culture. *Studies in Plant Science*, 1996, vol. 5, ch. 12, pp. 337–372.
12. Kuznetsova E. A., Paramonov I. N., Zomitev V. Iu. Evaluation of the use of cellulase complex enzymes in the production of plant protoplasts. *Technology and Merchandising of Innovative Food Products*, 2013, no. 5, pp. 9–12 (in Russian).
13. Gronwald J. W., Leonard R. T. Isolation and transport properties of protoplasts from cortical cells of corn roots. *Plant Physiology*, 1982, vol. 70, no. 5, pp. 1391–1395.
14. Perlin D. S., Spanswick R. M. Labeling and isolation of plasma membranes from corn leaf protoplasts. *Plant Physiology*, 1980, vol. 65, no. 6, pp. 1053–1057.
15. Senn A., Pilet P. E. Isolation and some morphological properties of maize root protoplasts. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 1980, vol. 100, no. 4, pp. 299–310.



16. Skaptsov M. V., Kutsev M. G. Obtaining mesophilic protoplasts of *Rumex aquaticus* and *Rumex acetosa* variety "broad-leaved". *Problems of Botany of Southern Siberia and Mongolia*, 2011, no. 10, pp. 170–173 (in Russian).
17. Ochatt S. J., Caso O. H. Shoot regeneration from leaf mesophyll protoplasts of wild pear (*Pyrus communis* var. *pyraster* L.). *Journal of Plant Physiology*, 1986, vol. 122, no. 3, pp. 243–249. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(86\)80123-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(86)80123-7)
18. Molchan O. V., Romashko S. N., Ken'kova M. A., Iurin V. M. Immobilization of protoplasts of the mesophyll of the *Catharanthus roseus* leaf. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Sciences*, 2010, no. 4, pp. 45–49 (in Russian).
19. Rao K. S., Prakash A. H. A simple method for the isolation of plant protoplasts. *Journal of Biosciences*, 1995, vol. 20, pp. 645–655. <https://doi.org/10.1007/BF02703304>
20. Evans D. A., Bravo J. E. Plant protoplast isolation and culture. *Intern. Rev. Cytol. Suppl.*, 2013, vol. 16, pp. 33–53.
21. Prilepskii A. Iu., Drozdov A. S., Bogatyrev V. A., Staroverov S. A. *Metody raboty s kletochnymi kul'turami i opredelenie toksichnosti nanomaterialov* [Methods of working with cell cultures and determination of toxicity of nanomaterials]. St. Petersburg, Universitet ITMO Publ., 2019. 43 p. (in Russian).
22. Kanchiswamy C. N. DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement. *Plant Cell Rep.*, 2016, vol. 35, pp. 1469–1474.
23. Woo J. W., Kim J., Kwon S. I., Corvalán C., Cho S. W., Kim H., Kim S.-G., Kim S.-T., Choe S., Kim J.-S. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.*, 2015, vol. 33, pp. 1162–1164. <https://doi.org/10.1038/nbt.3389>
24. Malnoy M., Viola R., Jung M. H., Koo O.-J., Kim S., Kim J.-S., Velasco R., Kanchiswamy C. N. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using Crispr/Cas9 ribonucleoproteins. *Frontiers Plant Sci.*, 2016, vol. 7, no. 1904, pp. 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01904>
25. Andersson M., Turesson H., Olsson N., Fält A.-S., Ohlsson P., Gonzalez M. N., Samuelsson M., Hofvander P. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiol. Plant*, 2018, vol. 164, no. 4, pp. 378–384. <https://doi.org/10.1111/ppl.12731>
26. Liang Z., Chen K., Gao C. Biolistic delivery of CRISPR/Cas9 with ribonucleoprotein complex in wheat. *Methods Mol. Biol.*, 2019, vol. 1917, pp. 327–335. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8991-1_24
27. Kim H., Kim S. T., Ryu J., Kang B.-C., Kim J.-S., Kim S.-G. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. *Nat. Commun.*, 2017, vol. 8, no. 14406, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms14406>
28. Danilova S. A. Methods of genetic transformation of grain crops. *Plant Physiology*, 2007, vol. 54, no. 5, pp. 645–658 (in Russian).
29. Chesnokov Iu. V. Problems of genetic transformation of plants. Methodological approaches (review). *Agricultural Biology*, 2004, vol. 39, no. 1, pp. 26–40 (in Russian).
30. Fromm M., Taylor L. P., Walbot V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1985, vol. 82, no. 17, pp. 5824–5828.
31. Bates G. W. Plant transformation via protoplast electroporation. *Plant Cell Culture Protocols*, 1999, vol. 111, pp. 359–366. <https://doi.org/10.1385/1-59259-583-9:359>
32. Rhodes C. A., Pierce D. A., Mettler I. J., Mascarenhas D., Detmer J. J. Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science*, 1988, vol. 240, no. 4849, pp. 204–207. <https://doi.org/10.1126/science.283294>
33. Gomez-Cano L., Yang F., Grotewold E. Isolation and efficient maize protoplast transformation. *Bio-protocol*, 2019, pp. e3346–e3346. <https://doi.org/10.21769/Bio-Protoc.3346>
34. Lyznik L. A., Kamo K. K., Grimes H. D., Ryan R., Chang K.-L., Hodges T. K. Stable transformation of maize: The impact of feeder cells on protoplast growth and transformation efficiency. *Plant Cell Reports*, 1989, vol. 8, pp. 292–295. <https://doi.org/10.1007/BF00274133>
35. Chase S. S. Monoploids and monoploid-derivatives of maize (*Zea mays* L.). *The Botanical Review*, 1969, vol. 35, no. 2, pp. 117–168. <https://doi.org/10.1007/BF02858912>
36. Ortiz-Ramírez C., Arevalo E. D., Xu X., Jackson D. P., Birnbaum K. D. An efficient cell sorting protocol for maize protoplasts. *Current Protocols in Plant Biology*, 2018, vol. 3, no. 3, pp. e20072. <https://doi.org/10.1002/cppb.20072>
37. Peskova N. N., Balalaeva I. V., Brilkina A. A., Shiliagina N. Iu., Maslennikova A. V., Mysyagin S. A. *Otsenka zhiznesposobnosti kletok in vitro: ucheb.-metod. posobie*. [Cell Viability Assessment *in vitro*: educat. and method. manual]. Nizhny Novgorod, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod Publ., 2020. 25 p. (in Russian).

Поступила в редакцию 03.08.22; одобрена после рецензирования 10.08.22; принята к публикации 11.08.22
The article was submitted 03.08.22; approved after reviewing 10.08.22; accepted for publication 11.08.22