

TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM ESPÉCIES FLORESTAIS

GENETIC TRANSFORMATION OF FOREST SPECIES

Claudia Studart-Guimarães¹ Cristiano Lacorte¹ Ana Cristina Miranda Brasileiro²

RESUMO

A transformação genética, que compreende a introdução de genes exógenos de forma controlada no genoma de uma célula vegetal e posterior regeneração da planta transgênica, tem contribuído com os programas de melhoramento genético de plantas pela obtenção de genótipos com novas características de interesse. O melhoramento de espécies florestais é limitado por características intrínsecas a tais espécies, como a altura dos indivíduos e o ciclo longo de vida. A transformação genética constitui, portanto, uma alternativa para a obtenção de espécies florestais com características desejáveis em um menor espaço de tempo. Plantas transgênicas com resistência a determinadas pragas, com melhor qualidade de madeira, maior produção de biomassa, tolerância a herbicidas, entre outras características de interesse, já foram obtidas para diferentes espécies florestais de importância econômica como álamo, eucalipto e pinheiros em geral. Este trabalho mostra a importância da transformação genética, associada a outras técnicas biotecnológicas no melhoramento de espécies florestais, as técnicas de transformação mais utilizadas e as características que já foram introduzidas nessas espécies pela transformação.

Palavras-chave: biotecnologia, melhoramento.

ABSTRACT

Breeding of forest species is limited by intrinsic characteristics such as individual's height and long life cycle. Plant genetic transformation, the integration of known foreign genes into the plant genome, represents a less time consuming alternative for the recovery of forest species with desirable traits. This technology has contributed to plant breeding programs by facilitating the recovery of genotypes containing novel exciting traits of agricultural importance. Many of them including resistance to insect pests, improvement of wood quality and biomass production, and tolerance to herbicides have been introduced in forest species such as poplar, eucalyptus and pine trees using this technology. This review highlights current transformation methods, and illustrates the importance of finally defining the most important traits that have already been introduced into these valuable species.

Key words: biotechnology, plant improvement.

INTRODUÇÃO

As espécies florestais são de grande importância para a economia, porque oferecem uma ampla gama de produtos, como madeira para construção, biomassa para a produção de polpa de celulose e de papel e para fonte de energia industrial, assim como uma série de subprodutos para a indústria de cosméticos, farmacêutica, alimentícia etc. No Brasil, as plantações florestais são compostas sobretudo por espécies, híbridos e clones de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e de pinheiro (*Pinus* spp.) cuja área plantada é de 4,8 milhões de hectares, em especial nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina (Mora e Garcia, 2000). Dessas plantações, cerca de 2/3 correspondem a plantações de eucalipto e o restante de pinheiro. O setor florestal realiza atualmente plantios na ordem de 105 mil ha/ano, contribuindo no âmbito social oferecendo empregos diretos (500 mil) e indiretos (2 milhões); no âmbito ambiental, preservando as matas nativas e realizando programas de reflorestamento, e no âmbito econômico, gerando receitas da ordem de US\$ 13 bilhões, contribuindo, em 1998, com US\$ 1,5 bilhão em impostos, e participando com 4 % no PBI nacional (Mora e Garcia, 2000).

Por tais razões, espécies florestais vêm sendo selecionadas ao longo do tempo pelos programas de melhoramento, para a obtenção de genótipos mais produtivos, com melhores características florestais,

1. Biólogo, Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Transferência de Genes, Parque Estação Biológica – PqEB, CEP 70849-970, Brasília (DF).
2. Engenheira Florestal, Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Transferência de Genes, Parque Estação Biológica – PqEB, CEP 70849-970, Brasília (DF). anacmb@cenargen.embrapa.br

Recebido para publicação em 22/11/2001 e aceito em 22/01/2003.

melhor adaptadas a diferentes condições edafoclimáticas e com resistência a estresses bióticos e abióticos. Entretanto, os programas de melhoramento genético de espécies florestais são dificultados pela altura dos indivíduos que implica na dificuldade de manter controle sobre processos de polinização e fecundação, pela complexidade da análise dos descendentes após os cruzamentos e retrocruzamentos, e pela necessidade de uma grande área de plantio experimental (Tzfira *et al.*, 1998). O longo ciclo de vida necessário para atingir a maturidade reprodutiva e fenotípica é apontado como o principal fator limitante no melhoramento. Também são considerados obstáculos para a aplicação de programas de melhoramento, em espécies florestais, o restrito conhecimento dos mapas genéticos da maioria dessas espécies, e a dificuldade de identificar parentais adequados para os cruzamentos (Dandekar *et al.*, 1993).

Tendo em vista os problemas inerentes ao melhoramento genético de espécies florestais, a transformação genética é uma ferramenta de grande potencial para essas espécies. A transformação baseia-se na transferência de material genético (DNA) para uma célula vegetal-alvo, de tal forma que este é incorporado e expresso de forma estável no seu genoma (Brasileiro e Dusí, 1999). A posterior regeneração *in vitro* dessa célula inicialmente transformada irá gerar uma planta transgênica contendo essa nova informação genética. Assim, a transformação é uma técnica que pode auxiliar em programas de melhoramento genético pela introdução de uma nova característica ou a alteração de uma preexistente, em cultivares ou genótipos já melhorados, sem modificar a estrutura genética global da planta. Plantas transgênicas são também importantes ferramentas para estudos moleculares de função e expressão de genes, de processos fisiológicos e de desenvolvimento vegetal (Hansen e Wright, 1999).

Atualmente, existem aproximadamente 252 testes em campo com plantas lenhosas transgênicas, envolvendo, pelo menos, 24 espécies vegetais em 17 países (Rautner, 2001). Esse levantamento, realizado de 1988 a 2001, inclui tanto espécies frutíferas como florestais, sendo que 76% das espécies pertencem a essa última categoria. Os principais países onde tais testes estão sendo conduzidos são: Estados Unidos, França, Indonésia, Itália, Reino Unido, Chile, África do Sul, Nova Zelândia e China (Owusu, 1999). A maioria dos testes está sendo realizado com espécies e híbridos de álamo (*Populus* spp. – 143 testes), de pinheiro (*Pinus* spp.) e de noqueira (*Juglans* spp. – 15 testes cada) e de eucalipto (*Eucalyptus* spp. – 12 testes). Apesar do grande número desses testes, até o momento, nenhuma espécie florestal transgênica foi liberada no mundo para plantio comercial. No Brasil, testes em campo com plantas transgênicas de eucalipto contendo gene de tolerância a herbicida estão sendo conduzidos nos estados de Minas Gerais e São Paulo.

Métodos de transformação genética

Os métodos de transformação genética de plantas estão associados a técnicas *in vitro* de cultura de tecidos, isto é, a regeneração de plantas inteiras com base em células transformadas. Em muitas espécies vegetais, essa etapa é limitante na obtenção de plantas transgênicas em razão das dificuldades intrínsecas ao processo de regeneração.

As técnicas de transformação genética são divididas em duas categorias: o método indireto, usando como vetor intermediário a bactéria *Agrobacterium*, e os métodos diretos, os quais dispensam vetores intermediários.

Método indireto de transformação de plantas via *Agrobacterium*

O sistema de transferência de DNA *Agrobacterium*-planta é largamente utilizado para a obtenção de plantas transgênicas, já que se trata de um sistema simples, eficiente e relativamente barato (Stafford, 2000). A utilização de *Agrobacterium* baseia-se na sua capacidade de transferir, para o genoma da célula-alvo vegetal, uma região específica denominada T-DNA (*transferred DNA*), contida no plasmídeo Ti (*tumor inducing*) (Brasileiro e Lacorte, 2000; Tzafira e Citovsky, 2000; Zupan *et al.*, 2000). O T-DNA é delimitado por seqüências repetidas de 25 pb (extremidades esquerda e direita), as quais são reconhecidas por endonucleases específicas codificadas partindo de genes presentes em outra região do plasmídeo Ti, denominada região de virulência (ou região *vir*). A expressão dos genes da região *vir* é induzida por compostos fenólicos e monossacarídeos liberados pelas células da planta em resposta a um ferimento. Em experimentos de transformação genética, as linhagens de *Agrobacterium* utilizadas apresentam um T-DNA

“desarmado”, onde os genes originais são deletados e substituídos por gene(s) que se deseja introduzir na planta.

O pré-requisito para a utilização desse método é a susceptibilidade da espécie vegetal à infecção por *Agrobacterium*, a qual envolve várias etapas. Inicialmente, as bactérias no solo são atraídas por quimiotactismo em resposta a algum ferimento na planta. Uma vez em contato, as bactérias se fixam à célula vegetal. A seguir, ocorre o processo de transferência do T-DNA e, finalmente, a integração do T-DNA no genoma da célula vegetal (Gelvin, 2000). Para a obtenção de uma planta transgênica, todas essas etapas são conduzidas em condições *in vitro*, sendo que o material vegetal a ser transformado, denominado explantes (pedaços de folhas, entrenós, estaminóides, raízes, entre outros) é mantido em contato com a suspensão de uma linhagem desarmada de *Agrobacterium*, contendo em um vetor os genes de interesse a serem introduzidos (Brasileiro, 1998). Após várias etapas de cultura *in vitro*, as plantas transgênicas obtidas são transferidas para casa de vegetação onde vários ensaios moleculares e bioquímicos deverão ser realizados.

A primeira espécie florestal transformada via *Agrobacterium* foi o híbrido de álamo *Populus alba* x *Populus grandidentata* por Fillatti *et al.* (1987) e, desde então, numerosos protocolos vêm sendo estabelecidos e otimizados para espécies e híbridos do gênero *Populus* (De Block, 1990; Confalonieri *et al.*, 1995; 1997; 2000; Tzfira *et al.*, 1996; 1997; Han *et al.*, 2000; Rishi *et al.*, 2001). Outras florestais de importância também já foram transformadas por esse método, como *Larix decidua* (Huang *et al.*, 1991), *Juglans regia* (McGranahan *et al.*, 1988), *Azadirachta indica* (Naina *et al.*, 1989) e *Allocasuarina verticillata* (Phelep *et al.*, 1991). Mais recentemente, protocolos de transformação via *Agrobacterium* foram também estabelecidos para coníferas como *Picea abies*, *Pinus taeda*, *Pinus strobus* e *Pinus nigra* (Levee *et al.*, 1999; Wenck *et al.*, 1999; López *et al.*, 2000). A transformação de um dos gêneros de florestais mais importantes, *Eucalyptus*, foi conseguido via *Agrobacterium* para *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus globulus* (Ho *et al.*, 1998; Moralejo *et al.*, 1998; Harcourt *et al.*, 2000), e para o híbrido *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (Gonzales *et al.*, 2002).

Métodos diretos de transformação de plantas

Os métodos diretos de transformação baseiam-se na transferência de DNA para as células-alvo por meios físicos ou químicos (Newell, 2000). O mais utilizado atualmente é o do bombardeamento de partículas, que consiste na aceleração do DNA aderido a partículas de ouro ou tungstênio para dentro da célula (Klein *et al.*, 1987; Sanford *et al.*, 1987). Uma onda de choque causada pela liberação de uma alta pressão do gás hélio, faz com que as partículas penetrem a parede e a membrana celular, de forma não-letal à célula. A seguir, o DNA é dissociado das partículas e integrado aleatoriamente no genoma nuclear. Esse método de transformação tem a vantagem de ser utilizável de forma independente da espécie vegetal a ser transformada, ao contrário do que acontece com a transformação mediada por *Agrobacterium*, já que não há a necessidade da susceptibilidade da espécie vegetal. Outra vantagem é que a técnica de bombardeamento permite a obtenção de plantas transgênicas com base em qualquer tecido vegetal, dependendo somente de sua capacidade de regeneração *in vitro* (Rech e Aragão, 1998).

Essas vantagens foram bem exploradas em espécies florestais. Em 1993, foi descrita a primeira metodologia para obter coníferas transgênicas da espécie *Picea glauca* por bombardeamento (Ellis *et al.*, 1993). Em 1998, foi publicado o primeiro trabalho de transformação para o gênero *Pinus*, pelo bombardeamento de culturas embriogênicas de *Pinus radiata* (Walter *et al.*, 1998). Essa mesma técnica foi também utilizada para obtenção de plantas transgênicas de *Picea mariana* (Charest *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 2000), *Larix laricina* (Klimaszewska *et al.*, 1997), *Picea abies* (Walter *et al.*, 1999; Clapham *et al.*, 2000), entre outras.

Características de interesse introduzidas em espécies florestais via transformação genética

Algumas características de interesse para espécies florestais já foram introduzidas pelas técnicas de transformação genética mencionadas e estão sendo avaliadas em testes no campo, como modificação da composição/teor de lignina, resistência a pragas, tolerância a herbicidas, a alta produção de biomassa e esterilidade (Manders *et al.*, 1992; Jouanin *et al.*, 1993; Haines, 1994; Tzfira *et al.*, 1998; Rishi *et al.*, 2001).

Modificação da composição/teor de lignina

A lignina é um complexo biopolímero fenólico resultante da polimerização dos alcoóis hidroxicinâmico *p*-coumarílico, coniferílico e sinapílico também chamados de monolignóis, os quais formam respectivamente as subunidades hidroxifenil (H), guaiacil (G) e sinapil (S) que compõem a lignina (Boudet *et al.*, 1995; Whetten *et al.*, 1998). A ocorrência de lignina tem sido observada em algas, musgos e, especialmente em gimnospermas e angiospermas onde foi mais estudada em razão da importância econômica de numerosas árvores (Lewis e Yamamoto, 1990). A lignina é detectada em maior quantidade na parede secundária de células, sobretudo das fibras, vasos e traqueídeos do xilema, dotando-os de rigidez, suporte mecânico e impermeabilidade, permitindo o transporte de água e solutos. Ocorre também, em menor quantidade, no periderma associado à suberina onde age como uma barreira contra patógenos. A composição da lignina varia significativamente entre espécies, dentro da espécie e também na mesma planta, pois há variações de célula para célula de acordo com a localização da parede celular, conforme o estágio de desenvolvimento da célula e do tecido, e ainda com a influência de estresses ambientais (Campbell e Sederoff, 1996).

Apesar de se tratar de um composto de suma importância para a planta, a lignina é pouco desejada pelas indústrias de polpa e celulose. Para a obtenção desses produtos, a lignina deve ser primeiramente extraída da madeira. Esse procedimento consiste das seguintes etapas: a madeira é inicialmente transformada em cavacos nos picadores; posteriormente, os cavacos são submetidos à ação química (soda cáustica e sulfeto de sódio) e de vapor de água dentro de digestores, a fim de dissociar a lignina existente entre a fibra e a madeira. Após as etapas de lavagens, a celulose livre de impurezas é submetida a um processo de branqueamento, sendo esta tratada com peróxido de hidrogênio, dióxido de cloro, oxigênio e soda cáustica em estágios diferentes. A utilização desses químicos agressivos e tóxicos encarecem a produção de polpa e derivados e trazem riscos potenciais ao meio ambiente (Boudet e Grima-Pettenati, 1996).

A baixa variabilidade genética em algumas espécies florestais, para um reduzido teor de lignina, inviabiliza a obtenção de genótipos com teores de lignina abaixo de, aproximadamente, 23%, valor considerado ainda alto (Boudet, 1998). Por esses motivos, existe um grande interesse em se obter árvores transgênicas com menor teor de lignina, mas sem comprometer o seu desenvolvimento normal ou, de preferência, com um conteúdo de subunidades que favoreça a sua extração. Foi observado que, na natureza, madeiras cuja lignina é rica em subunidades sinapil são mais facilmente degradadas durante a produção de polpa (Chiang e Funaoka, 1990).

As enzimas, que participam das etapas iniciais e intermediárias da via de biossíntese da lignina, são comuns à via dos fenilpropanóides, e os produtos finais dessa via comum são precursores de compostos fenólicos tais como flavonóides, taninos, ligninas, ésteres e fenolamidas. Portanto, a manipulação de genes que codificam para essas enzimas pela transformação genética poderia interferir na síntese de vários compostos, além da lignina, comprometendo o desenvolvimento da planta.

Esse problema foi observado quando o gene da primeira enzima, que participa da via comum dos fenilpropanóides, a fenilalanina amônia-ase (PAL), foi manipulada em plantas transgênicas de fumo (*Nicotiana tabacum*), de tal forma que sua atividade foi reduzida (Elkind *et al.*, 1990). Essas plantas mostraram redução no conteúdo de lignina, mas também efeitos anormais no fenótipo como lesões localizadas, forma e textura das folhas alteradas, pouco crescimento e morfologia e pigmentação da flor alteradas.

As enzimas consideradas específicas da síntese de ligninas são a cinamoil-CoA reductase (CCR) e cinamil álcool desidrogenase (CAD), sendo o gene *cad*, que codifica a CAD, apontado como alvo para manipulação genética. Isso porque mutantes naturais de milho e sorgo, chamados de *bmr* (*brown midrib*) por apresentarem uma coloração vermelha-marrom típica no xilema, têm fenótipo normal, mas composição de ligninas alterado. Esse fenótipo é atribuído a uma diminuição da atividade do gene *cad*. Halpin *et al.* (1994) alteraram, pela primeira vez, a composição de lignina em plantas transgênicas de fumo pela expressão antisense do gene *cad*. Nesse experimento, obtiveram-se plantas com desenvolvimento normal e com variação na composição e estrutura da lignina, mais susceptível à sua extração, como o fenótipo *bmr* de

milho. Essa estratégia também foi testada com sucesso no híbrido de álamo (*Populus tremula* x *Populus alba*), no qual a atividade do gene *cad* foi suprimida tanto por antisense quanto por co-supressão (Baucher *et al.*, 1996). Nesse caso, as plantas transgênicas mostraram desenvolvimento normal (fenótipo *bmr*) e em experimentos de extração de polpa dessas plantas com 3 meses de idade, mostraram uma maior facilidade de extração em relação aos controles não-transformados. Essas mesmas plantas transgênicas foram avaliadas após 2 anos de crescimento no campo para as características de estrutura da lignina e da facilidade de extração da polpa (Lapierre *et al.*, 1999). Em termos gerais, avaliou-se a estabilidade da expressão do gene *cad* em antisense, já que essa estratégia deverá ser aplicada especialmente a plantas de ciclo longo. No clone transgênico de *Populus tremula* x *Populus alba* com a atividade do gene *cad* inibida, observou-se um alto teor de unidades fenólicas livres que facilitam a solubilização e a fragmentação da lignina.

Esses experimentos reforçam, portanto, a aplicação da engenharia genética na modificação da qualidade da madeira para favorecer a indústria de polpa e celulose diminuindo seus impactos potenciais no meio ambiente. O grande número de trabalhos com plantas transgênicas também vem contribuindo para um melhor entendimento molecular e bioquímico da via de biossíntese da lignina. No futuro, alteração de mais de um gene simultaneamente, ou utilização de promotores específicos de xilema, serão usados para aprimorar a extração de lignina em espécies de importância econômica (Grima-Pettenati e Goffner, 1999).

Resistência a pragas

Inúmeras plantas, incluindo as florestais, são alvo de ataques por insetos que causam injúrias aos tecidos vegetais, ou agem como vetores de transmissão de doenças, prejudicando o desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, diminuindo sua produtividade. O besouro da folha, o coleóptero *Chrysomela scripta* F. é considerado uma das mais sérias pragas nos Estados Unidos e ataca espécies do gênero *Populus* (Fang e Hart, 2000). Outro coleóptero, o besouro japonês (*Popillia japonica*) é tido como o inseto mais destrutivo de plantas lenhosas dos Estados Unidos pela sua ampla gama de hospedeiros (Miller *et al.*, 2001). Existem casos de grandes extensões de plantações de espécies florestais sendo afetadas por ataques de insetos. No Brasil, besouros da família Scolytidae (Coleoptera) têm passado por uma rápida adaptação a eucaliptos e pinheiros, sendo que os danos econômicos causados por estes são cada vez mais freqüentes (Flechtmann *et al.*, 2001).

O controle de insetos por pesticidas em qualquer espécie tem a grande desvantagem desses químicos serem altamente tóxicos para o homem e para o meio ambiente. Outra desvantagem do seu uso, especificamente em árvores, consiste na dificuldade de aplicação em razão da altura dos indivíduos e à grande área de cultivo, o que aumenta significativamente a quantidade de pesticida aplicado e, conseqüentemente, a poluição do meio ambiente e o custo da produção.

A primeira estratégia para evitar as perdas por ataques de insetos é procurando espécies ou cultivares de interesse com resistência natural ao inseto, como foi reportado recentemente o estudo para avaliar 80 clones de *Populus deltoides*, florestal de importância na Índia, em relação à susceptibilidade ou resistência ao lepidóptero *Clostera cupreata*, considerado praga nesse país (Singh, 2000). Esse método, porém, é laborioso e demanda muito tempo. A transformação genética, por outro lado, embora também seja uma técnica laboriosa, permite a obtenção de plantas resistentes a insetos independentemente da existência de clones resistentes. Naturalmente, pode e deve ser aplicada em paralelo à estratégia de procura de clones resistentes.

O pesticida biológico atualmente mais utilizado tem como princípio ativo um inseticida natural isolado de *Bacillus thuringiensis*. Essa bactéria Gram-positiva forma inclusões citoplasmáticas, durante sua fase de esporulação, que contêm um ou mais cristais (Schnepf *et al.*, 1998). A ação inseticida de *Bacillus thuringiensis* é atribuída às proteínas formadoras dos cristais as quais, após a sua ingestão por insetos susceptíveis (espécies sobretudo das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera), agem perfurando o intestino do inseto, levando à sua morte (Grochulski *et al.*, 1995). *Bacillus thuringiensis* é atualmente uma alternativa, ou um suplemento, aos pesticidas químicos usados na agricultura comercial, no manejo de florestas e no controle de mosquitos em cidades, além de ser uma fonte de genes para expressão em plantas transgênicas. Os genes que codificam as proteínas formadoras de cristais, denominados *cry*, estão sendo amplamente

introduzidos em plantas transgênicas anuais de interesse econômico e, mais recentemente, também em lenhosas. Wang *et al.* (1996) obtiveram plantas transgênicas de álamo (*Populus nigra*) expressando o gene inseticida de *Bacillus thuringiensis* mostrando resistência a *Apochemia cineraius* e *Lymantria dispar*. Plantas de *Eucalyptus camaldulensis* foram também transformadas via *Agrobacterium* contendo o gene *cry3A*, mostrando resistência a *Chrysophtharta bimaculata*, uma importante praga em suas plantações (Harcourt *et al.*, 2000).

Inibidores de proteases são também utilizados como fonte de resistência a uma ampla gama de insetos (De Leo *et al.*, 2001). O estudo e isolamento de genes que codificam inibidores de proteases têm permitido a sua introdução e expressão em plantas transgênicas. Plantas transgênicas de álamo (*Populus nigra*) resistentes a *Lymantria dispar* e *Clostera anastomosis* foram obtidas pela expressão do gene que codifica um inibidor de proteases do tipo tripsina Kunitz, isolado de soja (*Glycine max*) (Confalonieri *et al.*, 1998). Mais recentemente, plantas transgênicas de álamo (*Populus alba*) expressando o gene *Atcys*, que codifica o inibidor de proteases do tipo cisteína *Atcys*, isolado de *Arabidopsis thaliana*, mostraram eficiência ao matar larvas de *Chrysomela populi*, importante praga do álamo (Delledonne *et al.*, 2001).

Em espécies de ciclo longo, como as florestais, a estabilidade da expressão do transgene de *Bacillus thuringiensis* e de inibidores de proteases é um fator importante para garantir a resistência ao longo de todo o seu ciclo de vida (Raffa, 1989). Outro fator importante relacionado com o ciclo longo das florestais é o fato que a pressão seletiva sobre os insetos é contínua durante vários anos. Para evitar, portanto, a seleção de insetos com resistência aos transgenes, inicialmente tóxicos para estes, Venette *et al.* (2000) mostram com modelos de campo e estatísticos como detectar e monitorar a resistência de insetos, no caso *Ostrinia nubilalis* (praga do milho), à proteína *Cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis* expressa em milho transgênico.

Casos em que uma mesma espécie sofra ataques de insetos de ordens distintas, a alternativa seria a introdução de mais de um gene *cry* na planta, aumentando assim a gama de resistência. Um exemplo desse tipo de caso foi reportado para arroz (*Oryza sativa*), o qual foi transformado com os genes *cry1Ac*, que é ativo contra lepidópteros, *cry2A* que afeta lepidópteros e dípteros, e *gna* que codifica uma lectina aglutinina de *Galanthus nivalis*, tóxica para homópteros (Maqbool *et al.*, 2001). Esse estudo mostra a estabilidade de expressão múltipla de transgenes, a eficiência de resistência das plantas transgênicas às três pragas mais importantes do arroz e a tentativa de evitar a quebra de resistência pelo inseto.

Além da resistência na planta, é importante lembrar que o combate a qualquer praga de plantas deve obrigatoriamente passar por um controle integrado que inclui tratos culturais, aplicação de químicos, uso de armadilhas, controle biológico etc.

Tolerância a herbicidas

Herbicidas são ferramentas essenciais da agricultura moderna, já que permitem um aumento na produtividade pela diminuição do surgimento de ervas que competem por nutrientes do solo, água e luz com as espécies agrícolas. A aplicação freqüente de herbicidas em grande escala pode trazer riscos ao meio ambiente e ao homem, por serem tóxicos, aumentando também os gastos do produtor. O isolamento e caracterização de genes que conferem tolerância a herbicidas usados no campo, e sua posterior introdução e expressão em plantas transgênicas, têm permitido a obtenção de espécies de importância econômica tolerantes a herbicidas. Genes como o *aroA* mutado, quando expressos, agem detoxificando os herbicidas aplicados permitindo o desenvolvimento normal da planta transgênica e a eliminação de ervas daninhas. Dessa forma, é possível escolher herbicidas de amplo espectro, com alta eficiência e propriedades toxicológicas mais favoráveis, aumentando a produtividade de espécies transgênicas de interesse (Mazur e Falco, 1989). Fillatti *et al.* (1987) obtiveram a primeira espécie florestal transformada com um gene de importância agrônômica, o gene *aroA* mutado, conferindo às plantas transgênicas do híbrido *Populus alba* x *Populus gradidentata* tolerância ao herbicida glifosato. O híbrido *Populus tremula* x *Populus alba* foi posteriormente transformado com o gene *crs1-1*, isolado de um mutante de *Arabidopsis thaliana* que codifica a enzima Acetatolactato Sintase, conferindo tolerância ao herbicida clorosulfuron (Brasileiro *et al.*, 1992). Mais recentemente, o gene *bar*, da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, foi introduzido em uma variedade-élite de álamo (*Populus alba*), permitindo seu crescimento na presença de herbicidas que têm

como princípio ativo a fosfotricina (Confalonieri *et al.*, 2000). O mesmo gene também foi introduzido em *Picea abies*, *Eucalyptus camaldulensis* e *Pinus radiata*, conferindo tolerância a esses herbicidas (Brukhin *et al.*, 2000; Harcourt *et al.*, 2000; Bishop-Hurley *et al.*, 2001).

Ao contrário do que acontece com espécies de ciclo curto, nas quais o controle do crescimento de ervas deve ser realizado durante todo seu crescimento, as árvores exigem cuidados apenas nos estágios iniciais de crescimento, nos quais são mais susceptíveis. Após o estabelecimento do plantio, a aplicação de herbicidas é menos importante pois a competição das árvores com as pequenas ervas torna-se insignificante.

Aumento na produção de biomassa

Uma das características mais desejadas em espécies florestais é uma alta produtividade relacionada com o crescimento acentuado do tronco, produto mais importante para as indústrias madeireira e de celulose e papel. Para isso, torna-se necessário conhecer os hormônios vegetais e seu modo de ação, para, depois, manipular sua produção ou modificar a sensibilidade das suas células vegetais. Eriksson *et al.* (2000) mostram um exemplo bem sucedido de manipulação de hormônios em árvores e a sua aplicação econômica. Neste trabalho, foi realizada a superexpressão de um gene essencial na via de biossíntese do hormônio vegetal giberelina (GA), que codifica para a GA 20-oxidase, em plantas transgênicas do híbrido *Populus tremula* x *Populus tremuloides*. O resultado foi um maior crescimento das árvores transgênicas em diâmetro e altura, folhas maiores, fibras do xilema mais numerosas e maiores. Houve, portanto, um aumento na produção de biomassa sem alteração das características fenotípicas da árvore. Outros autores sugerem a superexpressão de genes ligados à fotossíntese ou à via de biossíntese da celulose como estratégias para o aumento de biomassa em espécies de importância econômica (Dunwell, 2000).

Esterilidade

A indução de esterilidade em árvores transgênicas é apontada como outra característica que poderia aumentar a produção de madeira (Strauss *et al.*, 1995; Brunner *et al.*, 1998). Os autores discutem trabalhos de medição do gasto de energia para a produção de órgãos reprodutores em árvores, energia que poderia ser investida no crescimento. As duas principais estratégias que têm sido usadas para se obter plantas transgênicas estéreis são a inibição da expressão de genes essenciais para o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos ou a morte de tecidos florais pela expressão de genes que codificam para citotoxinas sob o controle de promotores específicos da floração (Mariani *et al.*, 1990; Worrall *et al.*, 1992; Weigel e Nilson, 1995).

A esterilidade em espécies florestais também possui um grande interesse para controle de cruzamentos e obtenção de híbridos em espécies alógamas, pois a altura dos indivíduos é uma limitação importante para a sua emasculação manual. A macho-esterilidade é, portanto, de grande impacto nos programas de melhoramento genético, permitindo uma simplificação dos processos e diminuição dos custos.

Controle de escape gênico

Na comunidade científica e na sociedade, existe uma preocupação em relação ao plantio de transgênicos em geral, por diversos motivos, inclusive por causa do escape de genes (James *et al.*, 1998; Owusu, 1999; Rautner, 2001). Entende-se por escape de genes a transferência dos genes exógenos introduzidos nas plantas transgênicas para as espécies não-transgênicas e sexualmente compatíveis (Borém, 2001). Outra preocupação mencionada também por Tzfira *et al.* (1998) é que as espécies florestais são cultivadas em grandes extensões e produzem grande quantidade de pólen e de sementes de fácil dispersão. Daí a importância de estudar formas de minimizar a possibilidade de escape de genes. Um método bastante viável baseia-se na indução de esterilidade em plantas transgênicas, como discutido por Strauss *et al.* (1995), evitando a produção e, por consequência, o escape de pólen e de sementes.

Outra forma de diminuir a propagação de transgenes via pólen é confinando o gene exógeno em plastídios, como o cloroplasto, já que plastídios possuem herança materna e não são transmitidos via pólen. Daniell *et al.* (1998) transformaram cloroplastos de plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) com o gene que codifica a 5-Enolpiruvilchiquimate-3-Fosfato Sintase (*epsps*) de petunia, que confere tolerância ao herbicida

glifosato. A planta transgênica apresentou desenvolvimento normal, tolerância ao herbicida e uma alta taxa de expressão do transgene em razão de um alto número de cópias no genoma do cloroplasto, mostrando a viabilidade da técnica de transformação de cloroplastos.

Fitorremediação

Fitorremediação é a utilização de plantas para remover poluentes do meio ambiente ou de torná-los inofensivos, oferecendo uma solução natural para a recuperação de áreas contaminadas (Raskin, 1996; Heaton *et al.*, 1998; Krämer e Chardonnens, 2001). Rugh *et al.* (1998), por exemplo, obtiveram árvores transgênicas para fitorremediação de mercúrio. Nesse trabalho, *Liriodendron tulipifera* foi transformado com o gene *merA*, modificado, da linhagem BL308 de *Escherichia coli*, o qual codifica a mercúrio reductase, tornando-se capaz de reduzir mercúrio altamente tóxico (Hg^{++}) em sua forma menos tóxica e volátil (Hg). Esses autores discutem a vantagem da utilização especificamente de árvores transgênicas como fitorremediadores em relação às plantas de ciclo curto pois árvores apresentam maior biomassa, um sistema radicular mais profundo e um ciclo de vida mais longo.

CONCLUSÃO

O melhoramento de espécies florestais tem sido um processo árduo e demorado em consequência das características intrínsecas das árvores como a altura dos indivíduos e o ciclo longo de vida. A engenharia genética, umas das ferramentas da biotecnologia, representa uma alternativa viável e complementar ao melhoramento, permitindo obter genótipos com características de interesse silvicultural. Por isso, a tecnologia dos transgênicos está sendo adotada pelo setor florestal sobretudo dos países desenvolvidos, assim como ocorreu com as espécies anuais na década passada. A tendência mundial é que um número crescente de espécies florestais transgênicas, contendo novas características, seja liberada no mercado nos próximos anos. Atualmente, não existem espécies florestais transgênicas plantadas comercialmente, mas estão sendo realizados grandes investimentos de consórcios para programas de melhoramento e estudos em campo de espécies e híbridos florestais transgênicos.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer ao CNPq pelas bolsas concedidas e à Embrapa pelo suporte financeiro aos nossos projetos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUCHER, M.; CHABBERT, B.; PILATE, G.; VAN DOORSSELAERE, J.; TOLLIER, M.T.; PETIT-CONIL, M.; CORNU, D.; MONTIES, B.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; JOUANIN, L.; BOERJAN, W. Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. **Plant Physiology**, v. 112, p. 1479-1490, 1996.
- BISHOP-HURLEY, S.L.; ZABKIEWICZ, R.J.; GRACE, L.; GARDNER, R.C.; WAGNER, A.; WALTER, C. Conifer genetic engineering: transgenic *Pinus radiata* (D. Don) and *Picea abies* (Karst) plants are resistant to the herbicide Buster. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 235-243, 2001.
- BORÉM, A. **Escape gênico e transgênicos**. Viçosa: UFV, 2001. 206 p.
- BOUDET, A.M. A new view of lignification. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 67-71, 1998.
- BOUDET, A.M.; LAPIERRE, C.; GRIMA-PETTENATI, J. Biochemistry and molecular biology of lignification. **New Phytologist**, v. 129, p. 203-236, 1995.
- BOUDET, A.M.; GRIMA-PETTENATI, J. Lignin genetic engineering. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 25-39, 1996.
- BRASILEIRO, A.C.M.; TOURNEUR, C.; LEPLÉ, J.C.; COMBES, V.; JOUANIN, L. Expression of the mutant *Arabidopsis thaliana* acetolactate synthase gene confers chlorsulfuron resistance to transgenic poplar plants. **Transgenic Research**, v. 1, p. 133-141, 1992.
- BRASILEIRO, A.C.M. Co-cultura com linhagens desarmadas de *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Eds.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. p. 111-125.

- BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1999. p. 679-735.
- BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE, C. *Agrobacterium*: um sistema natural de transferência de genes para plantas. **Biocientífica, Ciência e Desenvolvimento**, v. 15, p. 12-15, 2000.
- BRUKHIN, V.; CLAPHAM, D.; ELFSTRAND, M.; VON ARNOLD, S. Basta tolerance as a selectable and screening marker for transgenic plants of Norway spruce. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 899-903, 2000.
- BRUNNER, A.M.; MOHAMED, R.; MEILAN, R.; SHEPPARD, L.A.; ROTTMAN, W.H.; STRAUSS, S.H. Genetic engineering of sexual sterility in shade trees. **Journal of Arboriculture**, v. 25, p. 263-273, 1998.
- CAMPBELL, M.M.; SEDEROFF, R.R. Variation in lignin content and composition. **Plant Physiology**, v. 110, p. 3-13, 1996.
- CHAREST, P.J.; DEVANTIER, Y.; LACHANCE, D. Stable genetic-transformation of *Picea mariana* (black spruce) via particle bombardment. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 32, p. 91-99, 1996.
- CHIANG, V.L.; FUNAOKA, M. The dissolution and condensation reactions of guaiacyl and syringyl units in residual lignin during kraft delignification of sweetgum. **Holzforschung**, v. 44, p. 147-156, 1990.
- CLAPHAM, D.; DEMEL, P.; ELFSTRAND, M.; KOOP, H.U.; SABALA, I.; VON ARNOLD, S. Gene transfer by particle bombardment to embryogenic cultures of *Picea abies* and the production of transgenic plantlets. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v. 15, p. 151-160, 2000.
- CONFALONIERI, M.; BALESTRAZZI, A.; BISOFFI, S.; CELLA, R. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in several black poplar clones. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 43, p. 215-222, 1995.
- CONFALONIERI, M.; BALESTRAZZI, A.; CELLA, R. Genetic transformation of *Populus deltoides* and *P. x euroamericana* clones using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 48, p. 53-61, 1997.
- CONFALONIERI, M.; ALLEGRO, G.; BALESTRAZZI, A.; FOGHER, C.; DELLEDONNE, M. Regeneration of *Populus nigra* transgenic plants expressing a Kunitz proteinase inhibitor (KTi3) gene. **Molecular Breeding**, v. 4, p. 137-145, 1998.
- CONFALONIERI, M.; BELENGHI, B.; BALESTRAZZI, A.; NEGRI, S.; FACCIOTTO, G.; SCHENONE, G.; DELLEDONNE, M. Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. 'Villafranca' and evaluation of herbicide resistance. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 978-982, 2000.
- DANDEKAR, A.M.; MCGRANAHAN, G.H.; JAMES, D.J. Transgenic woody plants. In: KUNG, S.; WU, R. (Eds.). **Transgenic plants**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 129-151.
- DANIELL, H.; DATTA, R.; VARMA, S.; GRAY, S.; LEE, S.B. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 345-348, 1998.
- DE BLOCK, M. Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. **Plant Physiology**, v. 93, p. 1110-1116, 1990.
- DE LEO, F.; BONADE-BOTTINO, M.; CECI, L.R.; GALLERANI, R.; JOUANIN, L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plant on three lepidopteran pests. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 593-602, 2001.
- DELLEDONNE, M.; ALLEGRO, G.; BELENGHI, B.; BALESTRAZZI, A.; PICCO, F.; LEVINE, A.; ZELASCO, S.; CALLIGARI, P.; CONFALONIERI, M. Transformation of white poplar (*Populus alba* L.) with a novel *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance. **Molecular Breeding**, v. 7, p. 35-42, 2001.
- DUNWELL, J.M. Transgenic approaches to crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 487-496, 2000.
- ELKIND, Y.; ROBERT, E.; MAVANDAD, M.; HEDRICK, S.A.; RIBAK, O.; DIXON, R.A.; LAMB, C.J. Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 87, p. 9057-9061, 1990.
- ELLIS, D.D.; MCCABE, D.E.; MCINNIS, D.; RAMACHANDRAN, R.; RUSSELL, D.R.; WALLACE, K.M.; MARTINELL, B.J.; ROBERTS, D.R.; RAFFA, K.F.; MCCOWN, B.H. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. **Bio/Technology**, v. 11, p. 84-89, 1993.
- ERIKSSON, M.E.; ISRAELSSON, M.; OLSSON, O.; MORITZ, T. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic

- trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 784-788, 2000.
- FANG, Y.; HART, E.R. Effect of cottonwood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) larval population levels on *Populus* terminal damage. **Environmental Entomology**, v. 29, p. 43-48, 2000.
- FILLATTI, J.J.; SELLMER, J.C.; MCCOWN, B.H.; HAISSIG, B.E.; COMAI, L. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. **Molecular and General Genetics**, v. 206, p. 192-199, 1987.
- FLECHTMANN, C.A.H.; OTTATI, A.L.T.; BERISFORD, C.W. Ambrosia and bark beetles (Scolytidae: Coleoptera) in pine and eucalypt stands in southern Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 142, p. 183-191, 2001.
- GELVIN, S.B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 223-256, 2000.
- GONZALES, E.R.; ANDRADE, A.DE.; BERTOLO, A.L.; LACERDA, G.C.; CARNEIRO, R.T.; DEFAVARI, V.A.P.; LABATE, M.T.V.; LABATE, C.A. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* using the sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 97-102, 2002.
- GRIMA-PETTENATI, J.; GOFFNER, D. Lignin genetic engineering revisited. **Plant Science**, v. 145, p. 51-65, 1999.
- GROCHULSKI, P.; MASSON, L.; BORISOVA, S.; PUSZTAI-CAREY, M.; SCHWARTZ, J.L.; BROUSSEAU, R.; CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 254, p. 447-464, 1995.
- HAINES, R. **Biotechnology in forest tree improvement**. Rome: FAO, 1994. 230 p.
- HALPIN, C.; KNIGHT, M.E.; FOXON, G.A.; CAMPBELL, M.M.; BOUDET, A.M.; BOON, J.J.; CHABBERT, B.; TOLLIER, M.T.; SCHUCH, W. Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. **The Plant Journal**, v. 6, p. 339-350, 1994.
- HAN, K.H.; MEILAN, R.; MA, C.; STRAUSS, S.H. An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*). **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 315-320, 2000.
- HANSEN, G.; WRIGHT, M.S. Recent advances in the transformation of plants. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 226-231, 1999.
- HARCOURT, R.L.; KYOZUKA, J.; FLOYD, R.B.; BATEMAN, K.S.; TANAKA, H.; DECROOCQ, V.; LLEWELLYN, D.J.; ZHU, X.; PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S. Insect- and herbicide-resistant transgenic eucalypts. **Molecular Breeding**, v. 6, p. 307-315, 2000.
- HEATON, A.C.P.; RUGH, C.L.; WANG, N.J.; MEAGHER, R.B. Phytoremediation of mercury- and methylmercury-polluted soils using genetically engineered plants. **Journal of Soil Contamination**, v. 7, p. 497-509, 1998.
- HO, C.K.; CHANG, S.H.; TSAY, J.Y.; TSAI, C.J.; CHIANG, V.L.; CHEN, Z.Z. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 675-680, 1998.
- HUANG, Y.; DINER, A.M.; KARNOSKY, D.F. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation and regeneration of a conifer: *Larix decidua*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 27, p. 201-207, 1991.
- JAMES, R.R.; DIFAZIO, S.P.; BRUNNER, A.M.; STRAUSS, S.H. Environmental effects of genetically engineered woody biomass crops. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, p. 403-414, 1998.
- JOUANIN, L.; BRASILEIRO, A.C.M.; LEPLÉ, J.C.; PILATE, G.; CORNU, D. Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. **Annales des Sciences Forestières**, v. 50, p. 325-336, 1993.
- KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; WU, R.; SANFORD, J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, v. 327, p. 70-73, 1987.
- KLIMASZEWSKA, K.; DEVANTIER, Y.; LACHANCE, D.; LELU, M.A.; CHAREST, P.J. *Larix laricina* (tamarack) - somatic embryogenesis and genetic transformation. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 27, p. 538-550, 1997.
- KRÄMER, U.; CHARDONNENS, A.N. The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 661-672, 2001.
- LAPIERRE, C.; POLLET, B.; PETIT-CONIL, M.; TOVAL, G.; ROMERO, J.; PILATE, G.; LEPLÉ, J.C.; BOERJAN, W.; FERRET, V.; DE NADAI, V.; JOUANIN, L. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid o-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. **Plant Physiology**, v. 119, p. 153-163, 1999.

- LEVEE, V.; GARIN, E.; KLIMASZEWSKA, K.; SEGUIN, A. Stable genetic transformation of white pine (*Pinus strobus* L.) after cocultivation of embryogenic tissues with *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular Breeding**, v. 5, p. 429-440, 1999.
- LEWIS, N.G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 41, p. 455-496, 1990.
- LÓPEZ, M.; HUMARA, J.M.; RODRIGUEZ, R.; ORDAS, R.J. Factors involved in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer into *Pinus nigra* Arn. ssp. *salzmannii* (Dunal) Franco. **Euphytica**, v. 114, p. 195-203, 2000.
- MANDERS, G.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. New genes for old trees. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 1181-1190, 1992.
- MAQBOOL, S.B.; RIAZUDDIN, S.; LOC, N.T.; GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A.; CHRISTOU, P. Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests. **Molecular Breeding**, v. 7, p. 85-93, 2001.
- MARIANI, C.; DE BEUCKELEER, M.; TRUETTNER, J.; LEEMANS, J.; GOLDBERG, R.B. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. **Nature**, v. 347, p. 737-741, 1990.
- MAZUR, B.J.; FALCO, S.C. The development of herbicide resistant crops. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 40, p. 441-470, 1989.
- MCGRANAHAN, G.H.; LESLIE, C.A.; URATSU, S.L.; MARTIN, L.A.; DANDEKAR, A.M. *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. **Bio/Technology**, v. 6, p. 800-804, 1988.
- MILLER, F.; WARE, G.; JACKSON, J. Preference of temperate chinese elms (*Ulmus* spp.) for the adult japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p. 445-448, 2001.
- MORA, A.L.; GARCIA, C.H. **Eucalypt cultivation in Brazil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2000, 112 p.
- MORALEJO, M.; ROCHANGE, F.; BOUDET, A.M.; TEULIÈRES, C. Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 25, p. 207-212, 1998.
- NAINA, N.S.; GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F. Genetic transformation and regeneration of transgenic neem (*Azadirachta indica*) plants using *Agrobacterium tumefaciens*. **Current Science**, v. 58, p. 184-187, 1989.
- NEWELL, C.A. Plant transformation technology. **Molecular Biotechnology**, v. 16, p. 53-65, 2000.
- OWUSU, R.A. **GM technology in the forest sector: a scoping study for WWF**. [S.l.: s.n.] 1999. 34p. Disponível em: <<http://www.wwf-uk.org/news/news108.htm>>.
- PHELEP, M.; PETIT, A.; MARTIN, L.; DUHOUX, E.; TEMPÉ, J. Transformation and regeneration of a nitrogen-fixing tree, *Allocauarina verticillata* Lam. **Bio/Technology**, v. 9, p. 461-466, 1991.
- RAFFA, K.F. Genetic engineering of trees to enhance resistance to insects. **BioScience**, v. 39, p. 524-534, 1989.
- RASKIN, I. Plant genetic engineering may help with environmental cleanup. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 93, p. 3164-3166, 1996.
- RAUTNER, M. Designer trees. **Biotechnology and Development Monitor**, v. 44/45, p. 2-7, 2001.
- RECH, E.L.; ARAGÃO, F.J.L. Biobalística. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C (Eds.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. p. 51-64.
- RISHI, A.S.; NELSON, N.D.; GOYAL, A. Genetic modification for improvement of *Populus*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 7, p. 7-21, 2001.
- RUGH, C.L.; SENECHOFF, J.F.; MEAGHER, R.B.; MERKLE, S.A. Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 925-928, 1998.
- SANFORD, J.C.; KLEIN, T.M.; WOLF, E.D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Journal of Particle Science Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 62, p. 775-806, 1998.
- SINGH, A.P. Relative natural resistance of *Populus deltoides* clones against defoliator *Clostera cupreata* (Lepidoptera:

- Notodontidae) in northern India. **Agroforestry Systems**, v. 49, p. 319-326, 2000.
- STAFFORD, H.A. Crown gall disease and *Agrobacterium tumefaciens*: a study of the history, present knowledge, missing information, and impact on molecular genetics. **The Botanical Review**, v. 66, p. 99-118, 2000.
- STRAUSS, S.T.; ROTTMANN, W.H.; BRUNNER, A.M.; SHEPPARD, L.A. Genetic engineering of reproductive sterility in forest trees. **Molecular Breeding**, v. 1, p. 5-26, 1995.
- TIAN, L.N.; CHAREST, P.J.; SEGUIN, A.; RUTLEDGE, R.G. Hygromycin resistance is an effective selectable marker for biolistic transformation of black spruce (*Picea mariana*). **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 358-362, 2000.
- TZFIRA, T.; BEN-MEIR, H.; VAINSTEIN, A.; ALTMAN, A. Highly efficient transformation and regeneration of aspen plants through shoot-bud formation in root culture. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 566-571, 1996.
- TZFIRA, T.; JENSEN, C.S.; WANG, W.; ZUKER, A.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A.; VAINSTEIN, A.; WANG, W.X. Transgenic *Populus tremula*: a step-by-step protocol for its *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Molecular Biology Reports**, v. 15, p. 219-235, 1997.
- TZFIRA, T.; ZUKER, A.; ALTMAN, A. Forest-tree biotechnology: genetic transformation and its application to future forests. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 439-446, 1998.
- TZFIRA, T.; CITOVSKEY, V. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. **Molecular Plant Pathology**, v. 1, p. 201-212, 2000.
- VENETTE, R.; HUTCHINSON, W.D.; ANDOW, D.A. An field screen for early detection and monitoring of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* in transgenic crops. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 1055-1064, 2000.
- WALTER, C.; GRACE L.J.; DONALDSON, S.S.; MOODY, J.; GEMMELL, J.E.; VAN DER MAAS, S.; KVAALLEN, H.; LONNENBORG, A. An efficient Biolistic® transformation protocol for *Picea abies* embryonic tissue and regeneration of transgenic plants. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 29, p. 1539-1546, 1999.
- WALTER, C.; GRACE, L.J.; WAGNER, A.; WHITE, D.W.R.; WALDEN, A.R.; DONALDSON, S.S.; HINTON, H.; GARDNER, R.C.; SMITH, D.R. Stable transformation and regeneration of transgenic plants of *Pinus radiata* D. Don. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 460-468, 1998.
- WANG, G.; CASTIGLIONE, S.; CHEN, Y.; LI, Y.; MANG, K.; SALA, F. Poplar (*Populus nigra* L.) plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: insecticidal activity and genomic analysis. **Transgenic Research**, v. 5, p. 289-301, 1996.
- WEIGEL, D.; NILSSON, O. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. **Nature**, v. 377, p. 495-500, 1995.
- WENCK, A.R.; QUINN, M.; WHETTEN, R.W.; PULLMAN, G.; SEDEROFF, R. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*). **Plant Molecular Biology**, v. 39, p. 407-416, 1999.
- WHETTEN, R.W.; MACKAY, J.J.; SEDEROFF, R.R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 585-609, 1998.
- WORRALL, D.; HIRD, D.L.; HODGE, R.; PAUL, W.; DRAPER, J.; SCOTT, R. Premature dissolution of microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. **The Plant Cell**, v. 4, p. 759-771, 1992.
- ZUPAN, J.; MUTH, T.R.; DRAPER, O.; ZAMBRYSKI, P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. **The Plant Journal**, v. 23, p. 11-28, 2000.