



Zastosowanie roślin transgenicznych w leśnictwie – perspektywy i zagrożenia

Justyna Nowakowska

Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych, Instytut Badawczy Leśnictwa, Warszawa

Genetically modified trees in the forestry – benefits and risks

Summary

In forestry, genetic engineering is used to produce new varieties of trees which have valuable traits such as increased herbicide-tolerance, pathogen- and herbivore-resistance and high quality of wood. The developed research methods consisting of gene-engineering and transformation of the forest tree species via *Agrobacterium tumefaciens* or particle bombardment techniques opened a new field in forest genetics. Genetic modification as well as conventional breeding techniques seek for genetic improvement of forest tree species in order to make them more productive under certain environmental conditions. In contrast to traditional breeding based on natural variation of plant phenotype, in genetic modification technologies the genes controlling desired traits are isolated, their DNA sequences are determined, and recombinant genes are reintroduced into plant cells. Plantations of genetically modified trees require some environmental protection measures in order to prevent any cross-pollination in open field. Possible benefits of transgenic trees are associated with increasing economic efficiency of forestry, and they can provide important environmental benefit such as reduced use of pesticides or less pressure on native forests as wood, fibre and energy supplier.

Key words:

Bt toxin, genetic engineering, herbicide-tolerance, pathogen- and insect-resistance, transgenic forest tree species, wood quality.

Adres do korespondencji

Justyna Nowakowska,
Zakład Genetyki
i Fizjologii Drzew Leśnych,
Instytut Badawczy
Leśnictwa,
ul. Bitwy Warszawskiej
1920 roku 3,
00-973 Warszawa;
e-mail:
j.nowakowska@ibles.waw.pl

1. Wstęp

Biotechnologia jest jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się dziedzin nauki, która łączy w sobie osiągnięcia nauk biologicznych, chemicznych, fizycznych i medycznych w celu otrzymania organizmów (komórek roślinnych, zwierzęcych i bakteryjnych) o nowych, korzystnych cechach hodowlanych. Od 15 lat biotechnologia, a szczególnie inżynieria genetyczna ukierunkowana na transformację komórek roślinnych, znalazła zastosowanie w leśnictwie (1,2).

Współczesna biotechnologia stosowana w leśnictwie jest kontynuacją postępu biologicznego w produkcji roślin będących źródłem pożywienia (np. ziemniak, rzepak, kukurydza) oraz gatunków roślin przemysłowych (bawełna, len), drzew sadowniczych (jabłoń, śliwa) i leśnych m.in. topoli i sosny (3). Dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod inżynierii genetycznej (klonowanie wybranych sekwencji genów i ich przenoszenie z genomu jednego gatunku do drugiego), możliwa jest hodowla drzew leśnych odpornych na czynniki chorobotwórcze i środki ochrony roślin (1,2). Ważną gałęzią biotechnologii jest mikrorozmnażanie wybranych gatunków, w tym również drzew leśnych takich jak topola, brzoza, sosna, modrzew i świerk, drogą somatycznej embriogenezy i pozyskiwanie w ten sposób jednolitego materiału rozmnożeniowego (4-9).

2. Genetyczna transformacja roślin drzewiastych

Modyfikacja genomu roślin, czyli ich genetyczna transformacja, polega na wprowadzeniu specyficznej sekwencji obcego DNA do genomu komórki w celu otrzymania osobników o nowych cechach jakościowych. Informacja genetyczna danego gatunku, zawarta w DNA, może być wzbogacona w dodatkowe sekwencje genów, wprowadzone do komórki na drodze transformacji.

Ogólnie wyróżniamy dwa rodzaje transformacji komórek roślinnych:

- transformację wektorową, która polega na zastosowaniu szczepów bakteryjnych (wektorów) do wprowadzenia obcych genów do rośliny, oraz
- transformację bezwektorową, opartą na bezpośrednim transferze genów między dawcą a biorcą.

Transformacja wektorowa została opracowana w latach osiemdziesiątych, kiedy odkryto podstawowe zasady przebiegu infekcji tkanek roślinnych przez szczepy bakteryjne (*Agrobacterium tumefaciens* i *Agrobacterium rhizogenes*) (10). Bakterie te, żyjąc w glebie, w naturalny sposób infekują zranione tkanki łodyg i korzeni niektórych roślin dwuliściennych. W trakcie infekcji, część materiału genetycznego bakterii (zawartego w kolistym DNA, zwanym plazmidem pTi) jest przekazana do wnętrza komórek rośliny i włączona do genomu gospodarza. W konsekwencji, zintegrowany fragment DNA bakteryjnego przyczynia się do zmiany naturalnego poziomu substancji wzrostowych w roślinie i prowadzi do wytworzenia narośli tumorowych

w zainfekowanych organach rośliny. Zjawisko infekcji wykorzystano do wprowadzenia do roślin obcych genów, po uprzedniej modyfikacji struktury plazmidu bakteryjnego (m.in. pozbawiając go cech onkogennych) (10).

Ważnym etapem, jaki poprzedza transformację komórek roślin drzewiastych, jest wyizolowanie sekwencji odpowiedniego genu, np. genu kodującego syntazę glutaminową lub odporności na szkodniki z rzędu *Lepidoptera* (toksyna Bt) (1,11,12). Poszukiwanie genów odpowiedzialnych za wiele procesów metabolicznych w roślinie jest ostatnio możliwe dzięki wykorzystaniu techniki mikromacierzy DNA (*DNA microarrays*). Technika ta umożliwia identyfikację i wstępną charakterystykę funkcji genów na poziomie transkrypcji. W ten sposób odkryto m.in. geny *Leafy* kontrolujące proces kwitnienia u *Arabidopsis thaliana*, geny enzymów szlaku syntezy komponentów ściany komórkowej oraz wiele innych genów, odpowiedzialnych za procesy wzrostu i rozwoju roślin pod wpływem działania hormonów takich jak auksyny, gibereliny, etylen i kwas abscysynowy (2,4).

Prace mające na celu ustalenie funkcji genu, opierają się najczęściej na testowaniu samego procesu transformacji oraz ekspresji transgeny w roślinie poprzez użycie tzw. genów markerowych. Najczęściej stosowanym genem markerowym w transformacji drzew leśnych jest gen *uidA*, kodujący β -D-glukuronidazę (GUS) pod kontrolą silnego promotora mozaiki kalafiora CaMV 35 S (13,14).

Bezwektorowa metoda transformacji komórek roślinnych polega na bezpośrednim transferze wyizolowanych genów do protoplastów przy użyciu glikolu polietylenowego (PEG) lub techniki zwanej elektroporacją. Najczęściej stosowaną metodą bezwektorową jest mikrowstrzeliwanie DNA za pomocą „strzelby genowej” (*particle bombardment*). Metoda ta, po raz pierwszy wykorzystana do transformacji komórek kukurydzy w 1990 r., jest obecnie stosowana na szeroką skalę w transformacji komórek drzew iglastych takich jak sosna i świerk (16,17).

Wyhodowane rośliny transgeniczne poddawane są następnie weryfikacji pod kątem obecności obcego genu w genomie komórki. W zależności od zastosowanego konstruktów genowego, proces wstępnej weryfikacji może być przeprowadzany za pomocą testów ekspresji genów kodujących białka markerowe, np. GUS. Ostateczna weryfikacja uzyskanych linii transgenicznych oraz ich potomstwa wymaga przeprowadzenia molekularnych analiz (techniki Southern-, Northern- i Western-blotting, PCR oraz testów enzymatycznych i immunochemicznych), potwierdzających integrację transgeny z genomem rośliny oraz jego ekspresję w roślinie (18,19).

3. Zastosowanie roślin transgenicznych w leśnictwie

Zastosowanie inżynierii genetycznej w leśnictwie dotyczy w pierwszym rzędzie upraw roślin szybko rosnących (topola), o dużym znaczeniu gospodarczym i stosunkowo łatwym sposobie rozmnażania. Dzięki transformacji roślin drzewiastych, mo-

żemy o wiele szybciej uzyskać pożądany efekt jakościowy (np. odporność na herbicydy i szkodliwe owady) w porównaniu do tradycyjnych metod selekcji.

Jednym z pierwszych z osiągnięć w dziedzinie inżynierii genetycznej w leśnictwie była hodowla transgenicznych siewek topoli (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) odpornych na środki ochrony roślin, takie jak herbicyd Roundup, powszechnie stosowany do zwalczania chwastów szerokolistnych i trawiastych (15). Aktywny składnik tego preparatu – glifosat, blokuje podstawowy enzym – syntazę kwasu 5-endo-pirogronoszikimo-3-fosforanowego (EPSPS) w biosyntezie aminokwasów aromatycznych w komórkach roślin wyższych. W celu uzyskania odporności siewek topoli na glifosat, wyizolowano z komórek bakteryjnych (*Salmonella typhimurium*) gen *aroA*, który koduje zmutowane białko EPSPS i wprowadzono go do genomu rośliny (2). Nadekspresja genu *aroA* pod kontrolą promotora CaMV 35S u topoli prowadzi do akumulacji zmutowanego białka EPSPS w komórkach, co jest przyczyną zmniejszenia powinowactwa białek docelowych dla herbicydu, bez wpływu na drogę biosyntezy aminokwasów aromatycznych. Dzięki temu, stosowany w uprawach topoli herbicyd, hamuje selektywnie wzrost chwastów jednoliściennych, nie wpływając na rozwój siewek topoli (1,2,15). Podobnie, otrzymano odporność na glifosat u siewek modrzewia (*Larix decidua* Mill.) oraz mieszańca topoli (*Populus tremula* x *alba*) (2).

Innym ważnym zastosowaniem inżynierii genetycznej w leśnictwie jest hodowla transgenicznych siewek topoli (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*) odpornych na owady z rodziny stonkowatych, takich jak *Chrysomela scripta* (1,15). Żerując na młodych liściach topoli, szkodnik ten przyczynia się do zahamowania wzrostu drzew w uprawach plantacyjnych. Najczęściej stosowanymi środkami ochrony lasu przed szkodliwymi gatunkami owadów są, jak dotąd, preparaty zawierające ekstrakty z bakterii *Bacillus thuringiensis* Berliner (12). Bioinsektycydy oparte na *B. thuringiensis* zaliczane są do najbardziej selektywnych spośród stosowanych obecnie środków owadobójczych, charakteryzują się szerokim spektrum działania m.in. na owady z rzędów błonkówek (*Lepidoptera*), muchówek (*Diptera*) i chrząszczy (*Coleoptera*), przy czym są one bezpieczne dla człowieka i zwierząt (20,21). Stosowane na szeroką skalę chemiczne preparaty ochrony drzew leśnych przed owadami wywołują szereg niekorzystnych zmian w środowisku, włącznie z zanieczyszczeniem wody pitnej substancjami chemicznymi, wyniszczeniem pożytecznej entomofauny dla sprawców choroby, oraz zwiększa ryzyko uodpornienia się szkodliwych organizmów na działanie insektycydów (22,23). Ponadto, preparaty chemiczne charakteryzują się zbyt krótkim działaniem owadobójczym na liściach opryskanych roślin (związki chemiczne ulegają degradacji pod wpływem promieniowania UV), jak również posiadają ograniczoną przestrzeń i czas działania. Aby temu zapobiec, zwiększono odporność mieszańca topoli *Populus trichocarpa* x *P. deltoides* przez wprowadzenie do embriogenych komórek roślinnych konstruktów genowych zawierających gen kodujący δ -endotoksyny *cryIA(a)*, *cryIA(b)* lub *cryIA(c)* z *Bacillus thuringiensis* (12,15,20). Zintegrowany z DNA roślinnym gen *Bt* koduje toksyczne białko dla żerujących na blaszkach liściowych larw (12). W ten sposób, transformacja topoli genem *Bt* umożliwiła uprawę

tego gatunku na plantacjach bez zastosowania chemicznych środków ochrony roślin (insektycydów).

W Belgii, Francji i Stanach Zjednoczonych prowadzone są aktualnie badania nad transgenicznymi gatunkami drzew leśnych o zmienionym składzie wiązań fenylopropanowych w ścianach komórkowych, co umożliwia zastosowanie mniej szkodliwych dla środowiska procesów technologicznych w przemyśle papierniczym (2,3, 24-26). Modyfikacja głównych enzymów w łańcuchu biosyntezy lignin (ligaza C4L, dehydrogenaza CAD, liaza PAL) umożliwiła uzyskanie siewek transgenicznej topoli o zmniejszonej zawartości lignin w ścianach komórkowych (2,3,24,27). Zmiana w ekspresji genu ligazy kumarynowej C4L, która jest podstawowym enzymem w biosyntezie lignin, prowadzi np. do zwiększenia o 30% zawartości włókien celulozy w komórkach produkowanego drewna (27).

4. Perspektywy zastosowania roślin transgenicznych w leśnictwie

Biotechnologia otwiera szerokie możliwości dla modyfikacji cech genetycznych drzew leśnych. Wiele jednostek naukowych pracuje nad optymalizacją metod transformacji różnych gatunków drzew leśnych w celu zwiększenia odporności na jeden lub kilka czynników biotycznych i abiotycznych. Poznanie procesów biochemicznych, regulujących mechanizm wegetatywnego rozmnażania gatunków drzew leśnych stanowi cel badań wielu ośrodków naukowych. Sam proces transformacji genetycznej powoduje bowiem zwykle zmniejszenie efektywności regeneracji zarodków somatycznych z komórek sosny i brzozy *in vitro* (14). W przypadku *Pinus taeda*, zauważono, że proces transformacji komórek kalusa powoduje zmniejszenie efektywności regeneracji o 40% (9). Rozmnażanie sosny (*Pinus taeda* L.) i świerka (*Picea abies* L. Karst.) *in vitro* nie jest jeszcze w sposób zadowalający opracowane, a napotkane trudności mają podłoże genetyczne (ekspresja genów) lub fizjologiczne (białka kontrolujące proces embriogenezy, np. reduktaza glutationowa). W związku z tym, trwają intensywne badania nad poznaniem mechanizmów indukujących powstawanie zarodków z dojrzałych komórek sosny i świerka, tak aby w niedalekiej przyszłości można było rozmnażać wegetatywnie drzewa elitarne ww. gatunków (6,16). Rozmnażanie cennych linii hodowlanych różnych gatunków drzew leśnych drogą somatycznej embriogenezy pozwala uzyskać dużą ilość rozmnażanego materiału o wyselekcjonowanym genotypie. Poznano, jak dotąd, np. czynnik transkrypcyjny *CHAP3a*, który indukuje ekspresję genów biorących udział w regeneracji komórek świerka *in vitro* (Rutledge i wsp., dane nie publikowane) i można przypuszczać, że podobny mechanizm występuje również u innych gatunków drzew leśnych. Dalsze prace będą postępować w kierunku identyfikacji innych czynników transkrypcyjnych, lokalizacji genów odpowiedzialnych za indukcję procesu somatycznej embriogenezy oraz ich aktywność w czasie formowania się zarodków drzew iglastych.

Na szczególną uwagę zasługuje również udoskonalenie metod weryfikacji stabilności transgenów w liniach zmodyfikowanych genetycznie.

Obecnie, w wielu laboratoriach trwają prace nad transformacją ważnych przemysłowo gatunków drzew leśnych, w celu nadania odporności na herbicydy oraz czynniki chorobotwórcze takie jak grzyby, owady, wirusy (2,3). W Stanach Zjednoczonych i w Hiszpanii hodowane są w warunkach szklarniowych transgeniczne odmiany brzozy i sosny, odporne na owady z rzędów *Lepidoptera*, *Diptera* i *Coleoptera* (12,27). W Finlandii uzyskano już pozytywną transformację komórek brzozy *Betula pendula* Roth., do której wprowadzono gen transferazy metylowej PtCOMT z *Populus tremuloides*. Otrzymane tą drogą transgeniczne brzozy wykazują zwiększoną odporność na owady z rzędu *Coleoptera* w warunkach szklarniowych (27). Transgeniczna brzoza brodawkowata, posiadająca gen chitynazy IV, jest odporna na wiele szczepów bakteryjnych (m.in. *Streptomyces*) i grzybowych (np. *Phytophthora infestans*) (Lohtander i wsp., dane nie publikowane). W Szwecji, zmodyfikowano genetycznie osobniki mieszańca *P. tremula* x *P. tremuloides* w celu poprawy jakości drewna, zwiększenia przemiany węglowodanów w roślinie, zwiększonej syntezy giberelin oraz nadanie odporności na owady z rzędów *Coleoptera*, *Lepidoptera* i *Diptera* poprzez ekspresję toksyny *Bt*.

W Stanach Zjednoczonych i w Izraelu opracowywana jest metoda uzyskania odporności na niekorzystne warunki klimatyczne (mróz, susza) i środowiskowe (zasolenie, wysokie stężenie jonów rtęci w podłożu) oraz o zwiększonej asymilacji jonów amonowych (NH_4^+) u topoli i sosny (3,11). W Belgii i Francji prowadzone są badania nad transgeniczną topolą o zmienionym składzie wiązań fenylo-propenowych lignin, co umożliwi zastosowanie mniej szkodliwych dla środowiska procesów technologicznych w przemyśle papierniczym (24).

Transformacje genetyczne nad wprowadzeniem zmian metabolizmu komórkowego są obecnie prowadzone głównie u takich gatunków drzew leśnych jak *Pinus taeda*, *P. radiata*, *P. sylvestris*, *Picea abies*, *Betula pendula*, *Pseudotsuga menziesii*, *Populus tremula* x *P. tremuloides* i *Populus nigra* (2). Jakkolwiek w większości prace te dotyczą transformacji i ekspresji genów markerowych (GUS), rozpoczęto już próby wprowadzenia do komórek drzew leśnych takich genów jak: geny odporności na herbicydy (BASTA) (2,3), geny kodujące enzymy szlaku biosyntezy terpenów, których ekspresja w roślinach transgenicznych zwiększa odporność drzew na szkodniki i patogeny grzybowe u świerka, np. *Phytium dimorphum* i *Ceratocystis polonica* (28), geny cykazy karboksylowej (ACC), które wprowadzone do komórek sosny zwyczajnej i brzozy brodawkowej, przyczyniają się do zwiększonej produkcji etylenu i indukcji dojrzewania zarodków somatycznych *in vitro* (Lu i wsp., dane nie publikowane).

Ważnym osiągnięciem w hodowli zmodyfikowanych genetycznie drzew będzie wyhodowanie osobników charakteryzujących się kontrolowanym procesem kwitnienia. Proces ten można przyspieszać powodując nadekspresję genów *LEAFY* lub *APETALA* u topoli, lub blokować rozwój pąków kwiatowych poprzez wyciszenie genów (2,3). Zahamowanie procesu kwitnienia w roślinach transgenicznych eliminuje ryzyko uwolnienia transgenu do środowiska.

Wiele przedsiębiorstw przemysłu drzewnego, takich jak SweTreeTechnology AB (Szwecja), ArborGen llc. (USA), Rubicon Ltd. (USA), Trees and Technology (USA), Genesis Research and Development Corp. (Nowa Zelandia) oraz międzynarodowa spółka CellFor Inc., wspierają finansowo badania naukowe w poszukiwaniu genów odpowiedzialnych za cenne przemysłowo cechy drewna oraz finansują wdrożenie uzyskanych gatunków transgenicznych drzew do produkcji. Dla przykładu, spółka ArborGen llc. przeprowadza testy hodowlane transgenicznej topoli na 50 poletkach doświadczalnych głównie w USA, Brazylii i Nowej Zelandii (dla gatunków *Pinus* i *Populus*), gdzie produkcja transgenicznych sadzonek *P. taeda* sięga ok. 150 000 sztuk rocznie.

5. Zasady stosowania roślin transgenicznych

W związku z bardzo szybkim postępem, jaki dokonał się ostatnio w dziedzinie transformacji różnych gatunków roślin, wiele państw wprowadziło w życie szereg przepisów prawnych, regulujących zasady użytkowania GMO (*Genetically Modified Organisms*). Wprowadzenie do środowiska roślin o zmienionym genotypie niesie ze sobą wiele niebezpieczeństw, związanych m.in. z ryzykiem przenoszenia nowych cech genetycznych z jednej populacji do drugiej drogą pyłku. Niekontrolowany przepływ pyłku może przyczynić się do powstania nowych populacji drzew o zrekombinowanych losowo, nie zawsze korzystnych cechach (29). Wprowadzenie do ekosystemu leśnego roślin drzewiastych o zwiększonej odporności na niektóre owady niesie ze sobą ryzyko uodpornienia się szkodników na czynnik owadobójczy, syntetyzowany przez roślinę (15,22). Doświadczenia laboratoryjne wykorzystujące zmutowane organizmy bakteryjne do hodowli szklarniowej GMO powinny przebiegać w ściśle kontrolowanych warunkach (np. w pomieszczeniach wyposażonych w system oczyszczania wody i powietrza). Ogólnie przyjęte zasady hodowli GMO w warunkach polowych dotyczą podstawowych kwestii bezpieczeństwa dla środowiska. W niektórych krajach, takich jak Szwecja, producent GMO ponosi wszelką odpowiedzialność za ewentualne szkody wyrządzone w środowisku na skutek niekontrolowanego przepływu transgeny z upraw roślin zmodyfikowanych genetycznie.

W Polsce, od 22 czerwca 2001 r. obowiązuje Ustawa o organizmach genetycznie zmodyfikowanych, która zawiera podstawy prawne m.in. dla zamkniętego użycia GMO (manipulacje genetyczne i transformacja w ściśle kontrolowanych warunkach laboratoryjnych), wprowadzenia GMO do środowiska (zaostrzone zasady upraw polowych), wprowadzenia do obrotu handlowego produktów GMO (badanie szkodliwości produktów spożywczych zawierających GMO dla konsumenta, znakowanie transgenicznej żywności) oraz zasady wywozu za granicę i tranzytu GMO na terenie Polski (Dz. U. z 2001 r., nr 76, poz. 811 z późniejszymi zmianami).

6. Podsumowanie

Zapotrzebowanie na produkty przemysłu drzewnego stale rośnie wraz ze zwiększającą się liczbą ludności na świecie. Produkcja sektora drzewnego zmierza do zwiększenia i ulepszenia gospodarki leśnej. Ważną rolę w tej dziedzinie spełnia biotechnologia wraz z nowoczesnymi narzędziami transformacji drzew leśnych w celu otrzymania nowych, lepszych jakościowo gatunków hodowlanych. Klonowanie nowych odmian drzew leśnych drogą somatycznej embriogenezy stanowi ważny aspekt w szybkim rozmnażaniu wyselekcjonowanych gatunków dla celów przemysłowych.

Biotechnologia drzew leśnych cieszy się coraz większym zainteresowaniem wielu jednostek badawczych i leśnych przedsiębiorstw przemysłu papierniczego. W przeciągu ostatnich dwudziestu lat, odnotowano ogromne postępy w transformacji i hodowli różnych gatunków drzew leśnych. Produkcja drewna na plantacjach transgenicznych odmian drzew leśnych, przy zachowaniu podstawowych zasad bezpieczeństwa hodowli, ogranicza nadmierną eksploatację naturalnych drzewostanów oraz zmniejsza ryzyko zanieczyszczenia środowiska chemicznymi środkami ochrony.

Literatura

1. Charest P. J., Michel M. F., (1991), *Information Report PI-X-104*, Forestry Canada Publications Distribution Centre, Petawawa National Forestry Institute, 18-32.
2. Campbell M. M., Brunner A. M., Jones H. M., Strauss S. H., (2003), *Plant Biotechnol. J.*, 1, 141-154.
3. Tzfira T., Zuker A., Altman A., (1998), *Trends Biotechnol.*, 16, 439-446.
4. Tzfira T., Vainstein A., Altman A., (1999), *Trees*, 14, 49-54.
5. Aronen T., Hohtola A., Laukkanen H., Häggman H., (1995), *Tree Physiol.*, 15, 65-70.
6. Lelu M. A., Bastien C., Drugeault A., Gouez A. L., Klimaszewska K., (1999), *Physiol. Plantarum*, 105, 719-728.
7. Klimaszewska K., Devantier Y., LaChance D., Lelu M. A., Charest P. J., (1997), *Can. J. For. Res.*, 27, 538-550.
8. Walter C., Grace L. J., Donaldson S. S., Moody J., Gemmell J. E., van der Maas S., Kvaalen H., Lönnberg (1999), *Can. J. For. Res.*, 29, 1539-1546.
9. Wenk A. R., Quinn M., Whetten R. W., Pullman G., Sederoff R., (1999), *Plant Mol. Biol.*, 39, 407-416.
10. Rogers S. G., Horsh R. B., Fraley R. T., (1988), *Methods for Plant Molecular Biology*, Harcourt Brace Jovanovich Publishers, Eds. A. Weissbach, H. Weissbach, Academic Press Inc. New York, 423-436.
11. Gallardo F., Fu J., Cantón F. R., Garcia-Gutiérrez A., Cánovas F. M., Kirby E. G., (1999), *Planta*, 210, 19-26.
12. Bauer L. S., (1997), *J. of Forestry*, 95(3), 20-28.
13. Aronen T., Häggman H., Hohtola A., (1994), *Can. J. For. Res.*, 24, 2006-2011.
14. Aronen T., Häggman H., (1995), *Eur. J. For. Path.*, 25, 197-213.
15. Strauss S. H., Knowe S. A., Jenkins J., (1997), *J. of Forestry*, 95(5), 12-19.
16. Häggman H., Aronen T. S., Nikkanen T. O., (1997), *Can. J. For. Res.*, 27, 928-935.
17. Aronen T. S., Nikkanen T. O., Häggman H. M., (1998), *Can. J. For. Res.*, 28, 79-86.
18. Nadolska-Orczyk A., (1999), *Biotechnologia*, 1(44), 116-124.
19. Kumar S., Fladung M., (2001), *Trends Plant Sci.*, 6(4), 155-159.
20. Gelernter W., Schwab G. E., (1993), *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*, Eds. P. F. Entwistle, J. S. Corry, M. J. Ailey, S. Higgs, John Wiley & Sons Ltd., 90-104.

21. Voisey C. R., White D. W. R., McGregor P. G., Wigley P. J., Chilcott C. N., (1993), *Proceedings of the 2nd Canberra Bacillus thuringiensis meeting*, Ed. R. J. Akhurst, CPN Publications Pty, Ltd., 75-83.
22. Malinowski H., (1997), *Prace IBL, ser. A (830)*, 6-44.
23. Raffa K. F., (1989), *BioScience*, 39(8), 524-534.
24. Hu W. J., Harding S. A., Lung J., Popko J. L., Ralph J., Stokke D. D., Tsai C. J., Chiang V. L., (1999), *Nature Biotechnol.*, 17, 808-812.
25. Bajrovic K., Kazan K., Ipekci Z., Gozukirmizi N., (1999), *J. of Forest Res.*, 4(2), 161-166.
26. El Euch C., Jay-Allemand C., Pastuglia M., Doumas P., Charpentier J. P., Capelli P., Jouanin L., (1998), *Plant Mol. Biol.*, 38, 467-479.
27. Peña L., Séguin A., (2001), *Trends Biotechnol.*, 19(12), 500-506.
28. Fossdal C. G., Sharma P., Lönnenborg A., (2001), *Plant Mol. Biol.*, 47(3), 423-435.
29. Strauss S. H., Campbell M. M., Pryor S. N., Coventry P., Burley J., (2001), *J. of Forestry*, 99(12), 4-7.