

RAÍZES TRANSGÊNICAS EM ENGENHARIA METABÓLICA DE PLANTAS: PRODUÇÃO DE VOLÁTEIS

ANA CRISTINA S. FIGUEIREDO, JOSÉ G. BARROSO E LUIS G. PEDRO

Centro de Biotecnologia Vegetal, Departamento de Biologia Vegetal,

Faculdade de Ciências de Lisboa, C2, Piso 1,

Campo Grande, 1749-016 Lisboa

RESUMO

Muitas vezes designadas como "a metade escondida das plantas", as raízes são na realidade muito mais importantes do que o seu habitat, normalmente subterrâneo, podia fazer esperar. As raízes têm a capacidade de sintetizar uma grande diversidade de metabolitos secundários, e bem assim, de responder a factores bióticos e abióticos, libertando para a rizosfera compostos bioactivos. Muitos desses compostos possuem vasta aplicação industrial e têm, para a planta, funções de reserva e/ou defensivas.

O habitat da maioria das raízes condicionou, durante muito tempo, por falta de meios adequados de estudo, o reconhecimento do seu funcionamento e da sua biologia. Contudo, os avanços recentes em engenharia genética de plantas, têm contribuído para um conhecimento mais aprofundado deste órgão. A possibilidade de fazer crescer isoladamente, e de manter *in vitro*, culturas de raízes transgênicas de diversas espécies de plantas, permite obter o conhecimento básico indispensável para manipular, de forma controlada, o seu potencial à escala molecular, bioquímica e ecológica.

Palavras-chave: raízes transgênicas, cultura *in vitro*, voláteis, óleos essenciais, *Achillea millefolium*, *Anethum graveolens*, *Levisticum officinale*, *Pimpinella anisum*.

ABSTRACT

Frequently referred as the "hidden half of the plants", the roots are much more important than what their habitat, usually underground, would foresee. The roots have the capability of synthesizing a large diversity of secondary metabolites, as well as to react to both biotic and

abiotic factors, releasing bioactive compounds to the rhizosphere. Several of these compounds possess a wide industrial applicability, and bear, to the plant, storing and/or defensive functions.

The habitat of most of the roots and the lack of the appropriate methodologies hindered, during many years, the recognition of their behaviour and of their biology. Nevertheless, the recent advances in genetic engineering contributed to a deeper knowledge of this organ. The ability to grow, and maintain *in vitro*, isolated transgenic roots from a broad range of species, allowed the achievement of the basic knowledge to manipulate, under a controlled way, their potential at molecular, biochemical and ecological level.

Key-words: hairy roots, *in vitro* culture, volatiles, essential oils, *Achillea millefolium*, *Anethum graveolens*, *Levisticum officinale*, *Pimpinella anisum*.

1 - INTRODUÇÃO

Muitos dos compostos extraídos das plantas são na forma de extractos mais ou menos complexos. Mais raramente, as substâncias isoladas são utilizadas na síntese ou semi-síntese de outros compostos. Muitas vezes um mesmo princípio activo pode ser extraído de diferentes plantas. A escolha é feita, tendo em mente, entre outros, o ciclo de vida da planta, o rendimento de extracção, a natureza dos compostos, o custo da planta, o custo de manutenção e a ausência de compostos tóxicos. Contudo, existem vários factores que limitam uma produção homogênea e continuada de metabolitos de origem vegetal e que fazem com que a indústria procure vias alternativas para obter os mesmos compostos. Neste contexto, a produção de metabolitos secundários por culturas de células, constitui uma via alternativa aos métodos tradicionais de cultura.

Contudo, a produção de metabolitos secundários é um processo que frequentemente depende de um controlo metabólico estrito, envolvendo processos multi-enzimáticos, e está, muita vezes, associada a estruturas secretoras específicas. Por este motivo, nem sempre é fácil manipular e/ou controlar os níveis de produção em culturas indiferenciadas. A cultura *in vitro* de tecidos organizados, como raízes, pode oferecer uma via alternativa/complementar à da cultura de células em suspensão (I'guereido, 1998).

Em 1934, Philip White, o pioneiro da tecnologia da cultura *in vitro* de plantas, mostrou que raízes de tomate em cultura podiam regenerar, num meio base simples, novas raízes com uma morfologia radicular primária normal. Estas culturas foram mantidas durante mais de duas décadas em meio

líquido, com subcultura periódica. Embora essa cultura tenha sido utilizada por fisiologistas, para o estudo do crescimento e nutrição de raízes, talvez pelo seu crescimento lento, foi negligenciada do ponto de vista de produção de metabolitos secundários.

O interesse pela cultura de raízes foi renovado no início dos anos 80. Por um lado, reconheceu-se que culturas de células em suspensão de *Solanaceae*, que produziam apenas quantidades vestigiais de alcalóides, viam a produção substancialmente aumentada, com a regeneração de raízes. Por outro lado, o interesse crescente na utilização de *Agrobacterium* em engenharia genética de plantas, aliado ao desenvolvimento de novas tecnologias não invasivas estimularam a investigação deste órgão (Flores & Medina Bolívar, 1995; Flores *et al.*, 1999).

Na natureza, a infecção de plantas com *Agrobacterium rhizogenes* induz a síntese de opinas na planta hospedeira, que não as utiliza, mas que constituem, para a bactéria, uma fonte de energia, de carbono e de azoto. A bactéria é ainda o agente causal do síndrome "hairy roots" ("raízes peludas", raízes transgênicas ou raízes transformadas), i. e., da proliferação, no local de infecção, de raízes com elevado grau de ramificação e numerosos pêlos radiculares.

As raízes formadas em resposta à infecção podem ser removidas, e mantidas assepticamente em meio sem fitoreguladores. O fenótipo "hairy roots" é estável em cultura, e o crescimento muito mais rápido do que o das correspondentes culturas de raízes não transformadas.

A vantagem da utilização de culturas de raízes transformadas deve-se, basicamente, ao facto de 1) as culturas terem um crescimento rápido, na ausência de fitoreguladores exógenos, o que se traduz numa elevada produção de biomassa por unidade de tempo, 2) fornecerem integridade e longevidade celulares, o que determina maior estabilidade de produção e 3) serem estruturas que produzem elevados níveis de metabolitos específicos.

Conhecem-se, actualmente, culturas de raízes transgênicas de cerca de 200 espécies de plantas, na sua maioria dicotiledóneas, englobando, pelo menos, 30 famílias de plantas (Flores *et al.*, 1999). Neste contexto, as raízes transgênicas evoluíram num sistema experimental único, devido às suas elevadas taxas de crescimento e capacidade biossintética. Constituem ainda um bom sistema para o estudo de vias metabólicas, para a análise das relações entre o metabolismo primário e secundário, dos factores fisiológicos e ambientais que afectam a produção, dos mecanismos de descontaminação (utilização de plantas para remover poluentes do ambiente, ou para os tornar inofensivos). Além disso permitem estudar a morfologia e crescimento radiculares, a regeneração de plantas transgênicas e as relações organismos-raízes (fungos, nemátodes, insectos). Estas

associações são, em muitos casos, responsáveis por uma alteração no metabolismo das raízes que se traduz, por exemplo, no seu acastanhamento e na indução da produção de poliacetilenos, como potencial resposta defensiva (Flores *et al.*, 1999). Uma aparente limitação das raízes transgênicas parece ser o de, em alguns casos, só se desenvolver uma estrutura primária, sendo que, na natureza, a especialização da produção está muitas vezes associada ao desenvolvimento de uma estrutura secundária.

Com este trabalho pretende-se mostrar alguns dos resultados obtidos no nosso laboratório sobre o estudo das potencialidades das raízes transgênicas na produção de óleos essenciais.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal: As raízes transgênicas de *Pimpinella anisum*, *Achillea millefolium*, *Anethum graveolens* e *Levisticum officinale*, foram obtidas como referido em Santos *et al.* (1998a), Lourenço *et al.* (1999), Lourenço *et al.* (1997) e Santos *et al.* (2000), respectivamente.

As raízes das plantas mãe, utilizadas nos estudos comparativos da composição do óleo essencial, foram obtidas após sementeira em vaso, no caso de *P. anisum*, *A. graveolens* e *L. officinale*, ou de plantas de *A. millefolium* obtidas no Jardim Botânico de Lisboa.

Manutenção das Raízes Transgênicas em Meio Líquido: A subcultura das raízes transgênicas foi efectuada, com intervalos de quinze dias a três semanas, por renovação do meio de cultura, ou decantando o meio usado e distribuindo aproximadamente uma quantidade equivalente de massa de raízes por dois Erlenmeyers contendo meio fresco. As culturas foram mantidas a 22°C sob agitação orbital (80 rpm), quer às escuras quer sob fotoperíodo de 16h luz ($37 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ - lâmpadas fluorescentes "day-light").

Determinação do crescimento das raízes transgênicas: O estudo do padrão de crescimento das raízes transgênicas mantidas em Erlenmeyer foi realizado pelo método de desassimilação ou por determinação da variação do peso seco e peso fresco, como referido em Santos *et al.* (1998a; 1999), Lourenço *et al.* (1999). Nos estudos em biorreactor de coluna ("bubble tower") determinou-se a variação do peso seco e peso fresco (Figueiredo *et al.*, 2000).

Isolamento dos Óleos Essenciais e Análise por GC e GC-MS: Os óleos foram isolados e analisados como referido em Santos *et al.* (1998a; 1999) e Lourenço *et al.* (1999).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais representam os constituintes aromáticos das plantas, e têm sido utilizados, desde a antiguidade, como fármacos, na produção de perfumes e cosméticos e como aromatizantes e agentes antimicrobianos e antioxidantes, nas indústrias agro-alimentares. Os óleos essenciais encontram-se entre os compostos mais importantes produzidos pelas plantas. Cite-se, a título de exemplo, que os compostos terpênicos presentes nos óleos essenciais (mono-, sesqui- e diterpenos), constituem o segundo grupo de substâncias de maior importância do ponto de vista medicinal. Alguns desses óleos têm um elevado valor comercial, $\geq \$1000\text{kg}^{-1}$, como seja o óleo de jasmim, ou o de rosa Búlgara ou Turca. A importação de óleos essenciais pela EC e US representa um valor de \$400 e \$200 milhões / ano, respectivamente (Deans & Svoboda, 1993).

O número de estudos sobre a produção de óleos essenciais por raízes transgênicas é, contudo, escasso (Figueiredo, 1998). Com efeito, estes compostos colocam problemas adicionais, como sejam a sua hidrofobia, a sua potencial toxicidade mesmo em concentrações reduzidas, e o facto de, nas plantas, serem acumulados em estruturas secretoras diferenciadas.

À semelhança do que se observa com culturas de raízes transgênicas produtoras de outros tipos de metabolitos secundários (Flores & Medina-Bolivar, 1995; Flores *et al.*, 1999), as culturas produtoras de óleos essenciais, iniciadas e mantidas no laboratório, têm evidenciado estabilidade biossintética. Com efeito, as culturas originais de *Pimpinella anisum*, *Achillea millefolium*, *Anethum graveolens* e *Levisticum officinale*, mantidas há respectivamente, 6, 5, 5 e 2 anos, com repicagens quinzenais ou de três em três semanas, não têm revelado alteração da sua capacidade biossintética.

Os estudos efectuados sobre a produção de metabolitos secundários por raízes transgênicas mostram um rendimento aumentado, em comparação com o das correspondentes células em suspensão. Contudo, conclui-se, em muitos casos, que a produção de metabolitos secundários está limitada à produção do mesmo tipo de compostos que são produzidos pelas raízes da planta-mãe, e que o rendimento é ainda demasiado baixo para ser rentável. Estas conclusões, baseadas nos resultados obtidos com culturas de raízes transgênicas produtoras de alcalóides (Shanks & Morgan, 1999), não se aplicam às culturas produtoras de óleos essenciais. Com efeito, quer as culturas de raízes transgênicas de *Artemisia absinthium* (Kennedy *et al.*, 1993) e *Valeriana officinalis* var. *sambuctifolia* (Grünicher *et al.*, 1995), quer as iniciadas, e mantidas, no nosso

laboratório de *P. anisum* (Santos *et al.*, 1998a), *A. millefolium* (Loureño *et al.*, 1999) e *A. graveolens* (Santos *et al.*, 2000), mostram diferenças quantitativas e qualitativas na composição do óleo essencial relativamente ao isolado das raízes das respectivas plantas-mães. Estas diferenças podem ficar a dever-se, entre outras, à falta de maturidade do sistema radicular em raízes em processo de crescimento contínuo, como se verifica *in vitro*, ao facto das raízes em cultura constituírem sistemas isolados o que pode, como tal, impedir o acesso a precursores com origem noutra parte da planta, e ainda ao facto de compostos que, na planta, são translocados da raiz para outros locais, permanecerem no seu local de síntese ou serem excretados para o meio de cultura. A estes factores acresce ainda o ambiente em cultura que, só por si, determina alterações metabólicas (Loureño *et al.*, 1999).

A capacidade biossintética parece ainda estar relacionada com a estirpe de *Agrobacterium* utilizada na indução das raízes transgénicas. Os dois tipos de culturas de raízes transgénicas de *A. millefolium* (A4 e LBA) obtidas respectivamente por infecção com a estirpe A470GUS e LBA 9402, mostram uma composição de óleo essencial claramente distinta (Loureño *et al.*, 1999). Ainda que o isovalerato de nerilo (27% e 43% para A4 e LBA, respectivamente) e o nerol (7% e 5% para A4 e LBA, respectivamente) constituam os componentes dominantes nos óleos dos dois tipos de culturas, o *epi*-cubenol, componente maioritário nas raízes da planta mãe, só é detectado nas raízes transgénicas do tipo LBA. Não só a utilização de duas estirpes de *Agrobacterium* diferentes pode ser responsável pelos resultados obtidos, como as diferenças genéticas entre indivíduos da mesma espécie, pode determinar diferentes resultados em termos de crescimento e produção (Loureño *et al.*, 1999).

Também o rendimento do óleo essencial obtido com as culturas de raízes transgénicas é significativamente diferente do obtido com as correspondentes culturas de células em suspensão, e pode, em alguns casos, igualar ou superar o da planta-mãe. Embora não existam dados na literatura que nos permitam fazer a comparação dos quatro tipos de culturas de raízes transgénicas, mantidas no laboratório, com as correspondentes culturas de células em suspensão, para *P. anisum* e *A. millefolium*, o rendimento das culturas de raízes transgénicas é 100 a 50 vezes superior ao do das correspondentes culturas de células em suspensão (Santos *et al.*, 1998a; Loureño *et al.*, 1999). Por outro lado, quando comparadas com as raízes da planta-mãe, as raízes transgénicas igualam, ou superam, em alguns casos, o rendimento obtido com aquelas (Santos *et al.*, 1998a; Loureño *et al.*, 1999). Do mesmo modo, o rendimento do óleo essencial obtido com as raízes transgénicas de *P. anisum* é semelhante ao de outras partes da planta comercialmente importantes, como sejam os frutos (Santos *et al.*, 1998a).

A manipulação da composição do meio de cultura e das condições de luminosidade (Santos *et al.*, 1999), a adição de precursores (Santos *et al.*, 1998) ou eliciadores (Duarte, 2000), a indução de regenerantes (Pereira *et al.*, 2000), e a cultura em biorreactor de coluna (ou Erlenmeyer invertido) com difusor (Figueiredo *et al.*, 2000), são algumas das estratégias que têm sido utilizadas no laboratório, na tentativa de aumentar e/ou modificar a produção de óleos essenciais por raízes transgênicas.

A manutenção de culturas de raízes transgênicas de *P. anisum* em diferentes meios de cultura, e sob condições de 16h de fotoperíodo ou permanentemente às escuras, induziu diferentes tipos de resposta, quer em termos da composição do óleo essencial, quer em termos de alterações fenotípicas (Santos *et al.*, 1999). Enquanto sob determinadas condições se manteve o fenótipo de "hairy roots", noutras as raízes desdiferenciaram-se dando origem à formação de tecido caloso, com a concomitante perda de capacidade biossintética. Em *P. anisum*, a capacidade biossintética parece, pois, directamente relacionada com o estado diferenciado das culturas, e, ao contrário das correspondentes culturas de células em suspensão, a produção nas raízes transgênicas mantém-se estável por um número indefinido de subculturas (Santos *et al.*, 1999).

As raízes transgênicas são também um bom material de base para a regeneração de plantas transgênicas. Culturas de raízes transgênicas de *P. anisum* mantidas em meio SH, às escuras, transferidas para meio MS/2 sólido, suplementado com 1 mg/l BAP ou 1 mg/l emetina, e mantidas sob fotoperíodo de 16h luz, permitiram regenerar plantas ao fim de 6 semanas. A composição do óleo essencial isolado destas plantas é semelhante à da raízes de que foram originadas e diferente da da parte aérea da planta-mãe (Pereira *et al.*, 2000).

Muitos esforços têm sido desenvolvidos para levar a produção de metabolitos secundários a um nível comercialmente sustentável, a escala de biorreactor, mas poucos sistemas se mostraram comercialmente competitivos. Ainda que existam vários exemplos de raízes transgênicas que apresentam rendimentos superiores aos dos da planta-mãe, a manutenção das culturas, em assepsia, nos tradicionais e dispendiosos biorreactores de aço inoxidável, leva a que muitas vezes o custo de processamento final não seja economicamente competitivo. Nesse caso, se não é possível diminuir as despesas de capital associadas aos reactores, só o aumento da produtividade, permite que o bioprocessamento seja economicamente viável. O biorreactor de coluna (ou Erlenmeyer invertido) com difusor constitui uma solução de baixo custo, potencialmente explorável, e mais adequado ao crescimento de órgãos diferenciados como as raízes. Contudo, os pêlos radiculares, bem como mucilagens secretadas pelas raízes podem constituir barreiras à transferência de

oxigênio. É, no entanto importante referir, que as limitações de transferência de oxigênio se verificam tanto em biorreactores como nas culturas mantidas em Erlenmeyer, sob agitação (sistema "batch").

O estudo comparativo do crescimento e produção, em biorreactor e em sistema "batch", utilizando dois volumes de inoculo (0.5 g/l e 2.5 g/l peso fresco, equivalente a 0.05 g/l e 0.2 g/l peso seco, respectivamente) de raízes transgênicas de *P. anisum*, mostrou não só que o volume final de biomassa é semelhante para os dois sistemas testados, como a composição do óleo essencial obtido em biorreactor é qualitativa e quantitativamente semelhante à obtida em sistema "batch" (Figueiredo *et al.*, 2000).

Outros ensaios estão ainda em curso, e muitos outros podem ser explorados na tentativa de induzir um aumento de produção, sem afectar o crescimento das culturas (como sejam, por exemplo, idade de inoculo, intervalo de subcultura, capacidade de biotransformação, ou a resposta à adição de adsorventes). Por outro lado, é ainda importante reconhecer, até que ponto, o desenvolvimento morfológico e fisiológico, designadamente o desenvolvimento de estruturas de crescimento secundário, pode controlar a produtividade.

3 – CONCLUSÕES

Nos últimos anos tem se verificado um interesse crescente na manipulação genética do metabolismo secundário de plantas de interesse comercial. Os resultados até agora obtidos, mostram que as técnicas de engenharia genética de plantas oferecem potencialidades promissoras na investigação futura. As raízes transgênicas constituem, neste sentido, um modelo experimental por excelência, que tem dado provas das suas capacidades biossintéticas. Contudo, a chave de futuros sucessos reside no conhecimento mais detalhado e aprofundado sobre a produção de metabolitos secundários, do ponto de vista, quer bioquímico, quer de biologia molecular e celular.

BIBLIOGRAFIA

- DEANS, S.G. & SVOBODA, K.P., 1993. Biotechnology of aromatic and medicinal plants. In: *Volatile Oil Crops* (eds. RKM Hay, PG Waterman). pp. 113-136. Longman Group UK, London.

- DUARTE, A.M.F., 2000. Estudo da influência da adição de metil jasmonato no crescimento e produção de voláteis por raízes transgênicas de *Pimpinella anisum*, Estágio Científico (PCTI - UVA).
- FIGUEIREDO, A.C., 1998. Potentialities of *in vitro* plant cultures for essential oil production, Institut für Botanik und Lebensmittelkunde, Veterinärmedizinische Universität Wien.
- FIGUEIREDO, A.C.; SANTOS, P.A.G.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; OLIVEIRA, M.M.; DEANS, S.G. & SCHEFFER, J.J.C., 2000. Hairy root cultures of *Pimpinella anisum*: growth and essential oil production in batch and bioreactor systems, *48th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research*, Zurich, Suíça.
- FLORES, H.E. & MEDINA-BOLIVAR, F., 1995. Root culture and plant natural products: "unearthing" the hidden half of plant metabolism, *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, **1**: 59-74.
- FLORES, H.E.; VIVANCO, J.M. & LOYOLA-VARGAS, V.M., 1999. "Radicale" biochemistry: the biology of root-specific metabolism, *Trends in Plant Science*, **4**: 220-226.
- GRÄNICH, F., CHRISTEN, P. & KAPETANIDIS, I., 1995. Essential oils from normal and hairy roots of *Valeriana officinalis* var. *sambucifolia*, *Phytochemistry*, **40**: 1421-1424.
- KENNEDY, A.I.; DEANS, S.G.; SVOBODA, K.P.; GRAY, A.I. & WATERMAN, P.G., 1993. Volatile oils from normal and transformed root of *Artemisia absinthium*, *Phytochemistry*, **32**: 1449-1451.
- LOURENÇO, P.M.L.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; OLIVEIRA, M.M.; DEANS, S.G. & SCHEFFER, J.J.C., 1999. Essential oils from hairy root cultures and from plant roots of *Achillea millefolium*, *Phytochemistry*, **51**: 637-642.
- LOURENÇO, P.M.L.; SANTOS, P.A.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; OLIVEIRA, M.M.; DEANS, S.G. & SCHEFFER, J.J.C., 1997. Hairy root cultures of *Anethum graveolens* L.: Establishment and composition of the essential oil, *28th International Symposium on Essential Oils*, Eskişehir, Turquia, p.30.

- PEREIRA, S.L.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; DEANS, S.G. & SCHEFFER, J.J.C., 2000. Regenerated plants from *Pimpinella anisum* hairy root cultures: morphological characterization and essential oil composition, *48th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research*, Zurique, Suíça.
- SANTOS, P.A.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; OLIVEIRA, M.M.; DEANS, S.G. & SCHEFFER, J.J.C., 1998. Effect of phenylalanine addition to *Pimpinella anisum* hairy root cultures, *Proceedings 1st International Meeting on Aromatic and Medicinal Mediterranean Plants*, Coimbra - Ansião, Portugal, p. 118-121.
- SANTOS, P.A.G.; FIGUEIREDO, A.C.; OLIVEIRA, M.M.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; DEANS, S.G. & SCHEFFER, J.J.C., 2000. Hairy root cultures of *Levisticum officinale*: establishment, and time-course study of their essential oil composition, *PSE Meeting - Future Trends in Phytochemistry*, Rolduc, Holanda, p. 15.
- SANTOS, P.M.; FIGUEIREDO, A.C.; OLIVEIRA, M.M.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; DEANS, S.G.; YOUNUS, A.K.M. & SCHEFFER, J.J.C., 1998a. Essential oils from hairy root cultures and from fruits and roots of *Pimpinella anisum*, *Phytochemistry*, **48**: 455-460.
- SANTOS, P.M.; FIGUEIREDO, A.C.; OLIVEIRA, M.M.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; DEANS, S.G.; YOUNUS, A.K.M. & SCHEFFER, J.J.C., 1999. Morphological stability of *Pimpinella anisum* hairy root cultures and time-course study of their essential oils, *Biotechnology Letters*, **21**: 859-864.
- SHANKS, J.V. & MORGAN, J., 1999. Plant 'hairy root' culture, *Current Opinion in Biotechnology* **10**: 151-155.

Gostaríamos de agradecer aos estudantes de licenciatura, de pós-graduação, Mestrandos, bolsistas e Doutorando, que têm partilhado conosco o trabalho no laboratório nos últimos anos (A.M.F. Duarte, P.M. Lourenço, S.L. Pereira, P.A.G. Santos, P.M. Santos e F.M.F. Silva), e que têm ilado um contributo ímpar para a elucidação de muito do que aqui ficou exposto. Um agradecimento ainda aos amigos e colaboradores Prof. Dr M.M. Oliveira, Prof. Dr J.J.C. Scheffer, Prof. Dr S.G. Deans e Prof. Dr J. Schripsema. Aos colaboradores internacionais que contribuíram com estirpes de *Agrobacterium* (Prof. Dr M. Teplár, INRA, França), e amostras de geiserenos (Prof. Dr Tonis van Beek, Wageningen Agricultural University, Holanda), o nosso obrigado. Estamos gratos à Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelas bolsas BIC, de Mestrado e Doutoramento concedidas. Parte deste trabalho e da sua divulgação, nacional e internacional, foi financiado pela Fundação Calouste Gulbenkian, pelas Ações Integradas Luso-Britânicas AI-B-8/95 e AI-B-20/96, e no âmbito do projecto PBIU/C/BIO/1989/95.