ТРУДЫ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО
ИНСТИТУТА ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА

www.journal.spb-niilh.ru
ISSN 2079-6080

DOI 10.21178/2079-6080.2022.4.4
УДК 577.2.08

Способы получения стерильных клонов тополя и осины (*Populus* ssp.) с использованием генной инженерии

© Д.С. Каржаев[1,2], Е.Д. Сафронычева[2], В.А. Волков[1,2]

Ways to produce sterile clones of poplar and aspen (*Populus* ssp.) using genetic engineering

D.S. Karzhaev, E.D. Safronycheva, V.A. Volkov (Saint Petersburg State Forest Technical University; Saint Petersburg Forestry Research Institute)

In recent years, there is an increasing attention to the issues of sustainable forest management. One of the promising methods to address these issues is genomic editing. Genomic editing currently faces regulatory limitations due to the possible horizontal transfer of genes from edited plants into natural ecosystems. This study focuses on the issue of obtaining sterile poplar and aspen clones, which are not subject to regulatory restrictions due to the use of genetic engineering methods. This article summarizes early studies of flowering genes aimed at creating sterile plants through gene modification, Describes experiments to reveal the role of genes in flowering using the BARNASE:BARSTAR system, RNA interference and gene editing. The article briefly summarizes the principles of CRISPR/Cas editing. Some online resources used to search for spacers in the genome of the subject being edited are listed. A method is described for obtaining gid RNA inside the pUC57-sgRNA bacterial vector by restriction with BsaI and subsequent spacer ligation. Early studies on methods for the delivery of editing constructs into poplar cells are also reviewed, and the possibility of their application to free-stranded editing is evaluated. The article discusses the significant advantages of the genome editing method over gene modification. The results of creating sterile aspens can be widely used as a breeding base for further experiments on changing economically valuable traits, and will also help to assess the real potential of using gene editing for perennial plants.

Key words: aspen, poplar, genome editing, flowering genes, CRISPR/Cas9, biolistic, PEG-mediated transformation

Способы получения стерильных клонов тополя и осины (*Populus* ssp.) с помощью генной инженерии.

Д.С. Каржаев, Е.Д. Сафронычева, В.А. Волков

В последние годы в мире все больше внимания уделяется вопросам неистощимого лесопользования. Одним из перспективных методов решения этих вопросов является геномное редактирование. Однако этот метод в настоящий момент сталкивается с регуляторными ограничениями из-за возможного горизонтального переноса генов от редактированных растений в природные экосистемы. Данное исследование посвящено изучению вопроса получения стерильных клонов тополей и осины, не попадающих под такие ограничения, несмотря на использование методов генной инженерии при их создании. В статье обобщены ранние исследования генов цветения, направленные на создание стерильных растений посредством генной модификации. Описаны эксперименты по выявлению роли генов в цветении с использованием BARNASE:BARSTAR системы, РНК интерференции и генного редактирования. В статье кратко обобщены принципы CRISPR/Cas редактирования. Перечислены некоторые онлайн-ресурсы, используемые для поиска спейсеров в геноме редактируемого объекта. Описан метод получения гидовой РНК внутри бактериального вектора pUC57-sgRNA с помощью рестрикции ферментом BsaI и дальнейшего лигирования спейсера. Также рассмотрены ранние исследования, посвященные методам доставки редактирующих конструкций в клетки тополя, дана оценка возможности их применения для бесплазмидного редактирования. В статье рассматриваются значительные преимущества метода редактирования генома над генной модификацией. Результаты создания стерильных осин могут широко использоваться в качестве селекционной базы для проведения дальнейших опытов по изменению хозяйственно ценных признаков, а также помогут оценить реальный потенциал использования генного редактирования для многолетних растений.

Ключевые слова: осина, тополь, геномное редактирование, гены цветения, CRISPR/Cas9, биолистика, PEG опосредованная трансформация

Каржаев Дмитрий Сергеевич – специалист исследовательской лаборатории ФБУ «СПбНИИЛХ», студент (магистратура) Санкт-Петербургского государственного лесотехнического университета им. С.М. Кирова

E-mail: karzhaevd@gmail.com

Сафронычева Елизавета Дмитриевна – лаборант-исследователь исследовательской лаборатории ФБУ «СПбНИИЛХ»

Волков Владимир Александрович – научный сотрудник исследовательской лаборатории ФБУ «СПбНИИЛХ»; ведущий инженер отдела обеспечения НИР СПбГЛТУ им. С.М. Кирова

[1]ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С.М. Кирова»

194021, Санкт-Петербург, Институтский пер., 5

Телефон: +7 (812) 670-92-46

[2] ФБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт лесного хозяйства»

194021, Санкт-Петербург, Институтский пр., 21

Телефон: (812) 552-80-21, Факс: (812) 552-80-42

Введение

Рост населения в мире сопровождается увеличением спроса на древесину, которая используется для получения топлива, продуктов питания и создания комфортной среды обитания, при сохранении главной функции лесов – биосферной. Для удовлетворения этого растущего спроса объем древесины, который сейчас ежегодно изымается из лесного фонда, потребуется утроить к 2050 году [38]. Лесные плантации, занимавшие к 2015 году 7 % мировых лесных площадей, обеспечивают возможность устойчивого увеличения производства лесной продукции и снижения нагрузки на естественные леса [24]. Наряду с совершенствованием методов лесоводства и землепользования, большим потенциалом для повышения устойчивости и продуктивности лесонасаждений являются также и биотехнологии [2].

В настоящее время развивается новое, перспективное направление биотехнологических исследований, связанное с редактированием генома. Экспоненциально растет количество публикаций по этой тематике. Однако в России темпы развития технологий геномного редактирования недостаточно высоки, несмотря на государственную поддержку.

Генная инженерия (ГИ) способна обеспечить решение многих проблем, с которыми сталкивается лесное хозяйство для обеспечения многоцелевого и неистощительного использования лесов. Повышение количества и качества древесины, устойчивости к биотическому и абиотическому стрессу, а также к гербицидам – далеко неполный перечень признаков, которые на сегодня были успешно усовершенствованы у древесных пород с использованием ГИ.

В Бразилии, например, было разрешено выращивание в коммерческих целях генно-модифицированных клонов эвкалипта. Такие деревья на 20 % превосходят по скорости роста лучшие клоны, полученные методами традиционной селекции, что привело в 2015 году к созданию крупномасштабных коммерческих плантаций эвкалипта в этой стране, которые выращиваются для производства волокна, используемого в целлюлозно-бумажной промышленности [8].

Результаты отчета, недавно подготовленного крупнейшим новозеландским научно-исследовательским центром лесной генетики и биотехнологии «Сцион» («Scion», Новая Зеландия), показывают, что использование генетически модифицированных (ГМ) деревьев способно принципиально изменить плантационное лесоводство этой страны. Выращивание ГМ деревьев с более быстрым ростом, улучшенным качеством древесины и устойчивостью к гербицидам, позволит к 2051 году увеличить ВВП страны более чем на 6,5 миллиардов долларов [35].

Необходимо принимать во внимание нормативные и социальные проблемы, связанные с созданием коммерческих плантаций генно-модифицированных деревьев. Главная проблема – это неконтролируемый поток генов от ГМ деревьев в окружающие естественные экосистемы, так как пыльца и семена генно-модифицированных организмов (ГМО) способны распространяться на большие расстояния. Одно из возможных решений проблемы – создание плантаций трансгенных лесных пород с улучшенными свойствами, но не способных образовывать пыльцу и семена [16].

Для покрытосеменных древесных пород к настоящему времени накоплено достаточно много информации о генах, вовлеченных в репродуктивные процессы. Например, показано, что искусственная модификация целого ряда генов цветения у тополя останавливает развитие генеративных органов, но не влияет на вегетативный рост [11, 19]. Отсюда следует, что современные технологии генной инженерии, и особенно новый революционный метод геномного редактирования, требуют изучения в плане возможности их использования для быстрого получения экологически безопасных форм древесных пород с улучшенными признаками.

Необходимо отметить принципиальное отличие генно-модифицированных организмов от организмов с отредактированным геномом. Технология геномного редактирования, которая использует короткие палиндромные кластерные повторы, или CRISPR-Cas9, не предусматривает внедрение в объект чужеродной ДНК

(хотя и не исключает этого). В связи с этим, отредактированные организмы не попадают под ограничения, налагаемые на ГМО, и с этой точки зрения генное редактирование может рассматриваться в качестве эквивалента обычных методов селекции для растений.

Выполненные нами исследования посвящены описанию способов получения стерильных (экологически безопасных) клонов тополей и осины как первого этапа работы по внедрению технологий генного редактирования в лесное хозяйство РФ. В свою очередь, создание коллекции стерильных форм осины послужит исходным материалом для селекции клонов с ценными хозяйственными свойствами.

Гены, отвечающие за цветение

В настоящее время информация о генах, ответственных за цветение, накоплена в основном для видов травянистых растений, особенно модельных объектов, таких как арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*). Сообщается о консервативности структуры и функции этих генов у многочисленных родов и семейств покрытосеменных [31]. К числу генов цветения, в частности, относятся гены, регулирующие переход от вегетативной фазы развития к генеративной и гены идентичности цветковой меристемы, ответственные за формирование пыльцы и семязачатка. При этом консервативность их структуры позволяет относительно легко идентифицировать гомологичные последовательности среди многих видов цветковых, но именно для видов древесных пород известно лишь небольшое число идентифицированных генов цветения [10, 20]. Причина такого отставания – в длительном периоде развития древесного растения, часто продолжительностью в несколько десятков лет, прежде чем дерево вступит в генеративную фазу. Кроме того, опыты по получению трансгенов, а затем выращивание генетически модифицированных деревьев даже для исследовательских целей сопряжено с жесткими законодательными ограничениями.

Поиск в геноме древесных пород генов цветения по гомологии с известными генами у арабидопсиса выглядит как многообещающая стратегия. Однако проблема состоит в том, что гомологи генов цветения у древесных пород часто влияют не только на процесс цветения как таковой, но также оказывают нежелательное воздействие на признаки вегетативной сферы, задерживая рост и развитие [3, 7, 15, 18, 27, 32, 40, 42].

Сообщается, что манипуляции с генами, отвечающими за формирование органов цветка (генами идентичности цветочных органов), мало вероятно что оказывают эффект на вегетативную сферу. Эти гены очень консервативны по причине исключительной важности и специфичности выполняемых ими функций. Так, ген AGAMOUS (AG), кодирующий фактор транскрипции MADS-box, связан с репродуктивной функцией не только у покрытосеменных, но и у голосеменных пород [13]. Но и здесь бывают исключения, например, искусственно подавленная экспрессия гена идентичности цветковой меристемы LEAFY (LFY) у мужских экземпляров тополя может привести к развитию обоеполых или женских цветков [20].

На сегодняшний день известно несколько стратегий получения стерильных растений древесных пород с применением методов генетической трансформации. Одна из них – метод использования тканеспецифичных промоторов для индуцированной экспрессии чужеродных генов, продуцирующих цитотоксины в тканях репродуктивных органов трансгенных деревьев. Для разрушения (абляции) клеток цветочной меристемы используют перенос чужеродного гена BARNASE, кодирующего фермент РНКазу у бактерии *Bacillus amyloliquefaciens*. Продукт гена BARNASE разрушает молекулы РНК в клетках, где данный ген экспрессируется. В результате этого останавливается синтез белка, что приводит к клеточной смерти. В плазмиде, которая используется как вектор для доставки генно-инженерной конструкции в клетки трансформируемого объекта, сразу за укороченной последовательностью гена BARNASE следует последовательность гена BARSTAR, кодирующая естественный ингибитор РНКазы. Вектор сконструирован таким образом для того, чтобы защитить бактериальные клетки *Escherichia coli* или *Agrobacterium* от разрушающей активности этой РНКазы [6]. Экспрес-

сия гена BARNASE осуществляется под контролем тапетум-специфичного промотора в микроспорангиях с целью получения растений с мужской стерильностью [26, 33].

Разработан также протокол получения ГМО для березы (*Betula pendula*) с использованием конструкции BpFULL1::BARNASE. После трансформации такой конструкции ген BARNASE экспрессируется в тканях соцветий под контролем ткане-специфичного промотора гена BpFRUITFULL-LIKE1 (BpFULL1, Bp-MADS5), отвечающего за ранние стадии развития соцветия у березы [21]. Аналогичная работа была выполнена и для гибридов тополей *Populus tremula* × *Populus tremuloides*, где ген BARNASE экспрессировался под контролем тапетум-специфичного TA29 промотора [14]. Примечательно, что хотя стерильные трансгенные тополя и были получены, прирост объема их древесины был на 40 % меньше, чем у контроля. Есть и другие сообщения о том, что из-за цитотоксинов, вырабатываемых после трансформации конструкциями с геном BARNASE, стерильные трансгенные березы замедлялись в росте, кустились и росли гораздо медленнее контроля [21]. Таким образом, использование этой стратегии получения стерильных клонов древесных пород часто сопряжено с нежелательными побочными эффектами.

Еще одна стратегия – метод РНК-интерференции (RNAi) – подразумевает использование двухцепочечной РНК, комплементарной последовательности гена, экспрессию которого требуется подавить [25]. Например, Klocko et al. [19] использовали РНК-интерференцию для подавления экспрессии гена LEAFY (LFY) у тополя белого (*Populus alba*). Этот ген выполняет ключевую функцию в формировании цветка. Соцветия у тополя образуются на конце верхушечного побега за счет того, что верхушечная меристема переключается на формирование тканей цветка, а не вегетативного побега. У арабидопсиса полная потеря функции гена LEAFY ведет к тому, что вместо цветковых меристем закладываются вегетативные структуры. В то же время уменьшение экспрессии этого гена сокращает количество нормально развитых цветков и стимулирует частичное преобразование тканей цветка в листоподобные структуры [28].

Для получения стерильных клонов тополя ген LEAFY был выбран не случайно, так как этот ген очень консервативен по своей структуре, представлен в геноме тополей единственной копией и в вегетативных тканях экспрессируется на самом базовом уровне [36]. «Выключение» гена LEAFY у тополя белого методами классической генетической трансформации (RNAi) приводит к стерильности женских деревьев, не влияя на скорость их роста и развития.

Масштабный эксперимент по созданию плантаций генно-модифицированных тополей был проведен в 2011–2017 гг. в штате Орегон (США) [20]. 3300 генно-модифицированных тополей были высажены на площади 3,6 га и наблюдались в течение 7 лет. Задача исследования заключалась в том, чтобы проанализировать возможные способы получения стерильных мужских и женских деревьев путем подавления экспрессии генов цветения, включая LEAFY, AGAMOUS, APETALA1, SHORT VEGETATIVE PHASE и FLOWERING LOCUS T.

Два женских (717, 6K10) и один мужской клон 535 тополя белого были трансформированы 23 генетическими RNAi конструкциями, нацеленными на получение стерильных растений. Большинство деревьев (95 %) успешно выжили в полевых условиях. Было отмечено, что экологические условия посадок оказывали большее влияние на скорость роста клонов плантаций, нежели сам факт их генетической трансформации. Не у всех ГМ тополей была обнаружена ожидаемая стерильность, которая оставалась стабильной в течение всех пяти сезонов наблюдения. Выявлено, что не во всех случаях подавление функции гена, вовлеченного в процессы цветения у тополей, обязательно сопровождалось появлением стерильных клонов. Для двух генов, LFY и AGAMOUS, эффективность их генной модификации для получения стерильных форм была подтверждена экспериментально.

Ранее были опубликованы результаты эксперимента с использованием системы CRISPR/Cas9, проведенного с целью внести мутации в

последовательность генов идентичности цветковой меристемы у тополя – гена LEAFY (LFY) и двух ортологов AGAMOUS (AG) [42]. Для модельного вида генетики древесных *P. trichocarpa* было установлено удвоение последовательности всего генома, которое, вероятно, произошло примерно 60–65 млн лет назад. В результате почти 8 тысяч генов *P. trichocarpa* представлены в геноме двумя копиями (паралогами) [39]. Таким образом, ген AGAMOUS (AG) также представлен в геноме двумя паралогичными последовательностями, в то время как LEAFY – уникален.

Elorriaga с соавт. [14] сконструировали четыре направляющих (или гидовых) РНК (single guide RNA, sgRNA), чтобы оценить возможности системы CRISPR/Cas9 вносить целевые изменения (мутации) в последовательности генов LFY и AG. Авторы сконструировали шесть плазмид для доставки конструкций в клетки объекта. В результате экспериментов им удалось получить сотни трансгенных событий, в результате которых изменились последовательности генов-мишеней. Таким образом, была установлена высокая эффективность использования CRISPR/Cas9 для нейтрализации генов цветения у тополей и получения стерильных клонов. Эта публикация содержит ценные методические рекомендации, однако в данном исследовании доставка CRISPR/Cas осуществлялась путем *Agrobacterium*-опосредованной генетической трансформации, что переводит полученные отредактированные растения в категорию ГМО.

Размер генома тополя составляет всего около 550 Mb (млн пар оснований) [39], полногеномная сборка доступна для нескольких видов: *P. trichocarpa* [39], *P. euphratica* [23], *P. tremula* [22] и *P. deltoides* [5]. Геномы разных видов *Populus* весьма сходны и коллинеарны [9]. Поэтому для выявления последовательностей ДНК, подходящих в качестве мишени для редактирования с целью получения стерильных форм, в качестве старта можно использовать последовательность гена PLFY у *P. trichocarpa* (GenBank accession number U93196, Potri.015G106900), гомологичного гену LEAFY в геноме *Arabidopsis*, депонированную в БД Phytozome [17].

Метод конструирования гидовых РНК для генов-мишеней при использовании системы CRISPR/Cas9

Дезоксирибонуклеаза Cas9 (CRISPR associated protein 9) – компонент иммунитета бактерий, который обеспечивает их защиту от чужеродной ДНК вирусов и плазмид. Уникальная особенность этого фермента заключается в том, что его специфичность можно программировать с помощью особой crРНК (CRISPR РНК). При этом для каталитической активности нуклеазы Cas9 нужна еще одна РНК – tracrРНК (trans-activating CRISPR РНК), которая частично комплементарна crРНК.

Рибонуклеопротеиновый комплекс Cas9/crРНК/tracrРНК способен распознавать участки ДНК, идентичные 20 нуклеотидам на 5'-конце crРНК. Эти нуклеотиды и составляют целевую последовательность редактируемого гена (или спейсер). При этом важно, чтобы к 5'-концу этой 20-нуклеотидной последовательности (спейсера) непосредственно примыкал так называемый PAM-мотив, распознаваемый Cas нуклеазой (например, CCN, в случае нуклеазы Cas9 бактерии *Streptococcus pyogenes*). Распознав PAM-мотив, белок Cas9 связывается с ним, а затем расщепляет обе цепи ДНК между 3 и 4 нуклеотидом (если считать в направлении 3'-5' от PAM-мотива).

Направляющая РНК состоит из двух компонентов. Первый – консервативный компонент – включает последовательность crРНК (CRISPR РНК), подобную повторяющимся палиндромам в бактериальной клетке, переходящую в последовательность тракрРНК (tracrRNA) – транс-активирующую РНК, необходимую для присоединения Cas9. В современных конструкциях последовательности crРНК и тракрРНК объединены в единую последовательность – sgRNA скаффолд (single guide RNA scaffold). Вторая «часть» направляющей РНК – вариабельная, называемая спейсером, синтезируется комплементарно выбранному участку редактируемого гена и состоит из 17–20 нуклеотидов.

Для дизайна спейсеров существует несколько специализированных программ: CRISPRdirect [29], CRISPR P2 [43], CRISPickr

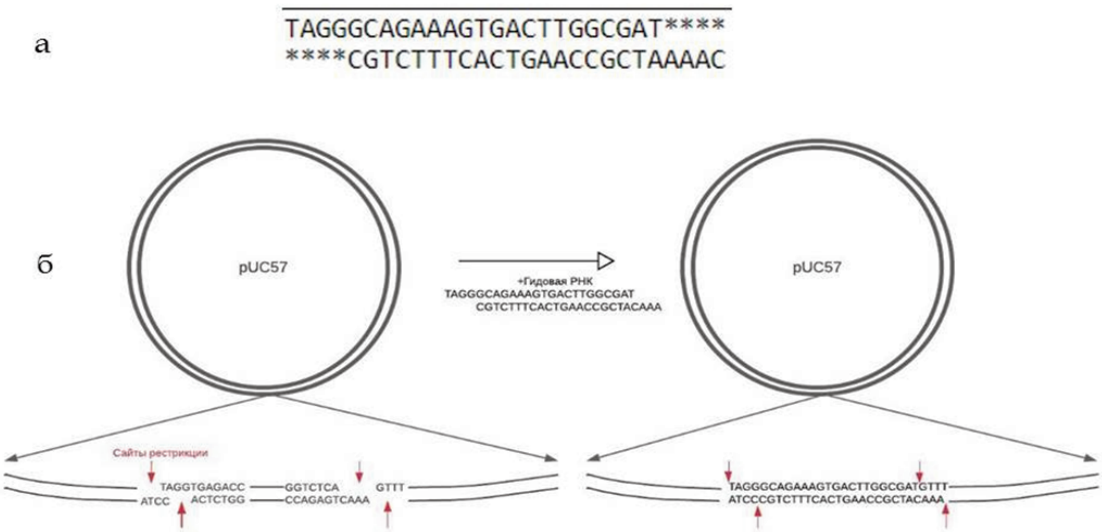
[12], wheatCrispr [4]. Эти онлайн-ресурсы анализируют загружаемую последовательность целевого гена и выбирают на ней наиболее оптимальный участок в 20 нуклеотидов для разрезания конструкцией CRISPR/Cas9.

Есть два основных требования к «подходящему участку» на целевом гене. Во-первых, на его 3'-конце должна быть расположена последовательность NGG (PAM нуклеазы Cas9). При использовании Cas9 потенциальными сайтами-мишенями являются как прямые последовательности [5'-20nt-NGG], так и комплементарные им [5'-CCN-20nt], поскольку они одинаково эффективны для нацеливания на кодирующую или матричную цепь ДНК. Во-вторых, целевая последовательность должна быть специфичной в пределах всего генома, чтобы избежать редактирования вне цели.

Схема биотехнологической конструкции для редактирования методом CRISPR/Cas9

Под биотехнологической конструкцией CRISPR/Cas9 компонентов для редактирования генов осины можно понимать искусственно смоделированную последовательность ДНК, позволяющую синтезировать на ее основе обе части направляющей РНК – консервативную часть (sgRNA скаффолд) и вариабельную часть (спейсер). В таком виде направляющая РНК способна взаимодействовать с белком Cas9, образуя рибонуклеопротеиновый комплекс (РНП), который в клетках объекта может редактировать целевой ген.

Для создания биотехнологической конструкции используются бактериальные векторы, одним из которых является pUC57-sgRNA, сконструированный специально для синтеза направляющей РНК [37] и несущий в себе консервативную часть – sgRNA скаффолд (рис.). Вариабельная часть вставляется в этот вектор с помощью лигирования, а встроенный в вектор T7-промотор запускает синтез направляющей РНК с полученной ДНК-матрицы.



а – образование двухцепочечной направляющей с «липкими» концами из синтезированных последовательностей на примере AG01-F и AG01-R,
б – схема рестрикции вектора pUC57-sgRNA и лигирования в него двухцепочечной направляющей конструкции

Рис. Схема биотехнологической конструкции для синтеза CRISPR/Cas-компонента–гидовой РНК – с использованием вектора pUC57-sgRNA

В результате двухцепочечная последовательность может быть лигирована в этот вектор в строго определенном участке. Вектор pUC57-sgRNA имеет длину 2792 п. н. и сконструирован таким образом, что направляющая встраивается в него между двумя сайтами рестрикции BsaI (между позициями 462 п. н. и 485 п. н.). Непосредственно к месту встраивания с одной стороны прилегает T7-промотор, а с другой – консервативная часть (sgRNA скаффолд). Так создается матрица для синтеза (транскрипции) полной последовательности направляющей (гидовой) РНК, способной взаимодействовать с Cas9.

Методы прямой доставки CRISPR/Cas9 в редактируемый объект

В настоящее время активно используются бесплазмидные, или прямые, методы трансформации клеток. Одним из таких способов является бомбардировка редактируемых объектов микрочастицами нетоксичных металлов – золота или вольфрама – с иммобилизованной на их поверхности ДНК [1]. Метод бомбардировки микрочастицами позволяет трансформировать растения практически любых видов, но имеет относительно низкую эффективность. Данный метод используется в том числе и для создания ГМО, в связи с чем имеется обширная научная база по применению его на растительных объектах.

Метод биолистики также использовался для создания трансгенных тополей [30, 41], что значительно облегчает дальнейшую работу по подбору оптимальных условий биолистики при работе с данным объектом.

Вторым распространенным методом прямой трансформации клеток является PEG-опосредованная трансформация, при которой ДНК внедряется в протопласты путем инфильтрации в среде PEG. Несмотря на то, что данный метод преимущественно используется для анализа экспрессии трансгенных растений, он особо интересен в связи с редактированием тополя, так как ранее опубликованные работы описывают успешное выращивание растений из отдельных протопластов [30, 34].

Заключение

С момента открытия CRISPR/Cas редактирования, данный метод привлекает все большее внимание, охватывая все сферы биотехнологии, не исключая селекцию древесных растений. В исследованиях, связанных с растениями, редактирование оказалось во многом простым, так как опирается на базовые лабораторные методы, однако работ, посвящённых редактированию генома древесных растений, не так много. В основном это связано с длительной ювенильной фазой и необходимостью наблюдений за фенотипическими изменениями, произошедшими в результате редактирования генома. Учитывая специфику развития древесных растений, на это может уйти несколько лет.

Создание стерильных осин с помощью метода CRISPR/Cas, доставленного без участия бактерий, станет значительным шагом в селекции древесных растений, так как полученные образцы послужат базовым объектом для программы улучшений ценных хозяйственных признаков с помощью редактирования, при этом будут обойдены регуляторные ограничения, налагаемые на ГМО, и продемонстрирована принципиальная возможность применения такого вида редактирования у многолетних древесных растений.

Эксперименты по редактированию модельных генов у растений с известным геномом впоследствии могут стать базой для редактирования генов, отвечающих за хозяйственно ценные признаки, такие как содержание лигнина, темпы роста, устойчивость к стрессам и негативным факторам окружающей среды.

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета в рамках государственного задания ФБУ «СПбНИИЛХ» (№ 053-00006-22-00).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Хромов, А.В. Доставка рибонуклеопротеидного комплекса CRISPR/Cas9 в клетки апикальной меристемы для бесплазмидного редактирования генома картофеля *Solanum tuberosum* / А.В. Хромов, А.В. Махотенко, Е.В. Снигирь [и др.]. – DOI: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-0-0 // Биотехнология – 2018. – Т. 34, № 6. – С. 51–58.
2. Al-Ahmad, H. Biotechnology for bioenergy dedicated trees: meeting future energy demands / H. Al-Ahmad. – DOI: 10.1515/znc-2016-0185 // Zeitschrift für Naturforschung C. – 2018. – Vol. 73, № 1–2. – P. 15–32.
3. Azeez, A.A. Tree Ortholog of APETALA1 Mediates Photoperiodic Control of Seasonal Growth / A. Azeez, P. Miskolczi, S. Tylewicz [et al.]. – DOI: 10.1016/j.cub.2014.02.037// Current Biology. – 2014. – Vol. 24, № 7. – P. 717–724.
4. Bae, S. Cas-OFFinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases / S. Bae, J. Park, & J.-S. Kim. – DOI: 10.1093/bioinformatics/btu048 // Bioinformatics – 2014. – Vol. 30. – P. 1473–1475.
5. Bai, S. Genome Assembly of Salicaceae *Populus deltoides* (Eastern Cottonwood) I-69 Based on Nanopore Sequencing and Hi-C Technologies / S. Bai, H. Wu, J. Zhang [et al.]. – DOI: 10.1093/jhered/esab010 // Journal of Heredity. – 2021. – Vol. 112, № 3. – P. 303–310.
6. Beals, T.P. A novel cell ablation strategy blocks tobacco anther dehiscence / T.P. Beals, R.B. Goldberg. – DOI: 10.1105/tpc.9.9.1527 // The Plant Cell. – 1997. – Vol. 9, № 9. – P. 1527–1545.
7. Bielenberg, D.G. Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation / D.G. Bielenberg, Y. (Eileen) Wang, Z.Li,T. Zhebentyayeva [et al.]. – DOI: 10.1105/tpc.9.9.1527 // Tree Genetics & Genomes. – 2008. – Vol. 4, № 3. – P. 495–507.
8. Brazil approves transgenic eucalyptus // Nature Biotechnology. – 2015. – Vol. 33, № 6. – P. 577–577. – DOI: 10.1038/nbt0615-577c.
9. Bruegmann, T. Evaluating the Efficiency of gRNAs in CRISPR/Cas9 Mediated Genome Editing in Poplars / T. Bruegmann, K. Deecke, M. Fladung. – DOI: 10.3390/ijms20153623 // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20, № 15. – P. 3623.
10. Brunner, D. Comparison of four inverse modelling systems applied to the estimation of HFC-125, HFC-134a, and SF 6 emissions over Europe / D. Brunner, T. Arnold, S. Henne [et al.]. – DOI: 10.5194/acp-17-10651-2017 // Atmospheric Chemistry and Physics. – 2017. – Vol. 17, № 17. – P. 10651–10674.
11. Brunner, M.A. Structure and expression of duplicate AGAMOUS orthologues in poplar / A.M. Brunner, W.H. Rottmann, L.A. Sheppard [et al.]. – DOI: 10.1023/a:1026550205851 // Plant Molecular Biology. – 2000. – Vol. 44, № 5. – P. 619–634.
12. Doench, J.G. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9 / J.G. Doench, N. Fusi, M. Sullender [et al.]. – DOI: 10.1038/nbt.3437 // Nature biotechnology – 2016. – Vol. 34 (2). – P. 184–191.
13. Dreni, L. MADS reloaded: evolution of the AGAMOUS subfamily genes / L. Dreni, M.M. Kater. – DOI: 10.1111/nph.12555 // New Phytologist. – 2014. – Vol. 201, № 3. – P. 717–732.
14. Elorriaga, E. A tapetal ablation transgene induces stable male sterility and slows field growth in *Populus* / E. Elorriaga, R. Meilan, C. MaJ [et al.]. – DOI: 10.1007/s11295-014-0781-6 // Tree Genetics & Genomes. – 2014. – Vol. 10, № 6. – P. 1583–1593.
15. Eriksson, S. GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and Arabidopsis floral initiation / S. Eriksson, H. Böhlenius, T. Moritz [et al.]. – DOI:10.1105/tpc.106.042317 // The Plant Cell. – 2006. – Vol. 18, № 9. – P. 2172–2181.

16. Fritsche, S. Strategies for Engineering Reproductive Sterility in Plantation Forests / S. Fritsche, A. L. Klocko, A. Boron [et al.]. – DOI: 10.3389/fpls.2018.01671 // Frontiers in Plant Science. – 2018. – Vol. 9. – P. 1671.

17. Goodstein, D.M. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics / D.M. Goodstein, S. Shu, R. Howson [et al.]. – DOI: 10.1093/nar/gkr944 // Nucleic Acids Research. – 2012. – Vol. 40. – P. 1178–1186.

18. Hoenicka, H. Heterologous overexpression of the birch FRUITFULL-like MADS-box gene BpMADS4 prevents normal senescence and winter dormancy in *Populus tremula* L. / H. Hoenicka, O. Nowitzki, D. Hanelt [et al.]. – DOI: 10.1007/s00425-007-0674-0 // Planta. – 2008. – Vol. 227, № 5. – P. 1001–1011.

19. Klocko, A.L. Containment of transgenic trees by suppression of LEAFY / A.L. Klocko, A.M. Brunner, J. Huang [et al.]. – DOI: 10.1038/nbt.3636 // Nature Biotechnology. – 2016. – Vol. 34, № 9. – P. 918–922.

20. Klocko, A.L. Phenotypic Expression and Stability in a Large-Scale Field Study of Genetically Engineered Poplars Containing Sexual Containment Transgenes / A.L. Klocko, H. Lu, A. Magnuson [et al.]. – DOI: 10.3389/fbioe.2018.00100 // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2018. – Vol. 6. – P. 100.

21. Lännenpää, M. Prevention of flower development in birch and other plants using a BpFULL1::BARNASE construct / M. Lännenpää, M. Hassinen, A. Ranki [et al.]. – DOI: 10.1007/s00299-004-0903-y // Plant Cell Reports. – 2005. – Vol. 24, № 2. – P. 69–78.

22. Lin, Y.-C. Functional and evolutionary genomic inferences in *Populus* through genome and population sequencing of American and European aspen / Y.-C. Lin, J. Wang, N. Delhomme [et al.]. – DOI: 10.1073/pnas.1801437115 // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – Vol. 115, № 46. – P. E10970–E10978.

23 .Ma, T. Genomic insights into salt adaptation in a desert poplar / T. Ma, J. Wang, G. Zhou [et al.]. – DOI: 10.1038/ncomms3797 // Nature Communications. – 2013. – Vol. 4, № 1. – P. 2797.

24. MacDicken, K.G. Global Forest Resources Assessment 2015: What, why and how? / K.G. MacDicken. – DOI: 10.1016/j.foreco.2015.02.006 // Forest Ecology and Management. – 2015. – Vol. 352. – P. 3–8.

25. Mansoor, S. Engineering novel traits in plants through RNA interference / S. Mansoor, I. Amin, M. Hussain [et al.]. – DOI: 10.1016/j.tplants.2006.09.010 // Trends in Plant Science. – 2006. – Vol. 11, № 11. – P. 559–565.

26. Mariani, C. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene / C. Mariani, M. De Beuckeleer [et al.]. – DOI: 10.1038/347737a0 // Nature. – 1990. – Vol. 347, № 6295. – P. 737–741.

27. Mohamed, R. *Populus* CEN/TFL1 regulates first onset of flowering, axillary meristem identity and dormancy release in *Populus*: CEN/TFL1 regulates tree flowering and dormancy / R. Mohamed, C.-T. Wang, C. Ma [et al.]. – DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04185.x // The Plant Journal. – 2010. – Vol. 62, № 4. – P. 674–688.

28. Monniaux, M. Conservation vs divergence in LEAFY and APETALA1 functions between *Arabidopsis thaliana* and *Cardamine hirsuta* / M. Monniaux, S.M. McKim, M. Cartolano [et al.]. – DOI: 10.1111/nph.14419 // New Phytologist. – 2017. – Vol. 216, № 2. – P. 549–561.

29. Naito, Y. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites / Y. Naito, K. Hino, H. Bono [et al.]. – DOI: 10.1093/bioinformatics/btu743 // Bioinformatics. – 2015. – Vol. 31, № 7. – P. 1120–1123.

30. Nietsch, J. Old methods rediscovered: application and improvement of two direct transformation methods to hybrid poplar (*Populus tremula* × *P. alba*) / J. Nietsch, T. Brügmann, D. Becker [et al.]. – DOI: 10.1007/s11240-017-1214-7 // Plant Cell, Tissue Organ Culture – 2017. – Vol. 130. – P. 183–196.

31. Pajoro, A. The (r)evolution of gene regulatory networks controlling Arabidopsis plant reproduction: a two-decade history / A. Pajoro, S. Biewers, E. Dougali [et al.]. – DOI: 10.1093/jxb/eru233 // Journal of Experimental Botany. – 2014. – Vol. 65, № 17. – P. 4731–4745.

32. Parmentier-Line, C.M. Constitutive expression of the Poplar FD-like basic leucine zipper transcription factor alters growth and bud development / C.M. Parmentier-Line, G.D. Coleman. – DOI: 10.1111/pbi.12380 // Plant Biotechnology Journal. – 2016. – Vol. 14, № 1. – P. 260–270.

33. Paul, W. The isolation and characterization of the tapetum-specific *Arabidopsis thaliana* A9 gene / W. Paul, R. Hodge, S. Smartt, J. Draper, R. Scott. – DOI: 10.1007/BF00026787 // Plant Molecular Biology. – 1992. – Vol. 19, № 4. – P. 611–622.

34. Qiao, J. Efficient plantlet regeneration from protoplasts isolated from suspension cultures of poplar (Populus alba L.) / J. Qiao, H. Kuroda, T. Hayashi [et al.]. – DOI: 10.1007/s002990050378 // Plant Cell Reports. – 1998. – Vol. 17. – P. 201–205.

35. Research with an impact // Scion. – URL: https://www.scionresearch.com/about-us/about-scion/corporate-publications/scion-connections/past-issues-list/issue-22,-december-2016/research-with-an-impact2

36. Rottmann, W.H. Diverse effects of overexpression of LEAFY and PTLF, a poplar (*Populus*) homolog of LEAFY/FLORICAULA, in transgenic poplar and *Arabidopsis* / W.H. Rottmann, R. Meilan, L.A. Sheppard [et al.]. – DOI: 10.1046/j.1365-313x.2000.00734.x // The Plant Journal. – 2000. – Vol. 22, № 3. – P. 235–245.

37. Shen, B. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects / B. Shen, W. Zhang, J. Zhang [et al.]. – DOI: 10.1038/nmeth.2857 // Nature Methods. – 2014. – Vol. 11, № 4. – P. 399–402.

38. Sweeney, O. A future for native forests means leisure, not logging / O. Sweeney // Nature New South Wales. – 2015. – Vol. 59, № 3. – P. 5–7.

39. Tuskan, G.A. The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) / G.A. Tuskan, S. Difazio, S. Jansson [et al.]. – DOI: 10.1126/science.1128691 // Science. – 2006. – Vol. 313, № 5793. – P. 1596–1604.

40. Tylewicz, S. Dual role of tree florigen activation complex component FD in photoperiodic growth control and adaptive response pathways / S. Tylewicz, H. Tsuji, P. Miskolczi [et al.]. – DOI: 10.1073/pnas.1423440112 // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – Vol. 112, № 10. – P. 3140–3145.

41. Wang, J. Multiple transgenes *Populus xeuramericana* ‘Guariento’ plants obtained by biolistic bombardment / J. Wang, X. Su, L. Ji [et al.]. – DOI: org/10.1007/s11434-007-0034-2 // Chinese Science Bulletin. – 2007. – Vol. 52. – P. 224–230.

42. Xu, M. Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction in *Populus* / M. Xu, B. Zhang, X. Su [et al.]. – DOI: 10.1016/j.ab.2010.08.044 // Analytical Biochemistry. – 2011. – Vol. 408, № 2. – P. 337–339.

43. Lei, Y. CRISPR-P: A web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants / Y. Lei, L. Lu, H.-Y. Liu [et al.]. – DOI: 10.1093/mp/ssu044 // Molecular Plant. – 2014. – Vol. 7, № 9. – P. 1494–1496.

REFERENCES

1. Hromov A.V., Mahotenko A.V., Snigir’ E.V., Makarova S.S., Makarov V.V., Suprunova T.P., Miroshnichenko D.N., Kalinina N.O., Dolgov S.V., Tal’yanskij M.E. Dostavka ribonukleoproteidnogo kompleksa CRISPR/Cas9 v kletki apikal’noj meristemy dlya besplazmidnogo redaktirovaniya genoma kartofelya *Solanum tuberosum*. DOI: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-0-0. *Biotekhnologiya*, 2018, vol. 34, no. 6, pp. 51–58. (In Russian)

2. Al-Ahmad H. Biotechnology for bioenergy dedicated trees: meeting future energy demands. DOI: 10.1515/znc-2016-0185. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2018, vol. 73, no. 1–2, pp. 15–32.

3. Azeez A.A., Miskolczi P., Tylewicz S., Bhalerao R.P. Tree Ortholog of APETALA1 Mediates Photoperiodic Control of Seasonal Growth. DOI: 10.1016/j.cub.2014.02.037. *Current Biology*, 2014, vol. 24, no. 7, pp. 717–724.

4. Bae S., Park J., Kim J.-S. Cas-OFFinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu048. *Bioinformatics*, 2014, vol. 30, pp. 1473–1475.

5. Bai S., Wu H., Zhang J., Pan Z., Zhao W., Li Z., Tong C. Genome Assembly of Salicaceae *Populus deltoides* (Eastern Cottonwood) I-69 Based on Nanopore Sequencing and Hi-C Technologies. DOI: 10.1093/jhered/esab010. *Journal of Heredity*, 2021, vol. 112, no. 3, pp. 303–310.

6. Beals T.P, Goldberg R.B. A novel cell ablation strategy blocks tobacco anther dehiscence. DOI: 10.1105/tpc.9.9.1527. *The Plant Cell*, 1997, vol. 9, no. 9, pp. 1527–1545.

7. Bielenberg D.G., (Eileen) Wang Y., Li Z., Zhebentyayeva T., Fan S., Reighard R. Scorza G.L., Abbott A.G. Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. DOI: 10.1105/tpc.9.9.1527. *Tree Genetics & Genomes*, 2008, vol. 4, no. 3, pp. 495–507.

8. Brazil approves transgenic eucalyptus. DOI: 10.1038/nbt0615-577c. *Nature Biotechnology*, 2015, vol. 33, no. 6, pp. 577–577.

9. Bruegmann T., Deecke K., Fladung M. Evaluating the Efficiency of gRNAs in CRISPR/Cas9 Mediated Genome Editing in Poplars. DOI: 10.3390/ijms20153623. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, vol. 20, no. 15, pp. 3623.

10. Brunner D., Arnold T., Henne S., Manning A., Thompson R.L., Maione M., O'Doherty S., Reimann S. Comparison of four inverse modelling systems applied to the estimation of HFC-125, HFC-134a, and SF 6 emissions over Europe. DOI: 10.5194/acp-17-10651-2017. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2017, vol. 17, no. 17, pp. 10651–10674.

11. Brunner A.M., Rottmann W.H., Sheppard L.A., Krutovskii K., DiFazio S.P., Leonardi S., Strauss S.H. Structure and expression of duplicate AGAMOUS orthologues in poplar. DOI: 10.1023/a:1026550205851. *Plant Molecular Biology*, 2000, vol. 44, no. 5, pp. 619–634.

12. Doench J.G, Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E.W., Donovan K.F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H.W., Listgarten J., Root D.E. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. DOI: 10.1038/nbt.3437. *Nature biotechnology*, 2016, vol. 34 (2), pp. 184–191.

13. Dreni L., Kater M.M. MADS reloaded: evolution of the AGAMOUS subfamily genes. DOI: 10.1111/nph.12555. *New Phytologist*, 2014, vol. 201, no. 3, pp. 717–732.

14. Elorriaga E., Meilan R., Ma C., Skinner J.S., Etherington E., Brunner A., Strauss S.H. A tapetal ablation transgene induces stable male sterility and slows field growth in Populus. DOI: 10.1007/s11295-014-0781-6. *Tree Genetics & Genomes*, 2014, vol. 10, no. 6, pp. 1583–1593.

15. Eriksson S., Böhlenius H., Moritz T., Nilsson O. GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and Arabidopsis floral initiation. DOI:10.1105/tpc.106.042317. *The Plant Cell*, 2006, vol. 18, no. 9, pp. 2172–2181.

16. Fritsche S., Klocko A.L., Boron A., Brunner A.M., Thorlby G. Strategies for Engineering Reproductive Sterility in Plantation Forests. DOI: 10.3389/fpls.2018.01671. *Frontiers in Plant Science*, 2018, vol. 9, p. 1671.

17. Goodstein D.M., Shu S., Howson R., Neupane R., Hayes R.D., Fazo J., Mitros T., Dirks W., Hellsten U., Putnam N., Rokhsar D.S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. DOI: 10.1093/nar/gkr944. *Nucleic Acids Research*, 2012, vol. 40, pp. 1178–1186.

18. Hoenicka H., Nowitzki O., Hanelt D., Fladung M. Heterologous overexpression of the birch FRUITFULL-like MADS-box gene BpMADS4 prevents normal senescence and winter dormancy in *Populus tremula* L. DOI: 10.1007/s00425-007-0674-0. *Planta*, 2008, vol. 227, no. 5. pp. 1001–1011.

19. Klocko A.L., Brunner A.M., Huang J., Meilan R., Lu H., Ma C., Morel A., Zhao D., Ault K., Dow M., Howe G., Shevchenko O. Strauss S.H. Containment of transgenic trees by suppression of LEAFY. DOI: 10.1038/nbt.3636. *Nature Biotechnology*, 2016, vol. 34, no. 9, pp. 918–922.

20. Klocko A.L., Lu H., Magnuson A., Brunner A.M., Ma C., Strauss S.H. Phenotypic Expression and Stability in a Large-Scale Field Study of Genetically Engineered Poplars Containing Sexual Containment Transgenes. DOI: 10.3389/fbioe.2018.00100. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2018, vol. 6, p. 100.

21. Lännenpää M., Hassinen M., Ranki A., Hölttä-Vuori M., Lemmetyinen J., Keinonen K., Sopanen T. Prevention of flower development in birch and other plants using a BpFULL1::BARNASE construct. DOI: 10.1007/s00299-004-0903-y. *Plant Cell Reports*, 2005, vol. 24, no. 2, pp. 69–78.

22. Lin Y.-C., Wang J., Delhomme N., Schiffthaler B., Sundström G., Zuccolo A., Nystedt B., Hvidsten T.R., de la Torre A., Cossu R.M., Hoeppner M.P., Lantz H., Scofield D.G., Zamani N., Johansson A., Mannapperuma C., Robinson K.M., Mähler N., Leitch I.J., Pellicer J., Park E.-J., Montagu M.V., de Peer Y.V., Grabherr M., Jansson S., Ingvarsson P.K., Street N.R. Functional and evolutionary genomic inferences in *Populus* through genome and population sequencing of American and European aspen. DOI: 10.1073/pnas.1801437115. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, vol. 115, no. 46, pp. E10970–E10978.

23. Ma T., Wang J., Zhou G., Yue Z., Hu Q., Chen Y., Liu B., Qiu Q., Wang Z., Zhang J., Wang K., Jiang D., Gou C., Yu L., Zhan D., Zhou R., Luo W., Ma H., Yang Y., Pan S., Fang D., Luo Y., Wang X., Wang G., Wang J., Wang Q., Lu X., Chen Z., Liu J., Lu Y., Yin Y., Yang H., Abbott R.J., Wu Y., Wan D., Li J., Yin T., Lascoux M., DiFazio S.P., Tuskan G.A., Wang J., Liu J. Genomic insights into salt adaptation in a desert poplar. DOI: 10.1038/ncomms3797. *Nature Communications*, 2013, vol. 4, no. 1, pp. 2797.

24. MacDicken, K.G. Global Forest Resources Assessment 2015: What, why and how? DOI: 10.1016/j.foreco.2015.02.006. *Forest Ecology and Management*, 2015, vol. 352, pp. 3–8.

25. Mansoor S., Amin I., Hussain M., Zafar Y., Briddon R.W. Engineering novel traits in plants through RNA interference. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.09.010. *Trends in Plant Science*, 2006, vol. 11, no. 11, pp. 559–565.

26. Mariani C., De Beuckeleer M., Truettner J., Leemans J., Goldberg R.B. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. DOI: 10.1038/347737a0. *Nature*, 1990, vol. 347, no. 6295, pp. 737–741.

27. Mohamed R., Wang C.-T., Ma C., Shevchenko O., Dye S.J., Puzey J.R., Etherington E., Sheng X., Meilan R., Strauss S.H., Brunner A.M. Populus CEN/TFL1 regulates first onset of flowering, axillary meristem identity and dormancy release in *Populus*: CEN/TFL1 regulates tree flowering and dormancy. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04185.x. *The Plant Journal*, 2010, vol. 62, no. 4, pp. 674–688.

28. Monniaux M., McKim S.M., Cartolano M., Thevenon E., Parcy F., Tsiantis M., Hay A. Conservation vs divergence in LEAFY and APETALA1 functions between *Arabidopsis thaliana* and *Cardamine hirsuta*. DOI: 10.1111/nph.14419. *New Phytologist*, 2017, vol. 216, no. 2, pp. 549–561.

29. Naito Y., Hino K., Bono H., Ui-Te K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu743. *Bioinformatics*, 2015, vol. 31, no. 7. pp. 1120–1123.

30. Nietsch J., Brügmann T., Becker D. Fladung M. Old methods rediscovered: application and improvement of two direct transformation methods to hybrid poplar (*Populus tremula* × *P. alba*). DOI: 10.1007/s11240-017-1214-7. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 2017, vol. 130, pp. 183–196.

31. Pajoro A., Biewers S., Dougali E., Valentim F.L., Mendes M.A., Porri A., Coupland G., Van de Peer Y., van Dijk A.D.J., Colombo L., Davies B., Angenent G.C. The (r)evolution of gene regulatory networks controlling *Arabidopsis* plant reproduction: a two-decade history. DOI: 10.1093/jxb/eru233. *Journal of Experimental Botany*, 2014, vol. 65, no. 17, pp. 4731–4745.

32. Parmentier-Line C.M., Coleman G.D. Constitutive expression of the Poplar FD-like basic leucine zipper transcription factor alters growth and bud development. DOI: 10.1111/pbi.12380. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, vol. 14, no. 1, pp. 260–270.

33. Paul W., Hodge R., Smartt S., Draper J., Scott R. The isolation and characterization of the tapetum-specific *Arabidopsis thaliana* A9 gene. DOI: 10.1007/BF00026787. *Plant Molecular Biology*, 1992, vol. 19, no. 4, pp. 611–622.

34. Qiao J., Kuroda H., Hayashi T. Sakai F. Efficient plantlet regeneration from protoplasts isolated from suspension cultures of poplar (*Populus alba* L.). DOI: 10.1007/s002990050378. *Plant Cell Reports*, 1998, vol. 17, pp. 201–205.

35. Research with an impact. *Scion*. URL: https://www.scionresearch.com/about-us/about-scion/corporate-publications/scion-connections/past-issues-list/issue-22,-december-2016/research-with-an-impact2.

36. Rottmann W.H., Meilan R., Sheppard L.A., Brunner A.M., Skinner J.S., Ma C., Cheng S., Jouanin L., Pilate G., Strauss S.H. Diverse effects of overexpression of LEAFY and PTLF, a poplar (*Populus*) homolog of LEAFY/FLORICAULA, in transgenic poplar and Arabidopsis. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2000.00734.x. *The Plant Journa*l, 2000, vol. 22, no. 3, pp. 235–245.

37. Shen B., Zhang W., Zhang J., Zhou J., Wang J., Chen L., Wang L., Hodgkins A., Iyer V., Huang X., Skarnes W.C. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. DOI: 10.1038/nmeth.2857. *Nature Methods*, 2014, vol. 11, no. 4, pp. 399–402.

38. Sweeney O. A future for native forests means leisure, not logging. *Nature New South Wales*, 2015, vol. 59, no. 3, pp. 5–7.

39. Tuskan G.A., Difazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., Schein J., Sterck L., Aerts A., Bhalerao R.R., Bhalerao R.P., Blaudez D., Boerjan W., Brun A., Brunner A., Busov V., Campbell M., Carlson J., Chalot M., Chapman J., Chen G-L., Cooper D., Coutinho P.M., Couturier J., Covert S., Cronk Q., Cunningham R., Davis J., Degroeve S., Déjardin A., Depamphilis C., Detter J., Dirks B., Dubchak I., Duplessis S., Ehlting J., Ellis B., Gendler K., Goodstein D., Gribskov M., Grimwood J., Groover A., Gunter L., Hamberger B., Heinze B., Helariutta Y., Henrissat B., Holligan D., Holt R., Huang W., Islam-Faridi N., Jones S., Jones-Rhoades M., Jorgensen R., Joshi C., Kangasjärvi J., Karlsson J., Kelleher C., Kirkpatrick R., Kirst M., Kohler A., Kalluri U., Larimer F., Leebens-Mack J., Leplé J-C., Locascio P., Lou Y., Lucas S., Martin F., Montanini B., Napoli C., Nelson D.R., Nelson C., Nieminen K., Nilsson O., Pereda V., Peter G., Philippe R., Pilate G., Poliakov A., Razumovskaya J., Richardson P., Rinaldi C., Ritland K., Rouzé P., Ryaboy D., Schmutz J., Schrader J., Segerman B., Shin H., Siddiqui A., Sterky F., Terry A., Tsai C-J., Uberbacher E., Unneberg P., Vahala J., Wall K., Wessler S., Yang G., Yin T., Douglas C., Marra M., Sandberg G., Van de Peer Y., Rokhsar D. The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). DOI: 10.1126/science.1128691. *Science*, 2006, vol. 313, no. 5793, pp. 1596–1604.

40. Tylewicz S., Tsuji H., Miskolczi P., Petterle A., Azeez A., Jonsson K., Shimamoto K., Bhalerao R.P. Dual role of tree florigen activation complex component FD in photoperiodic growth control and adaptive response pathways. DOI: 10.1073/pnas.1423440112. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, vol. 112, no. 10, pp. 3140–3145.

41. Wang J., Su X., Ji L., Zhang B., Hu Z., Huang R., Tian Y. Multiple transgenes *Populus xeuramericana* ‘Guariento’ plants obtained by biolistic bombardment. DOI: 10.1007/s11434-007-0034-2. *Chinese Science Bulletin*, 2007, vol. 52, pp. 224–230.

42. Xu M., Zhang B., Su X., Zhang S., Huang M. Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction in *Populus*. DOI: 10.1016/j.ab.2010.08.044. *Analytical Biochemistry*, 2011, vol. 408, no. 2, pp. 337–339.

43. Lei Y., Lu L., Liu H.-Y., Li S., Xing F., Chen L.-L. CRISPR-P: A web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. DOI: 10.1093/mp/ssu044. *Molecular Plant*, 2014, vol. 7, no. 9, pp. 1494-1496.

Статья поступила в редакцию 6.12.2022