

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Prospecção da diversidade de Fungos Micorrízicos  
Arbusculares em 2 espécies agrícolas (*Phaseolus vulgaris* L. e  
*Vicia faba* L.) e 2 espécies nativas (*Teline maderensis* Webb &  
Berthel e *Genista tenera* (Jacq. Ex Murray) Kuntze) da Madeira**

**Mestrado em Microbiologia Aplicada**  
Dissertação

Maria Cristina Ornelas Oliveira

Dissertação orientada por:  
Professor Doutor Miguel Ângelo A. Pinheiro de Carvalho  
Professora Doutora Margarida Maria L. A. S. T. Barata

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Prospecção da diversidade de Fungos Micorrízicos  
Arbusculares em 2 espécies agrícolas (*Phaseolus vulgaris* L. e  
*Vicia faba* L.) e 2 espécies nativas (*Teline maderensis* Webb &  
Berthel e *Genista tenera* (Jacq. Ex Murray) Kuntze) da Madeira**

**Mestrado em Microbiologia Aplicada**  
Dissertação

Maria Cristina Ornelas Oliveira

Dissertação orientada por:  
Professor Doutor Miguel Ângelo A. Pinheiro de Carvalho  
Professora Doutora Margarida Maria L. A. S. T. Barata



**Prospecção da diversidade de Fungos Micorrízicos Arbusculares em 2 espécies agrícolas (*Phaseolus vulgaris* L. e *Vicia faba* L.) e 2 espécies nativas (*Teline maderensis* Webb & Berthel e *Genista tenera* (Jacq. Ex Murray) Kuntze) da Madeira**

**Mestrado em Microbiologia Aplicada**  
Dissertação

Maria Cristina Ornelas Oliveira

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi realizado na Universidade da Madeira – BG ISOPlexis/Germobanco sob a orientação direta do Professor Doutor Miguel Ângelo A. Pinheiro de Carvalho no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

2015

*“Results! Why, man, I have gotten a lot of results! I know several thousand things that won’t work.”*

**Thomas Edison**

# Agradecimentos

---

À Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e aos professores do Mestrado em Microbiologia Aplicada, pelo excelente trabalho e por proporcionarem aos alunos uma pós-graduação de excelência.

À Universidade da Madeira e ao BG ISOplexis pelo acolhimento que permitiu a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Miguel Ângelo de Carvalho, orientador externo, por me ter acolhido no grupo, pela orientação e incentivo no desenvolvimento deste tema. Pelas oportunidades proporcionadas de aprendizagem e novos desafios. E pelo aconselhamento e revisão da escrita deste trabalho.

À Professora Doutora Margarida Barata, orientadora interna, pelo seu contributo no meu gosto pela micologia. Pelo acolhimento e orientação na disciplina de Iniciação à Investigação. Pelo incentivo e disponibilidade que demonstrou, quer no primeiro ano de curso, quer durante o ano de dissertação, e pela revisão crítica deste manuscrito.

À Vera, Cássia, Elizabete, Mara e Aurélio pela amizade, boa companhia, diversão e passeios, momentos indispensáveis à minha estadia em Lisboa e dos quais só ficaram boas memórias.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, pelas conversas, discussões e sugestões durante a execução do trabalho experimental e escrita da dissertação. Pelas conversas descontraídas de café e pelo bom ambiente de trabalho.

Um especial OBRIGADA ao Humberto, Gregório e Gonçalo, por me acompanharem e orientarem nas saídas de campo, pelos ensinamentos sobre plantas e por sempre acreditarem no meu trabalho.

Aos meus pais, por sempre me incentivarem nos estudos e por acreditarem nas minhas capacidades. Pelo carinho, conselhos, conversas nesta fase e por todo o apoio e amor que me deram ao longo de toda a minha vida.

E por último, mas sem dúvida não menos importante, aos meus irmãos, porque sem eles não teria chegado até aqui com certeza.

# Resumo

---

O Filo Glomeromycota compreende um grupo de fungos que se considera no geral serem biotróficos obrigatórios e que se associam a cerca de 80% das plantas. O fungo e a planta formam uma associação simbiótica conhecida como micorriza arbuscular. Desta associação, o fungo absorve entre 5 a 20% do carbono fotossintetizado pela planta e por outro lado a planta pode beneficiar do aumento da absorção de nutrientes, nomeadamente de fósforo e azoto, promovido pela simbiose. Adicionalmente, estes fungos podem melhorar a tolerância a *stresses* bióticos e abióticos. Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) podem afetar um ecossistema inteiro, devido às extensas redes de micélio e esporos produzidas, que podem conectar um grande número de diferentes plantas, para além de que são uma fonte de nutrição para outros microrganismos.

Para a Madeira estão descritas apenas duas espécies de FMA e não se conhecem estudos sobre a biodiversidade destes microrganismos na ilha, nem a sua distribuição. A fim de colmatar esta lacuna selecionou-se duas plantas endémicas (*Teline maderensis* Webb & Berthel. e *Genista tenera* (Jacq. ex Murray) Kuntze) e duas agrícolas (*Vicia faba* L. e *Phaseolus vulgaris* L.), colhidas, cada uma delas em três localizações diferentes, para estudar a biodiversidade de FMA que as colonizam.

Os resultados indicam que a colonização das raízes das plantas em estudo está correlacionada com as características bioquímicas do solo, nomeadamente por P, N, K, Cu, Mg, pH e Grau de saturação. Relativamente à diversidade e composição das comunidades de FMA das raízes das plantas, verificou-se que esta é também influenciada pelas características do solo, bem como pelo hospedeiro. Os dendrogramas obtidos a partir das técnicas DGGE e RFLP distribuem as espécies agrícolas em diferentes *clusters* e colocam espécies endémicas, num único *cluster*, indicando que as comunidades de FMA que colonizam as raízes destas últimas são muito próximas. Este resultado é, possivelmente, consequência da similaridade das características dos seus solos, situação que não se verificou para os solos das plantas agrícolas. A análise estatística e molecular mostra que a altitude não teve influência nem nos índices de colonização arbuscular micorrízica, nem na diversidade e composição das comunidades de FMA em estudo.

**Palavras-chave:** Biodiversidade, microbiologia do solo, culturas agrícolas, plantas endêmicas, fungos, micorrizas arbusculares.

# Abstract

---

The phylum Glomeromycota comprises a group of fungi that are considered generally to be obligate biotrophic and they can be associated to around 80% of vascular plants on Earth. Fungi and plant form a symbiotic association known as arbuscular mycorrhizae. The fungus absorb about 5 to 20% of the carbon photosintetized by the plant and in the other hand plant can beneficiate by the enhancement of nutrient assimilation, mainly phosphate and nitrogen. In addition, it can enhance the tolerance of biotic and abiotic *stresses*. Arbuscular Micorrhizal Fungi (AMF) might impact an entire ecosystem by producing extensive underground networks, composed by hyphae and spores. These networks can connect a great number of unrelated plants and can be a nutritional source for microbial communities.

To Madeira Island, it is described only two AMF species and there are no known studies about FMA biodiversity to the island, neither about its distribution. Therefore, we pick two endemic plants (*Teline maderensis* Webb & Berthel. and *Genista tenera* (Jacq. ex Murray) Kuntze) and two crops (*Vicia faba* L. and *Phaseolus vulgaris* L.). They were sampled on three different places to quantify and analyze the biodiversity of the FMA that colonize the root of these plants.

The results show us that plant root colonization by AMF is correlated with soil composition, mainly P, N, K, Cu, Mg, pH and soil's degree saturation. Concerning to biodiversity and composition of the AMF community colonizing roots, we found that both soil factors and host plant has influence on it. Generated dendrograms from DGGE and RFLP techniques distribute crop species in different clusters, and endemic species were grouped in only one cluster, pointing that their communities are very similar. We thought this was because of similar soil biochemical characteristics that haven't been seen in crop's soil. Statistical and molecular analysis shows that altitude doesn't interfere with root colonization neither with biodiversity and composition of the AMF community colonizing roots.

**Key-words:** Biodiversity, soil microbiology, crops, endemic plants, fungi, arbuscular mycorrhizae.



# Índice

---



Índice de figuras .....	ix
Índice de tabelas .....	x
Abreviaturas e Siglas.....	xi

## Índice Geral

Introdução .....	1
Posição Taxonómica dos FMA .....	1
Associação Arbuscular Micorrízica .....	3
O Papel dos FMA na Nutrição das Plantas .....	3
Papel dos FMA na proteção das plantas.....	6
Estado dos conhecimentos sobre FMA na Madeira .....	8
Análise de Comunidades de FMA .....	8
Objetivos .....	11
Material e Métodos .....	12
Recolha de amostras.....	12
Processamento das raízes .....	13
Coloração das raízes.....	14
Quantificação da colonização micorrízica .....	14
Extração de DNA .....	15
Análise <i>Nested-PCR</i> .....	16
PCR/DGGE .....	17
RFLP .....	18
Tratamento dos dados .....	18
Resultados e Discussão .....	19
Colonização micorrízica arbuscular .....	19
Quantificação da colonização micorrízica .....	25
Extração de DNA das raízes.....	26
Análise Molecular .....	27
Conclusões .....	35
Perspetivas Futuras.....	36
Bibliografia .....	37
Anexos.....	45
Preparação de soluções.....	45
A – Quantificação de raízes .....	45
B – Extração de DNA.....	45
Análise Estatística .....	48

# Índice de Figuras

---

- Figura 1** – Classificação do Filo Glomeromycota proposto recentemente por Redecker et al. (2013), (figura retirada de Morton (2013)). ..... 2
- Figura 2** – Mapa da ilha da Madeira indicando os locais onde foram encontradas as espécies endémicas em estudo, *Genista tenera* e *Teline maderensis*. ..... 12
- Figura 3** – Esquema ilustrativo do exame microscópico das raízes colonizadas por Fungos Micorrízicos Arbusculares (Figura retirada de Brundrett (2008)). ..... 14
- Figura 4** – Percentagem média de colonização por FMA nas espécies *Teline maderensis*, *Genista tenera*, *Vicia faba* e *Phaseolus vulgaris*. CA representa a colonização por arbúsculos, CV colonização por vesículas e CH colonização por hifas. No topo de cada gráfico é apresentada a altitude dos locais de recolha. .... 22
- Figura 5** – Raízes de *Vicia faba* coradas com Azul de Trypan. A) Visão ampla da raiz colonizada por FMA (ampliação 100x). A seta aponta para o apressório; B) Arbúsculos no interior das células (ampliação 400x); C) Clamidosporos formados no interior da raiz (ampliação 1000x)..... 26
- Figura 6** – Parte do gene correspondente à subunidade 18S do rRNA com a posição de ligação dos primers utilizados neste trabalho. A seta  assinala os primers forward e a seta  assinala os primers reverse. .... 29
- Figura 7** – Eletroforese em gel de agarose. A) Primers universais NS1/NS4; B) Primers AML1-AML2; C) Primers nu-SSU-0817/AML2-GC. Identificação das amostras: 1) *Teline maderensis* (Encumeada), 2) *Genista tenera* (Faial), 3) *Vicia faba* (Faial), 4) *Phaseolus vulgaris* (Faial), 5) *Teline maderensis* (Ginjas)..... 29
- Figura 8** – Dendrograma obtido pelo método hierárquico UPGMA e coeficiente de Dice. Opt. 0,5 e Tol. 1,0%-1,0% foram os valores estipulados para normalização das bandas. As amostras estão identificadas consoante indicado nos métodos, ao número acrescentaram-se as iniciais das espécies (TM – *Teline maderensis*; GT – *Genista tenera*; VF – *Vicia faba*; PV – *Phaseolus vulgaris*) e após o hífen a inicial do local de recolha (E – Encumeada; F – Faial; G – Ginjas; C – Cruzinhas). ..... 31
- Figura 9** – Dendrograma de consenso entre os padrões obtidos pelas duas enzimas de restrição. Opt. 0,5 e Tol. 1,0%-1,0% foram os valores estipulados para normalização das bandas. As amostras estão identificadas consoante indicado nos métodos, ao número acrescentaram-se as iniciais das espécies (TM – *Teline maderensis*; GT – *Genista tenera*; VF – *Vicia faba*; PV – *Phaseolus vulgaris*) e após o hífen o local de recolha (E – Encumeada; F – Faial; G – Ginjas; C – Cruzinhas). ..... 32
- Figura 10** – Dendrograma de consenso entre os padrões obtidos pelas duas técnicas. Opt. 0,5 e Tol. 1,0%-1,0% foram os valores estipulados para normalização das bandas. As amostras estão identificadas consoante indicado nos métodos, ao número acrescentaram-se as iniciais das espécies (TM – *Teline maderensis*; GT – *Genista tenera*; VF – *Vicia faba*; PV – *Phaseolus vulgaris*) e após o hífen o local de recolha (E – Encumeada; F – Faial; G – Ginjas; C – Cruzinhas). ..... 33

# Índice de Tabelas

---

<b>Tabela 1</b> – Localização e altitude em que foram colhidas as quatro espécies em estudo ( <i>Teline maderensis</i> , <i>Genista tenera</i> , <i>Vicia faba</i> e <i>Phaseolus vulgaris</i> ).....	13
<b>Tabela 2</b> – Valores da colonização das espécies em estudo por MA. A tabela apresenta as espécies, o local de amostragem e a percentagem média de colonização. As taxas de colonização equivalem à colonização por hifas (CH), o seu cálculo efetua-se pela divisão das interseções não-negativas pelo total de interseções analisadas.....	20
<b>Tabela 3</b> – Análise estatística da relação entre as taxas de colonização pelo FMA e os parâmetros físicos, matéria orgânica e macro e micronutrientes dos solos nos locais de amostragem das espécies estudadas. Na tabela são apresentadas as correlações significativas entre a colonização por hifas (CH), arbuscular (CA) e vesicular (CV) e os valores da análise dos solos.....	25
<b>Tabela 4</b> – Comparação dos métodos de extração de DNA através da tabela gerada pelo software do NanoDrop, utilizando duas amostras diferentes com elevada concentração de polissacarídeos. O prefixo da identidade das amostras indica o método de extração que foi utilizado (CTAB – extração com CTAB; CS – extração pelo método de Chao e Somers). As últimas duas colunas apresentam os rácios de absorvâncias após uma purificação extra com NaCl.....	27
<b>Tabela 5</b> – Teste ANOVA para a variável independente “espécies”. A diferença média é significativa no nível 0,05, assinalada a negrito.....	48
<b>Tabela 6</b> – Comparações múltiplas entre espécies, com variável dependente CH. Espécies: 1) <i>Teline maderensis</i> , 2) <i>Genista tenera</i> , 3) <i>Vicia faba</i> , 4) <i>Phaseolus vulgaris</i> . A diferença média é significativa no nível 0,05, assinalada a negrito.....	48
<b>Tabela 7</b> – Comparações múltiplas entre espécies, com variável dependente CA. Espécies: 1) <i>Teline maderensis</i> , 2) <i>Genista tenera</i> , 3) <i>Vicia faba</i> , 4) <i>Phaseolus vulgaris</i> . A diferença média é significativa no nível 0,05, assinalada a negrito.....	49
<b>Tabela 8</b> – Comparações múltiplas entre espécies, com variável dependente CV. Espécies: 1) <i>Teline maderensis</i> , 2) <i>Genista tenera</i> , 3) <i>Vicia faba</i> , 4) <i>Phaseolus vulgaris</i> . A diferença média é significativa no nível 0,05, assinalada a negrito.....	49
<b>Tabela 9</b> – Teste ANOVA para a variável independente “tipo de solo”. A diferença média é significativa no nível 0,05, assinalada a negrito.....	50
<b>Tabela 10</b> – Teste ANOVA para a variável independente “altitude”. A diferença média é significativa no nível 0,05.....	50

# Abreviaturas e Siglas

---

**ABA** – Acrilamida/Bis-Acrilamida

**BLAST** – Basic Local Alignment Search Tool

**CA** – Colonização arbuscular

**CEC** – Cation Exchange Capacity

**CH** – Colonização por hifas

**CTAB** – Cetyl-Trimethylammonium-Bromide

**CV** – Colonização Vesicular

**DGGE** – Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis

**DNA** –Desoxirribonucleotid Acid

**EDTA** – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

**FMA** – Fungos Micorrízicos Arbusculares

**GPS** – Global Positioning System

**ITS** – Internal Transcribed Spacers

**LSU** – Large Sub-unit

**MA** – Micorrizas arbusculares

**NPK** – Azoto-Fósforo-Potássio

**OTU** – Operational Taxonomic Unit

**PCR** – Polimerase Chain Reaction

**PVLG** – Polivinil-Lacto-Glicerol

**RFLP** – Restriction Fragment Length Polymorphism

**rDNA** – Ribossomal Desoxirribonucleotid Acid

**rRNA** – Ribossomal Ribonucleotid Acid

**SSCP** – Single Stranded Conformation Polymorphism

**SSU** – Small Sub-unit

**STE** – Sacarose-Tris-EDTA

**TGGE** – Temperature Gradient Gel Eletrophoresis

**T-RFLP** – Terminal Restriction Fragment Length Polymorfism

**UPGMA** – Unweighted Pair Group With Mathematical Averages

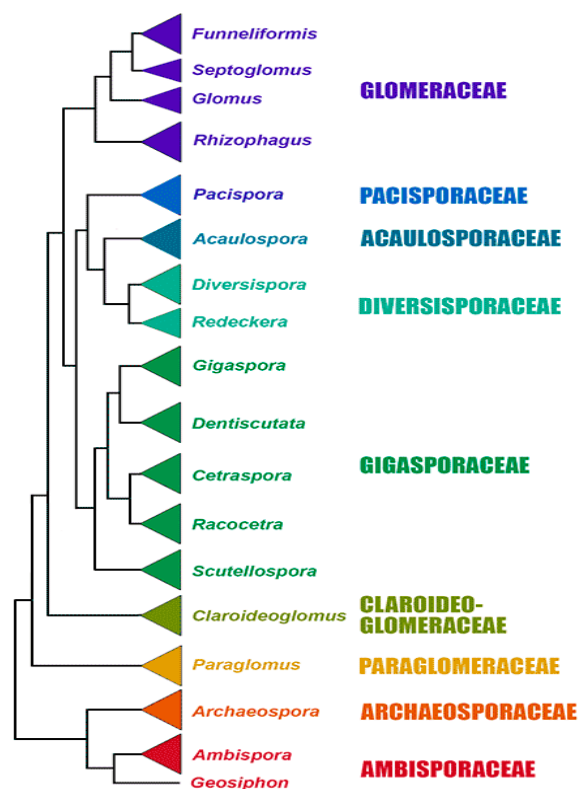
## Introdução

O solo alberga uma enorme diversidade de microrganismos, incluindo bactérias, protozoários, algas, e fungos (Prescott, 2002). Os fungos desempenham um papel importante em vários processos microbiológicos e ecológicos, influenciando a fertilidade do solo, decomposição, reciclagem de nutrientes e matéria orgânica, assim como na nutrição e sanidade das plantas. Estes seres heterotróficos requerem fontes externas de carbono que os levam a adotar diferentes estratégias que vão desde o saprofitismo (decomposição de matéria orgânica) ao parasitismo ou à simbiose (Finlay, 2008). Este trabalho centra-se num dos tipos de simbiose mais comuns na natureza, as micorrizas. O termo “mycorrhiza”, que significa “fungo + raiz”, foi usado pela primeira vez em 1885 para descrever as associações mutualísticas que ocorrem entre raízes das plantas e fungos (Harrison, 1997). Sete tipos de associações micorrízicas são descritos na literatura, diferindo nas características morfológicas e ainda nas espécies de fungos e plantas envolvidos (Finlay, 2008). Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) compreendem a forma mais abundante de associação micorrízica, formando associações mutualistas com mais de 80% das plantas vasculares (Brundrett, 2002). Esta associação é relativamente não específica, altamente compatível, representando um mutualismo de longa duração, onde os dois intervenientes são beneficiados. A planta fornece ao fungo os açúcares sintetizados como resultado da fotossíntese e, por outro lado, o fungo facilita a aquisição de água e nutrientes à planta, através do aumento da sua área de absorção. Por esta razão, os FMA tem um papel de grande importância na microbiota de solos naturais e agrícolas (Harrison, 1998; Cruz *et al.*, 2009).

## Posição Taxonómica dos FMA

Os FMA terão surgido entre 462 e 353 milhões de anos atrás, coincidindo o seu aparecimento com a proliferação das plantas na superfície terrestre, o que leva a que se acredite que estes fungos possam ter facilitado o processo de colonização (Simon *et al.*, 1993; Redecker *et al.*, 2000). Inicialmente os FMA foram colocados no Filo Zygomycota, ordem Glomerales. No entanto, devido à dificuldade em classificar certos FMA, nomeadamente *Glomus macrocarpum*, foi necessário reclassificar este grupo de fungos. Uma análise filogenética das sequências génicas da subunidade 18S (SSU – Small Sub-unit) do RNA ribossómico (rRNA) e a sua conjugação com as características morfológicas e ecológicas dos fungos foi possível justificar a criação do Filo Glomeromycota que engloba este grupo de fungos (Schüßler *et al.*, 2001). O novo Filo

ficou caracterizado como sendo um grupo constituído por fungos que, na sua generalidade, são biotróficos obrigatórios, completando o seu ciclo de vida apenas na presença de um hospedeiro. A maioria destes fungos forma as já mencionadas micorrizas arbusculares (Schüßler *et al.*, 2001; Schüßler and Walker, 2010). Os Glomeromycota foram divididos em quatro Ordens: Glomerales, Diversisporales, e as duas linhagens ancestrais descobertas na altura, Paraglomerales e Archaeosporales (Schüßler *et al.*, 2001). Mais tarde, a publicação de novas *taxa* dentro do Filo Glomeromycota começou a criar dificuldades operacionais para quem trabalha com FMA, traduzindo-se numa classificação filogenética pouco robusta. No sentido de ultrapassar estas dificuldades, um grupo de especialistas na biologia e taxonomia dos FMA reuniu-se para chegar a um consenso e propor uma sistemática robusta e estável do Filo Glomeromycota à restante comunidade científica, baseada em critérios bem definidos (Redecker *et al.*, 2013). A classificação proposta é apresentada na figura 1.



**Figura 1** — Classificação do Filo Glomeromycota proposto recentemente por Redecker et al. (2013), (figura retirada de Morton (2013)).

Embora algumas classes estejam bem caracterizadas, sendo apoiadas por dados morfológicos e moleculares, continuam a existir classes que geram controvérsia, levando a que a classificação seja continuamente revista pelos especialistas (Bills and Morton, 2015).

## **Associação Arbuscular Micorrízica**

A troca de sinais e o reconhecimento entre plantas hospedeiras e FMA inicia-se antes de estas entrarem em contacto físico. As potenciais plantas hospedeiras exsudam metabolitos, através das raízes que propiciam a germinação dos esporos e o crescimento fúngico (Gianinazzi-Pearson, 1996). O fungo produz inicialmente uma hifa simples e sem ramificações sustentada pelas reservas de triglicéridos e glicogénio existentes no esporo. Quando a hifa entra em contacto com o hospedeiro, forma-se o apressório e todo o processo de penetração na raiz do hospedeiro é estritamente coordenado pela planta e pelo fungo (Sawers *et al.*, 2008b). As células das raízes em contacto com as estruturas de colonização não apresentam qualquer alteração citológica ou respostas típicas de defesa, deixando que o fungo invada a raiz inter e intracelularmente, embora sem nunca atravessar a membrana citoplasmática (Gianinazzi-Pearson, 1996; Sawers *et al.*, 2008b).

Os FMA possuem hifas asseptadas, pelo menos enquanto novas, que ao penetrarem nas células da raiz formam estruturas ramificadas conhecidas como arbúsculos, através das quais se processam as trocas de elementos e compostos entre o fungo e o hospedeiro. A maioria forma também vesículas que se diferenciam dentro ou fora das células, facto que levou, em tempos, a que se chamasse a esta associação de “micorizas vesiculares-arbusculares”. Estas estruturas são locais de armazenamento que mais tarde podem servir de estruturas de reprodução (Habte and Osorio, 2001). No exterior, os FMA produzem no subsolo redes de hifas e esporos muito extensas, que podem interconectar um grande número de espécies de plantas não relacionadas entre si, provocando impacto na biodiversidade de um todo o ecossistema. Algumas espécies são, também, capazes de formar esporos dentro das raízes do hospedeiro (Corradi and Bonfante, 2012).

A relação entre custos e benefícios, e consequentemente a resposta da planta à micorriza, pode depender das características dos intervenientes e das condições edáficas e ambientais do *habitat* (Brundrett, 1991; Johnson *et al.*, 1997; Chandrasekaran *et al.*, 2014).

## **O Papel dos FMA na Nutrição das Plantas**

As micorizas mobilizam e transportam nutrientes para as raízes, aumentando, desta forma, a capacidade de absorção do hospedeiro (Duponnois *et al.*, 2008). Os FMA absorvem N, P, K, Ca, S, Fe, Mn, Cu e Zn do solo e transportam-nos para as plantas hospedeiras. No entanto, o seu efeito nutricional mais consistente e importante é o aumento da absorção de nutrientes imóveis como P, Cu e Zn (Habte and Osorio, 2001).

Cu e Zn são dois nutrientes que são necessários às plantas, em pequenas quantidades (Taiz, 2010), daí que não estejam tão estudados os benefícios dos FMA na sua aquisição.

O Fósforo (P) é um dos 17 nutrientes essenciais ao crescimento das plantas, estando envolvido em vários processos bioquímicos, tais como a transferência de energia, fotossíntese, transformação de açúcares e amido, transporte de nutrientes e transferência de características genéticas de geração para geração. As suas funções não podem ser substituídas por nenhum outro nutriente, daí que um fornecimento adequado de P seja muito importante para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Sultenfuss and Doyle, 1999). A sua aquisição é muitas vezes um fator limitante do crescimento das plantas devido à sua baixa biodisponibilidade (solubilidade e mobilidade) nos solos (Bever *et al.*, 2001). O aumento da absorção deste nutriente como consequência da formação de micorrizas traduz-se, portanto, numa melhoria do desenvolvimento das plantas hospedeiras. As hifas fúngicas são capazes de explorar um volume enorme de solo e adquirir fosfato inorgânico (Pi) para além da zona de depleção que rapidamente se forma em torno da superfície das raízes das plantas, devido à baixa mobilidade do P no solo e rápida absorção pelas raízes (Bucher, 2007; Hodge *et al.*, 2010). Um estudo levado a cabo por Harrison e Buuren (1995) demonstrou a existência de transportadores trans-membranares, com alta afinidade para o fosfato no micélio extra-radicular de FMA. O fosfato livre é captado para o seu interior através destes transportadores e provavelmente transportado dentro do fungo como polifosfatos (polyP). Dentro das hifas intra-radulares, as cadeias longas dos polifosfatos são hidrolisadas facilitando a transferência para a planta hospedeira (Harrison and Buuren, 1995; Siddiqui and Pichtel, 2008; Hodge *et al.*, 2010). O efeito positivo da simbiose depende fortemente da disponibilidade de P no solo, podendo auxiliar também em situações de utilização a longo-termo de fertilizantes NPK, em que o P acumula-se no solo devido à baixa disponibilidade para as plantas (Hu *et al.*, 2010).

Tal como o fósforo, o azoto (N) também é um nutriente limitante no crescimento das plantas, pois entra na constituição de elementos essenciais às plantas, tais como aminoácidos, amidas, proteínas, ácidos nucleicos, nucleótidos e coenzimas. (Taiz, 2010). A deficiência em N origina várias alterações morfológicas e fisiológicas na planta, resultando numa forte inibição do crescimento da planta. Guidi e colaboradores (1997) reportaram alterações como a diminuição de matéria seca, diminuição da área foliar ou alterações na capacidade fotossintética. O nitrogénio está disponível no solo



sob a forma de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Embora a apetência das plantas para as duas formas de nitrogénio varie devido à sua adaptação às condições do solo, no geral, as plantas têm um desenvolvimento mais adequado se tiverem acesso a  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , porque a absorção e assimilação das duas formas de nitrogénio promove um equilíbrio catião-anião dentro na planta (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010; Taiz, 2010). No entanto, quando estão sujeitas a uma deficiência em N ou crescem em locais com excesso de água ou em solos ácidos, as plantas têm preferência para o ião amônio. Este ião tem mobilidade no solo mais baixa do que o nitrato, o que faz com que se forme uma zona de depleção à volta das raízes das plantas (Sawers *et al.*, 2008a; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Esta situação poderá ser ultrapassada quando a planta está associada a um fungo micorrízico arbuscular, já que o micélio extra-radicular dos AMFs é capaz de absorver nitratos, amônio e aminoácidos do solo (Johansen *et al.*, 1996; Hawkins *et al.*, 2000; Sawers *et al.*, 2008a), sendo que o  $\text{NH}_4^+$  é considerado a forma que é assimilada preferencialmente ou mais rapidamente (Jin *et al.*, 2012). A transferência de N do fungo para a planta foi confirmada por ensaios *in vitro* e em vasos e demonstrou-se que a quantidade transferida para a planta pode ser significativa e vantajosa (Ames *et al.*, 1983; Frey and SchÜEpp, 1993; Jin *et al.*, 2005; Azcón *et al.*, 2008; Barrett *et al.*, 2011). No entanto não se pode deixar de ter em atenção que essa transferência pode estar dependente das condições a que as plantas e o fungo estão sujeitas. O processo pelo qual a transferência ocorre tem sido objeto de estudo de vários investigadores (Jin *et al.*, 2012; Hodge and Storer, 2015). Conhecer melhor a forma como o N é assimilado, transportado e transferido para a planta numa associação arbuscular micorrízica e em que situações essa transferência é significativa, é um passo importante para a utilização destes microrganismos numa agricultura sustentável (Barrett *et al.*, 2011; Criado *et al.*, 2015).

A rede de hifas criada pela micorriza pode contribuir para satisfazer cerca de 80% e 25% das necessidades de uma planta em fósforo e azoto, respetivamente (Marschner and Dell, 1994). Por outro lado, apenas entre 5 a 20% de todo o carbono fixado pela fotossíntese da planta é consumido pelo FMA (Jakobsen and Rosendahl, 1990). No entanto, dependendo das condições do solo pode considerar-se que os benefícios para a planta são maiores. Esta economia pode estar na base da evolução desta simbiose (Hodge *et al.*, 2010).

## Papel dos FMA na proteção das plantas

Os FMA para além do seu papel na nutrição das plantas, são capazes de melhorar a tolerância destas a *stresses* bióticos e abióticos. Alguns estudos demonstram a importância dos FMA na mitigação dos efeitos das alterações climáticas. Um exemplo disso é a capacidade que a simbiose arbuscular micorrízica tem de aliviar os efeitos negativos do aumento da temperatura à noite na *Medicago truncatula* L. (Hu *et al.*, 2015).

Estudos relacionados com a tolerância a *stresses* abióticos indicam que as plantas inoculadas com FMA aumentam o crescimento, têm um maior rendimento e a uma melhor absorção dos nutrientes, quando comparadas com plantas controlo. No caso do *stress* à seca, uma melhor absorção dos nutrientes, nomeadamente de P, leva a que as plantas tenham uma melhor absorção de água e consigam manter níveis de água adequados nas suas folhas. Por consequência, a capacidade fotossintética tende a aumentar (Subramanian and Charest, 1999; Li *et al.*, 2014). Adicionalmente, os estudos efetuados sugerem que para além da melhor absorção da água, a simbiose potencia um uso mais eficiente da mesma (Boyer *et al.*, 2015). O excesso de sais no solo é também um problema que afeta as plantas, tendo implicações quer numa agricultura sustentável (Chinnusamy *et al.*, 2005), quer na adaptação e desenvolvimento das plantas em determinadas zonas, como por exemplo sapais (Pennings and Bertness, 2001). Os benefícios da associação arbuscular micorrízica nestes ambientes têm sido demonstrados (Carvalho, 2003; Sannazzaro *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2010; Garg and Pandey, 2015). Uma meta-análise da ação das micorrizas arbusculares em plantas sujeitas a *stress* salino realizada recentemente, permitiu concluir que os FMA aliviam os efeitos do *stress* salino melhorando a sua nutrição, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes e a absorção de  $K^+$  em detrimento de  $Na^+$ . Em consequência destes benefícios, a biomassa das plantas aumenta. A identidade do FMA e o tipo de hospedeiro foram considerados de grande importância na previsão da resposta da planta ao *stress* salino (Chandrasekaran *et al.*, 2014). Os países industrializados sofrem com o problema de excesso de “metais pesados” nos solos. Estes elementos existem naturalmente no ambiente, no entanto devido à poluição podem acumular-se no solo atingindo níveis tóxicos quer para as plantas, quer para o Homem, quando entram na sua cadeia alimentar (Giasson *et al.*, 2008). Ultra e colaboradores (2007) demonstraram que o FMA *Glomus aggregatum* foi capaz de aliviar nos girassóis o *stress* ao excesso de Arsénio (As) no solo, melhorando a absorção de P sem que houvesse um aumento da

absorção de As e detetaram a acumulação de DMAA (dimetilarsínico - uma forma menos tóxica de arsénio) na rizosfera das plantas inoculadas, sugerindo que o fungo participou na transformação deste semi-metal (Ultra *et al.*, 2007). Outros trabalhos sugerem benefícios semelhantes na tolerância a metais ou a outras substâncias tóxicas ou presentes em níveis tóxicos no solo (Christie *et al.*, 2004; Campagnac *et al.*, 2010; Briccoli Bati *et al.*, 2015).

Grande importância tem vindo a ser dada ao potencial papel das FMA no biocontrolo de pragas e agentes patogénicos, uma vez que este é um dos grandes problemas da agricultura. Uma alternativa ao uso de fungicidas e pesticidas passa pela criação de métodos biológicos de controlo e é neste sentido que os estudos com FMA têm vindo a ganhar espaço (Garmendia *et al.*, 2005). Babikova e colaboradores (2013) mostraram evidências de que a rede de hifas pode transportar sinais moleculares de plantas infestadas por afídeos para plantas não infestadas. No estudo, as plantas não infestadas que receberam os sinais moleculares via micélio extrarradicular dos AMF foram induzidas a emitir VOCs (compostos orgânicos voláteis) repelentes dos afídeos e um atrativo para inimigos naturais dos mesmos. Estes resultados demonstraram que o micélio extrarradicular não só aumenta a absorção de nutrientes como também serve de comunicação entre plantas (Babikova *et al.*, 2013). Outros trabalhos demonstraram a capacidade da associação MA para inibir ou diminuir a acção de fungos causadores de doenças nas plantas, como por exemplo o *Verticillium dahliae* na pimenta (Idoia *et al.*, 2004), *Phytophthora nicotianae* no tomate (Lioussanne *et al.*, 2009) e *Rhizoctonia solani* na alfafa. Uma lista dos efeitos dos FMA sobre as doenças fúngicas e o crescimento das plantas pode ser consultada em Akhtar & Siddiqui (2008). Esses benefícios podem ter origem indireta se o FMA se estabeleceu na planta antes do agente patogénico, pois a associação MA permite que a planta tenha um melhor desenvolvimento, tornando-se mais resistente ou tolerante ao ataque dos agentes patogénicos e ainda devido à existência de relações com outros microrganismos (Idoia *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Lioussanne *et al.*, 2009). Por outro lado, existem estudos que demonstram que plantas associadas a FMA são mais susceptíveis a determinados agentes patogénicos, no entanto quando comparadas com outras plantas infestadas, mas que não estão associadas a FMA, os danos causados às primeiras são menores (Dugassa *et al.*, 1996; Gernns *et al.*, 2001).

Importa referir que na maioria dos trabalhos verifica-se uma variação no desempenho dos isolados utilizados e nas plantas em estudo, daí que seja de grande

interesse conhecer as comunidades de FMA dos locais e os seus aspetos ecológicos (Al-Karaki *et al.*, 2004; Idoia *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2015).

### **Estado dos conhecimentos sobre FMA na Madeira**

Os FMA encontram-se em abundância na natureza, contudo existe muito pouca informação acerca da sua ocorrência nos solos da ilha da Madeira. A listagem de Fungos do Arquipélago da Madeira faz referência a apenas duas espécies do Filo Glomeromycota (Melo and Cardoso, 2008).

A ilha da Madeira detém uma enorme diversidade de plantas, muitas delas endemismos do Arquipélago da Madeira ou comuns aos Arquipélagos que constituem a Macaronésia. A Floresta da Laurissilva comporta grande parte desta biodiversidade, e possui um elevado valor científico, sendo considerada um laboratório vivo. O valor intrínseco da Laurissilva, aliado à beleza natural que torna a ilha num destino turístico de excelência, tem vindo a consciencializar a população e investigadores (Menezes *et al.*, 2004).

Por outro lado, a ilha da Madeira caracteriza-se também por ter uma forte tradição na agricultura. Embora maioritariamente para autoconsumo, a agricultura tem um grande impacto na região, quer por questões económicas, nomeadamente no que respeita à diminuição da importação de alimentos e na preservação da paisagem que atrai os turistas à ilha, quer por questões ambientais, como por exemplo na proteção da erosão do solo (Dados não publicados). As práticas culturais influenciam as propriedades do solo, a absorção dos nutrientes pelas plantas e a produção das culturas. Embora, as práticas agrícolas convencionais tenham níveis de produtividade elevados, têm também um grande custo ambiental (Chirinda *et al.*, 2010), daí que nos últimos anos tem crescido o interesse por sistemas agrícolas sustentáveis e com um reduzido uso de químicos.

O conhecimento sobre a diversidade e presença de fungos micorrízicos arbusculares é um importante passo para o desenvolvimento de diversas aplicações, nomeadamente em estudos de mitigação das alterações climáticas, reestruturação de sistemas, controlo de pragas e melhoramento da produção agrícola.

### **Análise de Comunidades de FMA**

Estudar as comunidades de fungos pode ser uma tarefa difícil devido à sua grande diversidade, à complexidade do substrato em estudo e à dificuldade de observar de forma direta estas comunidades (Bridge and Spooner, 2001). Os métodos tradicionais

para analisar comunidades de FMA baseiam-se na sua identificação através de características morfológicas e de desenvolvimento dos esporos e hifas (Singh *et al.*, 2008; Burni *et al.*, 2011; Abdelhalim *et al.*, 2014). Contudo este é um trabalho que necessita grande experiência de forma a identificar e caracterizar adequadamente as comunidades, para além de que se pode perder informação. Adicionalmente, sabe-se que os FMA podem ter diferentes graus de seletividade em relação ao hospedeiro. Portanto, a análise de comunidades de FMA baseada na análise morfológica dos esporos pode não se refletir na comunidade de FMA que coloniza as raízes da planta em estudo (Abdelhalim *et al.*, 2014; Wang and Wang, 2014; Bonfim *et al.*, 2015). As técnicas moleculares têm vindo a facilitar o estudo de comunidades de microrganismos e a permitir avanços na investigação (Redecker *et al.*, 2003; Hoshino, 2012; Patreze *et al.*, 2012). A amplificação de regiões variáveis do rRNA para posterior sequenciação tem vindo a ser amplamente usado em estudos de comunidades de FMA. Sequências da subunidade menor do rRNA (SSU – Small Sub-unit) (Clapp *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2011; Wang and Wang, 2014), da subunidade maior (LSU – Large Sub-unit) (Li *et al.*, 2010; Carter *et al.*, 2014) e das regiões que separam ambas subunidades (ITS – internal transcribed spacers) (Hempel *et al.*, 2007; Galván *et al.*, 2009; Paungfoo-Lonhienne *et al.*, 2015) têm sido amplificadas, com este objectivo. A clonagem das sequências amplificadas dá informação acerca da diversidade de espécies da comunidade em estudo (Patreze *et al.*, 2012). Lee *et al.* (2008a) demonstraram que o par de *primers* AML1 e AML2 que amplifica um fragmento da subunidade menor do rRNA apresenta vantagens significativas em relação a outros pares de *primers* comumente utilizados em estudos de comunidades de FMA. Este par de *primers* aumenta a especificidade para o grupo de fungos em estudo, evitando a amplificação de fragmentos de DNA que não pertençam a FMA e ainda abrange a maioria dos fungos pertencentes ao filo Glomeromycota, o que não acontece com muitos dos pares de *primers* utilizados em trabalhos anteriores.

Apesar de a técnica de PCR associada a sequenciação nos trazer informações mais precisas acerca das comunidades, podendo chegar à identificação específica dos FMA presentes na amostra em estudo, quando aplicada para comparação entre comunidades, pode tornar-se laboriosa e de difícil análise. Contudo, as técnicas baseadas em PCR são ferramentas muito úteis no estudo da estrutura e biodiversidade de comunidades e têm sido extensivamente utilizadas em conjunto com técnicas de *fingerprinting*, como T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorfism)

(Marsh, 1999), SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism) (Alguacil *et al.*, 2009), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) e DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Duarte *et al.*, 2012; Patreze *et al.*, 2012). DGGE é uma técnica que se baseia na separação de fragmentos amplificados por PCR com o mesmo tamanho, mas cuja sequência de nucleótidos é diferente (Duarte *et al.*, 2012). Os fragmentos são separados consoante a estabilidade da dupla hélice ao longo do gel com gradiente desnaturante linear formado por concentrações otimizadas de ureia e formamida (Patreze *et al.*, 2012). O conteúdo em GC dos fragmentos é determinante na estabilidade da dupla hélice. A eficácia desta técnica é determinada pelo tamanho dos fragmentos amplificados, que não deve exceder os 500 pb e a aplicação de um grampo de GC a um dos *primers* (Muyzer and Smalla, 1998). A técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism) que utiliza enzimas de restrição para criar *fingerprintings*, embora largamente substituída pela técnica T-RFLP (Hoshino, 2012; Patreze *et al.*, 2012), tem aplicação no estudo de comunidades microbianas e em conjunto com a técnica de DGGE pode ser capaz de produzir resultados mais fiáveis.

## Objetivos

Tendo em atenção a importância e benefícios destes microrganismos e a necessidade de conhecer a diversidade de FMA, o trabalho incidiu sobre o estudo e comparação das comunidades de fungos presentes em duas espécies endémicas, *Teline maderensis* Webb & Berthel. e *Genistas tenera* (Jacq. ex Murray) Kuntze, e em duas espécies agrícolas comumente cultivadas na Madeira, *Vicia faba* L. e *Phaseolus vulgaris* L.. Todas as espécies em estudo pertencem às Fabaceae.

O objetivo geral centrou-se na avaliação da colonização destas espécies por FMA e na determinação da diversidade de fungos, tendo-se realizado as seguintes etapas do trabalho:

- Detecção e quantificação da colonização das raízes das plantas por FMA;
- Análise das características edáficas dos solos;
- Avaliação da existência da correlação entre as características do solo e a colonização das plantas por FMA
- Determinação da relação entre a colonização e a altitude, tipo de solo (agrícola e florestal) e espécie;
- Avaliação da diversidade de FMA colonizadores das plantas com auxílio de marcadores moleculares;
- Comparação dos padrões de diversidade de FMA entre espécies ou locais de colheita.

## Material e Métodos

### Recolha de amostras

Fez-se uma prospeção dos locais de ocorrência das plantas silvestres em estudo, *Teline maderensis* e *Genista tenera*. A georreferenciação dos locais foi realizada, utilizando o GPS da câmara fotográfica. As coordenadas e a latitude dos pontos foram acertadas, com o programa *Geotag 0.094*<sup>©</sup> e transferiu-se toda a informação para a aplicação *Fusion Tables*, da Google Inc. Esta aplicação permitiu a criação de uma base de dados, com toda a informação e fotografias e ainda a criação de um mapa com a distribuição dos locais de ocorrência (Figura 2). O documento gerado pode ser acedido pelos restantes membros do grupo BG ISOPlexis, de forma que a informação pode ser utilizada para outras finalidades.



**Figura 2** – Mapa da ilha da Madeira indicando os locais onde foram encontradas as espécies endêmicas em estudo, *Genista tenera* e *Teline maderensis*.

Após georreferenciação dos locais das plantas, foram selecionados três pontos de recolha para cada espécie, tendo como critério a sua localização geográfica, o mais perto possível de áreas agrícolas, onde ocorresse o cultivo e fosse possível recolher amostras das plantas agrícolas selecionadas, *Vicia faba* e *Phaseolus vulgaris*. Três altitudes diferentes foram amostradas para cada espécie (Tabela 1).

Em cada local de amostragem foram selecionados três exemplares de cada espécie, colhendo-se as raízes, que foram guardadas em sacos de plástico limpos e devidamente identificados. Uma amostra de solo de cada terreno ou local foi recolhida, seguindo a norma ISO 10381-1: “Qualidade do Solo - Amostragem – Parte 4”. Com auxílio de uma pá pequena foram retiradas várias subamostras de solo em diferentes



pontos dos terrenos, em ziguezague, a profundidade de cerca de 15-20 cm. As subamostras foram misturadas em sacos devidamente identificados e transportadas para o laboratório. As amostras de solo foram para análise da composição química.

Quanto não foi possível realizar o tratamento das raízes no dia de recolha, estas foram armazenadas a 4°C até o seu processamento.

**Tabela 1** – Localização e altitude em que foram colhidas as quatro espécies em estudo (*Teline maderensis*, *Genista tenera*, *Vicia faba* e *Phaseolus vulgaris*).

<b>Espécie</b>	<b>Locais</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Altitude (metros)</b>
<b><i>Teline maderensis</i></b>	Encumeada	N 32º 45. 303 W 17º 01. 539	1093
	Ginjas	N 32º 46. 28,026 W 17º 2. 37,088	612
	Cruzinhas	N 32º 45. 48,188 W 16º 52. 22,438	470
<b><i>Genista tenera</i></b>	Encumeada	N 32º 45. 303 W 17º 01. 539	1093
	Cruzinhas	N 32º 45. 48,188 W 16º 52. 22,438	470
	Faial	N 32º 47. 9,061 W 16º 51. 5,227	101
<b><i>Vicia faba</i></b>	Encumeada	N 32º 44. 36,084 W 17º 1. 48,895	788
	Ginjas	N 32º 44. 48,079 W 17º 2. 35,011	505
	Faial	N 32º 46. 38,024 W 16º 51. 21,647	221
<b><i>Phaseolus vulgaris</i></b>	Encumeada	N 32º 44. 13,566 W 17º 1. 39,838	598
	Ginjas	N 32º 44. 48,079 W 17º 2. 35,011	505
	Faial	N 32º 46. 38,024 W 16º 51. 21,647	221

### Processamento das raízes

As raízes foram tratadas assim que chegaram ao laboratório ou no máximo até um dia depois. Todas as amostras foram identificadas, sendo atribuído um código, constituído por número de entrada, pelas iniciais da espécie e a inicial do local de recolha, após um hífen (ex: 1TM-E, amostra 1, *Teline maderensis*, Encumeada). As raízes foram lavadas, a fim de remover toda a terra e cortaram-se em pedaços com cerca de 1 cm de comprimento. Parte das raízes de cada exemplar foi armazenada a -20°C,

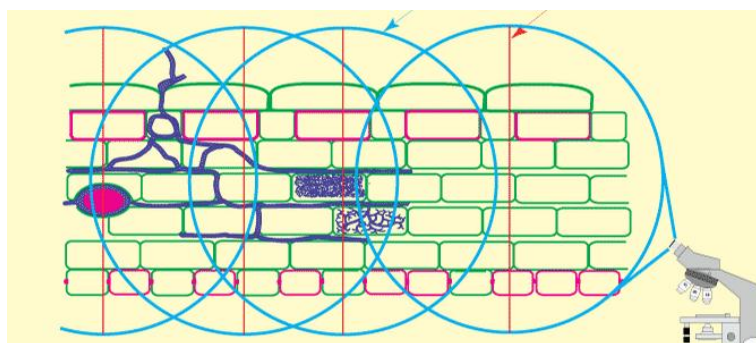
para posterior extração de DNA, enquanto a restante foi usada para quantificar a colonização radicular por FMA.

### Coloração das raízes

Trinta a quarenta fragmentos aleatórios das raízes limpas e cortadas foram separadas e procedeu-se à coloração, segundo Koske & Gemma (1989). Os fragmentos foram colocados em tubos de 15 ml devidamente identificados, contendo KOH (10%) suficiente para cobrir todas as raízes, de seguida colocou-se num banho-maria a 90°C, por 60 min. Este passo foi repetido para as amostras, com raízes muito pigmentadas. Após este período, o KOH foi descartado e passou-se duas vezes por água destilada, a fim de remover o excesso de KOH. As raízes foram colocadas em HCl (1%) e deixou-se atuar por 10 min, descartando-se de seguida a solução. Adicionou-se uma solução de glicerol acidificada (ácido láctico, glicerol e água destilada 4:5:1), com 0,05 % de azul de trypan (SIGMA) e deixou-se a corar, durante a noite. O corante foi então descartado, passando-se as raízes 2 a 3 vezes, por água destilada. As amostras com as raízes coradas foram mantidas em água destilada, a 4°C, durante uma semana, de forma a remover o excesso de corante.

### Quantificação da colonização micorrízica

As raízes coradas foram dispostas em lâminas com meio de montagem PVLG, cobertas por uma lamela e devidamente identificadas. Cada fragmento de raiz foi analisado segundo o método de McGonigle, et al. (1990) representado pela figura 3. A cada intersecção da linha vertical com a raiz registou-se a presença ou ausências de hifas, arbúsculos ou vesículas. As colonizações arbusculares (CA) e vesiculares (CV) foram calculadas, dividindo o número total de arbúsculos ou vesículas pelo nº de intersecções examinadas. A colonização por hifas (CH) foi calculada pela proporção de intersecções não-negativas.



**Figura 3** — Esquema ilustrativo do exame microscópico das raízes colonizadas por Fungos Micorrízicos Arbusculares (Figura retirada de Brundrett (2008)).

### Extração de DNA

A extração de DNA das raízes foi feita de acordo com Chao e Somers (2006), com modificações. As amostras foram maceradas em azoto líquido, com ajuda de um pilão e almofariz e 200 mg de amostra foram usadas para extração. A amostra macerada foi colocada, em tubos de 1,5 ml, sendo adicionados 500 µl de tampão de extração (0,1M Tris-HCl pH 7,5; 0,05 EDTA pH 8,0; 1,25% SDS)<sup>a</sup>, previamente aquecido a 65°C. As amostras foram homogeneizadas por agitação ou recorrendo a um bastão quando necessário e colocadas em banho-maria a 65°C, durante 30 min. Após este período, as amostras foram retiradas do banho e deixadas a arrefecer até à temperatura ambiente. Ao extrato adicionou-se 250 µl de acetato de amónia frio (7,5M)<sup>a</sup>, agitou-se e deixou-se no frio, durante 15 min. Os tubos foram depois levados a centrifugar a 2380 g, durante 15 min. O sobrenadante das amostras foi recolhido para novos tubos e adicionou-se um volume igual da mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A mistura foi agitada e efetuou-se nova centrifugação a 2380 g, durante 15 min, tendo-se transferido o sobrenadante para novos tubos, com 360 µl de isopropanol. A mistura foi agitada gentilmente e deixou-se repousar, durante 15 min, para precipitação do DNA à temperatura ambiente ou durante cerca de 1h, a -20°C. O sedimento foi recolhido, após centrifugação a 2380 g, durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e efetuaram-se 2 lavagens do sedimento, com etanol a 70% e centrifugação a 2380 g, durante 15 min. Descartou-se novamente o sobrenadante e finalmente, o DNA foi ressuscitado em TE<sup>b</sup> após estar bem seco, ficando a dissolver a 4°C, durante a noite.

A eficácia da extração foi comprovada, através da quantificação do DNA, utilizando o equipamento NanoDrop 2000c (ThermoScientific), e da eletroforese em gel de agarose a 0,8%, 110V, durante 30 min, utiliznado-se o tampão TAE 1x<sup>b</sup>. Após a corrida o gel foi colocado numa solução de Brometo de Etídeo<sup>b</sup>, durante 45 min para revelação das bandas. A confirmação da integridade do DNA foi realizada, através de visualização das bandas à luz UV, utilizando um transiluminador com câmara acoplada (Modelo GVM20, Syngene). As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até o seu processamento.

---

<sup>a</sup> Ver preparação de soluções no anexo I.

<sup>b</sup> Ver preparação de soluções no anexo I.

### **Purificação do DNA**

Sempre que necessário procedeu-se a uma purificação extra do DNA, seguindo o protocolo de Fang *et al.* (1992). Adicionou-se a quantidade necessária de NaCl 5M<sup>b</sup> ao DNA dissolvido em TE, para uma concentração final de 2.0M. Deixou-se repousar, durante 10 min, e precipitou-se o DNA, em 2 volumes de etanol absoluto à temperatura ambiente, durante 15 min. O sedimento foi recolhido, através de centrifugação a 2380 g, durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e efetuou-se 2 lavagens do sedimento, com etanol a 70%, seguido de centrifugação a 2380 g, durante 15 min. O sobrenadante foi descartado, deixou-se o precipitado a secar ao ar e por fim, o DNA foi ressuscitado em TE, ficando a dissolver, a 4°C, durante a noite.

A eficácia da purificação foi comprovada, utilizando o equipamento NanoDrop 2000c. As amostras de DNA foram armazenadas a -20°C até o seu processamento.

### **Análise Nested-PCR**

Para efetuar a análise da diversidade de FMA recorreu-se à técnica de *Nested-PCR*, de acordo com Lee *et al.* (2008b).

Em primeiro lugar, utilizou-se, um par de *primers* universais para eucariotas NS1 (5' GTA GTC ATA TGC TTG TCT C 3') e NS4 (5' CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG 3') para amplificação de um fragmento com 1100 pb do gene correspondente à subunidade 18S do rRNA (SSU). A reação de PCR foi realizada, utilizando a Master Mix iProof<sup>TM</sup> *High-Fidelity* (BIO-RAD), com as concentrações de reagentes indicadas pelo fabricante para um volume final de 20 µl (1x iProof Master Mix, 1,0 µM de cada *primer*, 50-500 ng de DNA e H<sub>2</sub>O ultrapura). As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial 98 °C, 1 min; 35 ciclos de 98 °C, 10 s, 49,7 °C, 30 s, 72 °C, 35 s; passo final de extensão 72 °C, 10 min. Terminada a reação procedeu-se à confirmação da amplificação do fragmento esperado, através de uma eletroforese em gel de agarose a 1,2%, utilizando como referência o marcador molecular de 50 - 2.000 pb AmpliSize<sup>®</sup> (BIO-RAD). A eletroforese correu, durante 35 min, a 110V. O gel foi revelado em brometo de etídeo e a visualização foi feita, sob luz UV e os géis foram fotografados.

As amostras amplificadas corretamente foram diluídas, na proporção 1:10 ou 1:100, conforme necessário, e efetuou-se uma segunda PCR, utilizando os *primers* específicos para o Filo Glomeromycota, AML1 (5'ATC AAC TTT CGA TGG TAG GAT AGA 3' ) e AML2 (5' GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC C 3'). A reação de PCR foi preparada conforme exposto em cima e as condições de amplificação foram as

seguintes: desnaturação inicial 98 °C, 1 min; 35 ciclos de 98 °C, 10 s, 65 °C, 30 s, 72 °C, 30 s; passo final de extensão 72 °C, 10 min. Uma eletroforese foi realizada para confirmação da amplificação do fragmento, com cerca de 795 pb. A concentração do gel foi de 1,2% e as condições da corrida 110 V, durante 35 min. A revelação foi feita com brometo de etídeo e a visualização e fotografia das bandas, utilizando o transiluminador com câmara acoplada. Após a PCR, foram descartadas as amostras que não amplificaram, ao fim de pelo menos três tentativas.

### PCR/DGGE

Para utilização da técnica de DGGE realizou-se a amplificação das amostras que foram amplificadas, com o par AML1/AML2, desta vez com o par nu-SSU-0817 (5' TTAGCATGGAATAATRRRAATAGGA 3') e AML2 (5' GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC C 3'). Ao *primer* reverse (AML2) foi adicionado uma cauda de GC. Na reação de PCR utilizou-se a mistura Master Mix iProof™ *High-Fidelity* (BIO-RAD), seguindo-se as recomendações para um volume final de 20 µl. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial 98 °C, 1 min; 35 ciclos de 98 °C, 10 s, 61,7 °C, 30 s, 72 °C, 30 s; passo final de extensão 72 °C, 10 min. A confirmação da amplificação foi feita, através de eletroforese em gel de agarose, a 1,5%. A electroforese correu a 110 V, durante 45 min e a revelação feita, com brometo de etídeo, seguido de visualização e fotografia do gel, sob luz UV.

Para visualizar a diversidade de FMA procedeu-se à preparação das soluções<sup>c</sup> de acrilamida/bis-acrilamida (ABA), a 8%. A solução A foi preparada, juntando ureia e formamida e a solução B foi preparada sem desnaturantes.

Dois tubos córex foram envolvidos em papel de alumínio e identificados. As soluções A e B foram misturadas nas proporções corretas para obter 25 ml de uma solução 40% desnaturante e 25 ml de uma solução 60% desnaturante. A estas soluções adicionou-se 105 µl de 10% APS<sup>c</sup> e 21 µl de TEMED para promover a polimerização da acrilamida. O gradiente de desnaturação que varia entre os 40 e os 60% foi formado, preenchendo o suporte do gel, com auxílio do formador de gradientes Hoefer SG50 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), deixando-se a polimerizar, durante cerca de 2h.

As amostras misturadas com tampão Azul Bromofenol<sup>c</sup> e glicerol foram carregadas no gel utilizando uma seringa. A eletroforese foi realizada numa tina vertical (Hoefer SE600 series, Amersham Pharmacia Biotech Inc.), a 80V, utilizando o tampão

---

<sup>c</sup> Ver preparação de soluções no anexo I.

TAE 1x, durante 16h. As bandas foram reveladas numa solução de brometo de etídeo, visualizando-se e fotografando-se o gel, utilizando o transiluminador UV com câmara acoplada.

#### **RFLP**

A mistura reagente foi preparada em tubos de PCR, com 2 µl de tampão de reação adequado à enzima, 1 µl de enzima de restrição (AluI ou HinfI), 5 µl de DNA e 12 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura. A mistura reagente foi incubada num banho-maria a 37 °C, durante 6h. Após este período, inativou-se a reação, através de incubação, a 80°C, durante 20 min. Uma eletroforese para cada uma das reações foi realizada em gel de agarose, a 2,5%, revelando-se as bandas com brometo de etídeo e fotografaram-se os géis, utilizando o transiluminador UV com a câmara acoplada.

#### **Tratamento dos dados**

Os resultados foram submetidos a análise estatística, com recurso ao programa SPSS versão 22, para detetar a existência de diferenças significativas na colonização arbuscular, vesicular e por hifas (CA, CV e CH) entre as espécies, tipo de solo (agrícola e florestal) e altitude. A análise de variância (ANOVA) dos resultados foi realizada. E a existência de correlações paramétricas e não paramétricas entre CA, CV e CH e os dados da análise bioquímica do solo foi analisada.

Os padrões obtidos pelas técnicas de DGGE e RFLP foram analisados, através do programa Fingerprinting II 3.0 (Informatix<sup>TM</sup> Software, BIO-RAD), usando o método hierárquico UPGMA (Unweighted Pair Group With Mathematical Averages) e coeficiente de Dice.

## Resultados e Discussão

### Colonização micorrízica arbuscular

A análise das raízes de *Teline maderensis*, *Genista tenera*, *Vicia faba* e *Phaseolus vulgaris* confirmou a presença da associação MA nas 4 espécies e nos três sítios amostrados (Tabela 2, Figura 4). A tabela demonstra, que a média mais elevada de colonização foi determinada para uma amostra de *Vicia faba*, colhida no Faial, a 221 metros de altitude. Embora a espécie *Phaseolus vulgaris* tenha tido as médias de colonização mais baixas, verifica-se que é também no terreno do Faial, que a colonização atingiu maior percentagem. Os valores de colonização de *Phaseolus vulgaris* são consideravelmente inferiores às restantes plantas (Tabela 2, Figura 4), com  $p \leq 0,05$  para a CH (Anexo II, Tabelas 5 e 6). Esta situação pode dever-se à colheita prematura desta espécie dado que as plantações tinham no geral entre duas semanas a um mês. Outra explicação pode passar pelo uso de pesticidas que podem inibir a colonização das raízes por FMA (Abd-Alla *et al.*, 2000; Zaller *et al.*, 2014). No entanto não temos nenhuma evidência da aplicação de pesticidas nos campos. Os legumes são plantas que apresentam frequentemente associações simbióticas, quer com bactérias fixadoras de  $N_2$ , quer com FMA e muitas vezes apresentam as duas associações em simultâneo (Ciftci *et al.*, 2010; Muleta, 2010). Scheublin *et al.* (2004) detetaram níveis médios de colonização de 85% e 91%, nas plantas leguminosas *L. corniculatus* e *T. repens*, respetivamente. Tajini *et al.* (2012) obtiveram níveis médios de colonização por *Glomus intraradices* em *Phaseolus vulgaris* de cerca de 80% para CH e CV e apenas para CA a percentagem média foi mais baixa, cerca de 10%. Também Ibijbijen, *et al.* (1996) apresentaram níveis de colonização entre 50 e 75% de três espécies de *Glomus* e uma de *Gigaspora* em *Phaseolus vulgaris*. Por outro lado, Scheublin *et al.* (2004) mostram que existem espécies de FMA que apresentam mais afinidade para determinadas leguminosas que para outras e Tajini & Devron (2012) apresentam níveis de colonização em *Phaseolus vulgaris* que variam consideravelmente consoante o género de FMA inoculado. Estes resultados indicam-nos que há também a possibilidade de que a baixa colonização encontrada em *Phaseolus vulgaris* neste trabalho se deva ao tipo de FMA existente nos solos agrícolas. *Vicia faba* destacou-se em termos de CA, com uma diferença significativa em relação a CA das restantes espécies,  $p \leq 0,001$  (Anexo II, Tabelas 5 e 7). *Phaseolus vulgaris* apresenta diferenças significativas na CV, com as plantas *Teline maderensis* e *Genista tenera*, com  $p \leq 0,05$ , mas não com *Vicia faba* (Anexo II, tabelas 5 e 8).



As espécies endêmicas *Teline maderensis* e *Genista tenera* são parentes selvagens das espécies agrícolas em estudo, apresentam raízes mais lenhosas e desenvolvem-se em escarpas e solos rochosos (Press and Short, 1994; Jardim *et al.*, 2006). Estas espécies apresentaram níveis de colonização interessantes. A média mais alta de colonização verificou-se em plantas de ambas as espécies colhidas nas Cruzinhas, a uma altitude de 470 metros (Tabela 2). Estudos sobre a colonização MA para ambas as espécies não são conhecidos. No entanto, Sánchez-Castro *et al.* (2012) observaram uma percentagem média de colonização de 63% numa espécie do género *Genista* (*G. cinerea*). Navarro-Fernández *et al.* (2013) detetaram uma colonização de 55,4% na *Genista hirsuta*. Estas percentagens são semelhantes às encontradas neste estudo (Tabela 2).

**Tabela 2** – Valores da colonização das espécies em estudo por MA. A tabela apresenta as espécies, o local de amostragem e a percentagem média de colonização. As taxas de colonização equivalem à colonização por hifas (CH), o seu cálculo efetua-se pela divisão das interseções não-negativas pelo total de interseções analisadas.

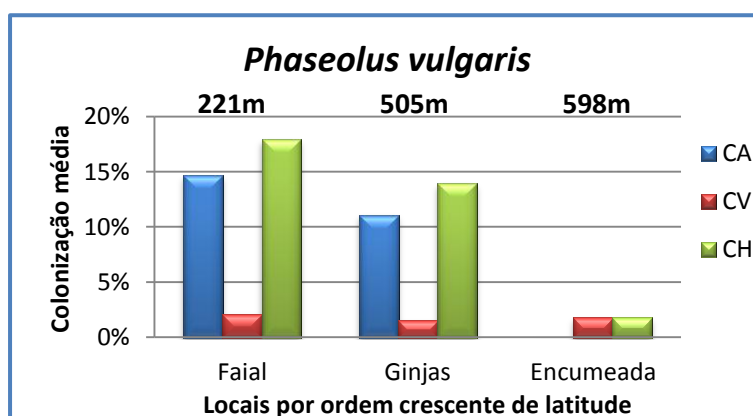
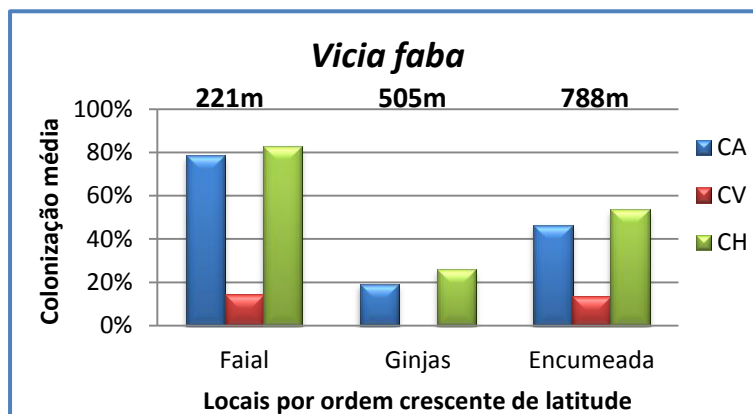
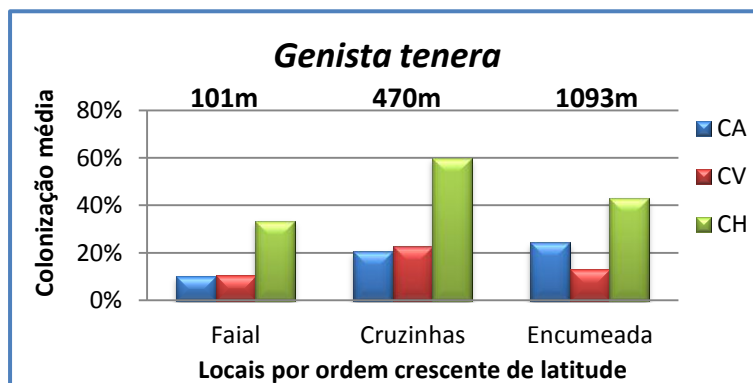
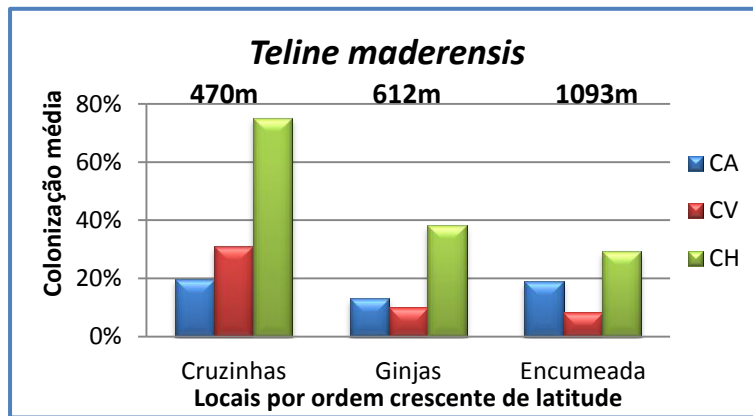
<b>Espécie</b>	<b>Local</b>	<b>% Colonização</b>
<b><i>Teline maderensis</i></b>	Cruzinhas	75,27%
	Ginjas	38,32%
	Encumeada	29,41%
<b><i>Genista tenera</i></b>	Faial	33,46%
	Cruzinhas	59,97%
	Encumeada	43,06%
<b><i>Vicia faba</i></b>	Faial	83,01%
	Ginjas	26,15%
	Encumeada	53,70%
<b><i>Phaseolus vulgaris</i></b>	Faial	17,92%
	Ginjas	13,96%
	Encumeada	1,78%

A análise de variância (ANOVA) não detetou a existência de diferenças significativas na CH e CA nas espécies provenientes dos solos agrícolas e florestais. Por outro lado, diferenças significativas foram detetadas na CV, com  $p \leq 0,05$  (Anexo II, Tabela 9). As raízes da *Vicia faba* e *Phaseolus vulgaris* apresentaram percentagens médias de CV inferiores às plantas endêmicas (*Teline maderensis* e *Genista tenera*), estas diferenças podem ser observadas na figura 6.

O mesmo teste foi realizado para detetar a existência de diferenças significativas nas CH, CV e CA relacionadas com a altitude de amostragem das plantas. O teste de Tukey mostrou que não há diferenças significativas de colonização entre as diferentes



altitudes (Anexo II, Tabela 10). Este resultado difere dos resultados de Navarro-Fernández *et al.* (2013), que indicam haver uma maior colonização nas plantas de zonas de maior altitude. Estes resultados são justificados pelo facto de serem zonas com condições de maior *stress*, sendo a associação MA uma forma de adaptação das plantas em estudo ao meio ambiente (Barea *et al.*, 2011; Navarro-Fernández *et al.*, 2013). Na figura 5 podemos verificar que a *Genista tenera* obedece à tendência observada por Navarro-Fernández *et al.* (2013) no que respeita a CA. No entanto, nas demais espécies alvo esta situação já não se verifica para nenhum tipo de colonização.



**Figura 4** – Percentagem média de colonização por FMA nas espécies *Teline maderensis*, *Genista tenera*, *Vicia faba* e *Phaseolus vulgaris*. CA representa a colonização por arbúsculos, CV colonização por vesículas e CH colonização por hifas. No topo de cada gráfico é apresentada a altitude dos locais de recolha.

As amostras de solo colhidas foram enviadas para análise química e bioquímica e os resultados obtidos foram correlacionados com as percentagens de colonização das plantas (Tabela 3).

Para os parâmetros físicos foi possível observar algumas correlações significativas, nomeadamente com o pH e o grau de saturação (parâmetro que relaciona o volume de água, com os espaços vazios do solo). Uma correlação positiva ( $p \leq 0,05$ ) foi obtida entre CV e o pH do solo. Vários trabalhos detetaram correlações positivas entre o pH do solo e a colonização por FMA (Panwar and Tarafdar, 2006; Burni *et al.*, 2011). Um estudo levado a cabo por Nilsson *et al.* (2005) mostrou que a produção de micélio dos FMA era maior em solos com pH mais alto e P assimilável mais baixo. No presente trabalho, observou-se que de entre as amostras de solo colhidas, os solos que apresentaram pH mais alto correspondem às plantas que obtiveram índices de colonização também mais elevados. Este resultado vai de encontro com os dados de Nilsson *et al.* (2005). Para o grau de saturação encontrou-se uma correlação positiva com CV ( $p \leq 0,05$ ). Neste caso verifica-se que quanto maior é o grau de saturação, maior é a colonização das raízes das plantas por vesículas. No entanto, não se observou qualquer correlação com CA e CH, nem correlações significativas entre a colonização e a matéria orgânica do solo.

No que diz respeito aos macronutrientes a correlação de Pearson indica que há uma correlação paramétrica significativa entre a concentração de P assimilável e CV ( $p \leq 0,01$ ) e também com CH ( $p \leq 0,05$ ), o mesmo se observa para K de troca. Quanto aos nitratos verificamos que existe uma correlação negativa, com CH ( $p \leq 0,01$ ), CV ( $p \leq 0,01$ ) e CA ( $p \leq 0,05$ ). O N amoniacal só apresenta correlação negativa com CH ( $p \leq 0,05$ ). No caso de Mg de troca, a correlação encontrada com CH ( $p \leq 0,01$ ) e CV ( $p \leq 0,01$ ) é positiva. Com Ca não há correlações significativas. As correlações negativas indicam-nos que quando a concentração do macronutriente é menor, a colonização micorrízica das raízes atinge maiores percentagens. O solo do terreno agrícola do Faial, aquando da colheita da *Vicia faba*, apresentava uma concentração de 101 ppm de P assimilável, a mais baixa entre todas as amostras de solo. E, como foi referido em cima, as plantas colhidas nestes terrenos apresentaram a percentagem média de colonização maior (Tabela 2). O solo que foi colhido, no mesmo terreno, mas desta vez com *Phaseolus vulgaris* como cultura, apresentou uma concentração de P assimilável ligeiramente maior (169 ppm), continuando a ser, de entre os três terrenos de amostras para a espécie, aquele que apresentava menor concentração de P e maior de

percentagem de colonização (Tabela 2). Estes resultados são apoiados por estudos que indicam que o fósforo regula a simbiose entre os FMA e as plantas, e que a extensão da colonização correlaciona-se inversamente com o estado da planta em relação a este nutriente (Harrison, 1998). Por outro lado, um estudo efetuado por Schultz (1996) mostra que a abundância e distribuição do FMA *Acaulospora colossica* estavam associadas negativamente, com a concentração de P, enquanto a abundância e distribuição de *G. gigantea* estavam correlacionadas positivamente. Koske, (1981) e Johnson, *et al.*, (1992) obtiveram resultados semelhantes. Zangaro *et al.*<sup>117 117</sup> (2013) sugere que a correlação entre o P e a colonização MA pode depender também da textura do solo e da altitude. Diferentes correlações entre colonização e concentração de P no solo têm sido encontradas nos diversos estudos, indicando que a relação entre colonização e fósforo no solo é complexa (Koide and Li, 1990; Gupta *et al.*, 2002; Lingfei *et al.*, 2005). Os nutrientes P e N são requeridos pelas plantas em grandes quantidades e são normalmente os nutrientes que limitam o seu crescimento. Vários trabalhos indicam que a sua absorção pode ser melhorada, através do aumento da área de absorção criada pela rede de hifas dos FMA (Habte and Osorio, 2001; Tajini *et al.*, 2012), portanto quando as concentrações de P e N no solo são menores a planta beneficia da associação micorrízica, o que pode levar a que a planta esteja mais suscetível à colonização. Por outro lado, um estudo efetuado por Blanke *et al.* (2005) mostra que baixas concentrações de N em ambientes extremamente ricos em P estimulam a colonização micorrízica e que concentrações mais altas de N inibem a micorrização.

Os micronutrientes também apresentaram algumas correlações. O Cu apresenta uma correlação negativa com CH ( $p \leq 0,05$ ) e CV ( $p \leq 0,01$ ) e o Fe com CA ( $p \leq 0,05$ ). Por outro lado, o Mn apresenta correlação positiva com CV ( $p \leq 0,05$ ). Os restantes micronutrientes analisados não apresentaram correlações significativas.

No trabalho de Zangaro *et al.* (2013) verificou-se que a concentração dos nutrientes N, K, Ca, Mg e Mn nas raízes das plantas estavam correlacionadas inversamente com a colonização micorrízica e densidade de esporos no solo, apoiando em parte os resultados obtidos neste estudo. Lingfei *et al.* (2005) detetaram correlações negativas entre a colonização e os fatores edáficos como P e N e positivas com o pH, corroborando também com os dados deste trabalho. No entanto, outros estudos apresentam correlações diferentes que podem depender das relações complexas entre as

plantas e a biodisponibilidade dos nutrientes no solo (Giasson *et al.*, 2008; Karanika *et al.*, 2008).

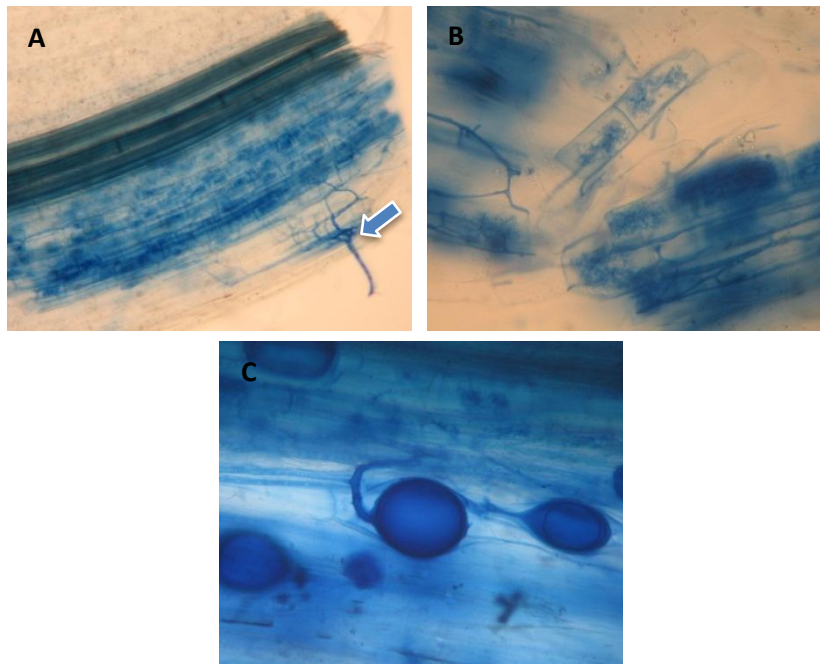
**Tabela 3** – Análise estatística da relação entre as taxas de colonização pelo FMA e os parâmetros físicos, matéria orgânica e macro e micronutrientes dos solos nos locais de amostragem das espécies estudadas. Na tabela são apresentadas as correlações significativas entre a colonização por hifas (CH), arbuscular (CA) e vesicular (CV) e os valores da análise dos solos.

Correlação de Pearson			
	CH	CV	CA
<b>pH (H2O)</b>	-	0,365*	-
<b>Grau de saturação</b>	-	0,436*	-
<b>CEC</b>	-	-	-
<b>Matéria Orgânica</b>	-	-	-
<b>P assimilável</b>	-0,402*	-0,461**	-
<b>K assimilável</b>	-	-	-
<b>K de troca</b>	-0,443**	-0,366*	-
<b>N (nitratos)</b>	-0,579**	-0,458**	-0,364*
<b>N (amoniaco)</b>	-0,399*	-	-
<b>Ca de troca</b>	-	-	-
<b>Mg de troca</b>	0,492**	0,633**	-
<b>Na de troca</b>	-	-	-
<b>Cu</b>	-0,362*	-0,504**	-
<b>Mn</b>	-	0,403*	-
<b>Fe</b>	-	-	-0,401*
<b>Boro</b>	-	-	-
<b>Zn</b>	-	-	-

(\*\*) A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades). (\*) A correlação é significativa no nível 0,05 (2 extremidades). (-) Não há correlação.

### Quantificação da colonização micorrízica

A quantificação da colonização foi realizada, utilizando a coloração das raízes pelo método de Koske e Gemma (1989), obtendo-se uma coloração uniforme e adequada para a quantificação da colonização por FMA (Figura 5). A coloração das raízes de *Vicia faba* e *Phaseolus vulgaris* foi realizada, de acordo com as indicações de McGonigle *et al.* (1990). Nas raízes de *Teline maderensis* e *Genista tenera*, a remoção do conteúdo citoplasmático foi mais difícil de realizar, tendo sido necessária a repetição do passo de clarificação das raízes (KOH 10%, 90°C, 60 min).



**Figura 5** — Raízes de *Vicia faba* coradas com Azul de Trypan. A) Visão ampla da raiz colonizada por FMA (ampliação 100x). A seta aponta para o apressório; B) Arbúsculos no interior das células (ampliação 400x); C) Clamidosporos formados no interior da raiz (ampliação 1000x).

### Extração de DNA das raízes

O método mais utilizado na extração de DNA de plantas é o de Doyle & Doyle (1990), que utiliza uma solução de extração com CTAB. Este método foi testado para as raízes de *Teline maderensis*, *Genista tenera*, *Vicia faba* e *Phaseolus vulgaris*. No entanto verificou-se uma co-precipitação elevada de polissacarídeos, que deixava o DNA viscoso e difícil de trabalhar. As amostras mais problemáticas foram as espécies silvestres. A análise do DNA em gel de agarose e por quantificação no NanoDrop confirmaram a presença de contaminação. Para além deste problema, o método requer a utilização de compostos tóxicos (clorofórmio e  $\beta$ -mercaptoetanol), o que exige cuidados extra no manuseamento das amostras. A extração com CTAB foi comparada com a extração proposta por Chao e Somers (2006) e verificou-se que no último método a viscosidade do DNA era consideravelmente menor. No entanto, foi necessário adicionar o passo de desnaturação de proteínas com clorofórmio-álcool isoamílico para a obtenção de um DNA com pureza mais elevada. Ainda assim, algumas amostras apresentaram uma co-precipitação de polissacarídeos elevada, comprovada pelo baixo rácio das absorvâncias 260/230. Para ultrapassar este problema, efetuou-se uma purificação extra do DNA para estas amostras, com utilização de uma concentração elevada de NaCl (Fang *et al.*, 1992). No geral, houve um aumento do valor do rácio 260/230, contudo nem sempre se conseguiram resultados positivos na amplificação por PCR. Na tabela 4 podemos observar para duas amostras, a título de exemplo, as situações acima referidas. Em termos de concentração de DNA, obteve-se valores bons

para os dois métodos. A diferença verifica-se essencialmente para o rácio 260/230: as amostras extraídas pelo método de Chao e Somers, embora não estejam dentro do intervalo considerado puro (1,8 - 2,2), apresentam valores mais elevados que as amostras extraídas, com CTAB. Nas últimas duas colunas é possível observar o efeito da purificação de DNA, com NaCl, observando-se um aumento nos valores do rácio 260/230 e também do rácio 260/280, embora no último caso a diferença em duas das amostras tenha sido muito pouco significativa. No entanto, os valores obtidos continuam muito aquém do intervalo de valores, em que se considera que o DNA está puro e é possível que por esta razão não se tenha conseguido resultados positivos na amplificação de várias amostras.

**Tabela 4** – Comparação dos métodos de extração de DNA através da tabela gerada pelo software do NanoDrop, utilizando duas amostras diferentes com elevada concentração de polissacarídeos. O prefixo da identidade das amostras indica o método de extração que foi utilizado (CTAB – extração com CTAB; CS – extração pelo método de Chao e Somers). As últimas duas colunas apresentam os rácios de absorvâncias após uma purificação extra com NaCl.

Métodos de extração	Amostras	Sem purificação		Purificação com NaCl	
	DNA, ng	260/280	260/230	260/280	260/230
<b>CTAB-13</b>	5014,2	1,57	0,7	1,71	0,79
<b>CTAB-6</b>	957,9	1,64	0,69	1,65	0,73
<b>CS-13</b>	2354,3	1,57	0,78	1,61	0,79
<b>CS-6</b>	562,8	1,65	1,14	1,77	1,28

Shepherd e McLay (2011) comparam os protocolos de extração de DNA com o objetivo de evitar a co-precipitação de polissacarídeos. O método que utiliza um pré-tratamento das amostras com STE (Sacarose, Tris e EDTA) parece ser o mais eficiente, conseguindo-se utilizar as amostras na amplificação por PCR e degradação enzimática, com enzimas de restrição. Este pode ser um método a ser considerado num futuro trabalho.

### Análise Molecular

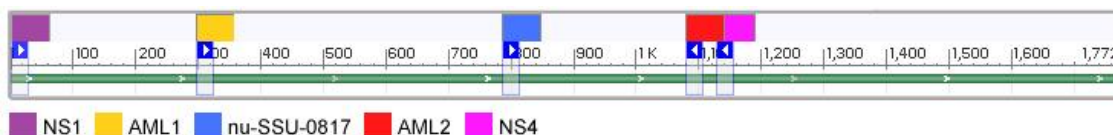
Estudos sobre a diversidade e estrutura das comunidades de FMA requerem a utilização de *primers* que amplifiquem todos os FMA presentes nas amostras. O par de *primers* AML1 e AML2 demonstrou ser transversal a todas as ordens conhecidas do Filo Glomeromycota e foram eficientes ao evitar a amplificação de DNA de outra origem (Lee *et al.*, 2008b). Por estas razões optou-se por utilizar este par de *primers* na avaliação da diversidade de FMA em *Teline maderensis*, *Genista tenera*, *Vicia faba* e *Phaseolus vulgaris*. Para além disso, amplifica uma zona do gene da subunidade menor

do RNA ribossomal (SSU), dando origem a um produto de amplificação com um tamanho relativamente longo e de grande variabilidade, o que permite obter uma melhor resolução entre diferentes sequências de FMA (Lee *et al.*, 2008b). Optou-se então por uma *Nested-PCR*, em que se iniciou com a amplificação de um fragmento com cerca de 1100 pb, utilizando o par de *primers* NS1/NS4 (Figuras 6 e 7A), e a partir deste fragmento fez-se uma nova amplificação com o par de *primers* específico para o Filo Glomeromycota AML1/AML2 que amplifica um fragmento com cerca de 795 pb (Figuras 6 e 7B).

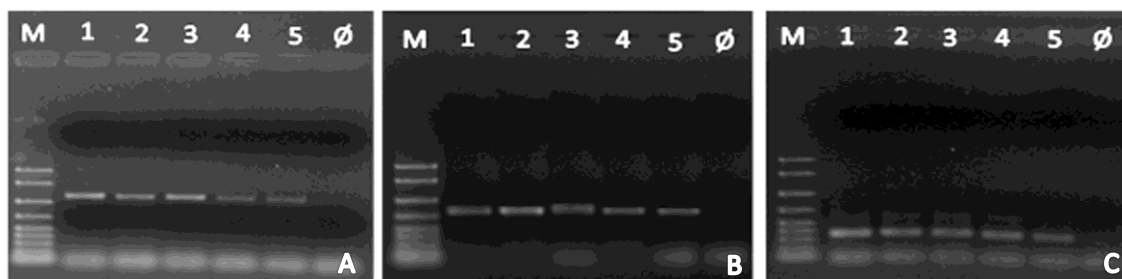
No entanto, na análise pela técnica de DGGE foi necessário utilizar uma sequência mais pequena. Segundo Borneman e Hartin (2000) o *primer forward* nu-SSU-0817 é uma ferramenta útil na identificação de fungos de amostras ambientais, como solo e plantas, e pode ser usado com êxito em técnicas como o DGGE. As ferramentas informáticas BLAST e TestPrime foram utilizadas para analisar a utilidade deste *primer* no trabalho. O acesso padrão selecionado como referência para análise BLAST foi *Glomus etunicatum* (número de acesso no GenBank: Y17639.2); tendo em atenção os acessos utilizados por Lee *et al.* (2008b). O alinhamento, utilizando a ferramenta BLAST permitiu verificar que o *primer* nu-SSU-0817 se encontra posicionado dentro da sequência amplificada pelo par de *primers* AML1/AML2. Outros dois *primers* (nu-SSU-1196 e nu-SSU-1536), ambos *reverse*, desenhados pelos mesmos autores (Borneman e Hartin), foram também tidos em conta, mas não foram escolhidos para este trabalho por, em conjunto com o *primer* nu-SSU-0817, amplificarem fragmentos de tamanho considerado demasiado grande para a técnica de DGGE, para além de que as suas posições estão fora do fragmento amplificado por AML1/AML2. Os dados obtidos na análise anterior foram validados pela ferramenta TestPrime, com o par de *primers* nu-SSU-0817/AML2, testando-se nos acessos da base de dados “Silva”. O par de *primers* nu-SSU-0817/AML2 amplifica um fragmento, com cerca de 300 pb (Figuras 6 e 7C), um tamanho que pode ser separado por DGGE, com mais eficácia do que fragmentos com maior peso molecular. Os resultados obtidos pela simulação, com a ferramenta TestPrime mostraram que o par tem especificidade para o Filo Glomeromycota, apresentando valores de especificidade que variam entre 99,9% e 100%, enquanto para sequências de outros Filos essa especificidade é de 0%. Para além deste Filo, o par de *primers* apresenta apenas especificidade para com os Holozoa, um grupo constituído por animais e seus parentes unicelulares (Lang *et al.*, 2002). O par de *primers* AM1/NS31 é o que é mais comum encontrar referido na literatura para estudo



das comunidades de FMA, contudo este par não é transversal a todas as espécies conhecidas de FMA, para além de que amplifica sequências de DNA que não pertencem a FMA (Helgason *et al.*, 2002; Husband *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2008). Por outro lado, a ferramenta TestePrime indica-nos que é possível amplificar o fragmento da zona 18S do rDNA com o par nu-SSU-0817/AML2 em todas as famílias conhecidas de FMA.



**Figura 6** – Parte do gene correspondente à subunidade 18S do rRNA com a posição de ligação dos *primers* utilizados neste trabalho. A seta ▶ assinala os *primers forward* e a seta ◀ assinala os *primers reverse*.



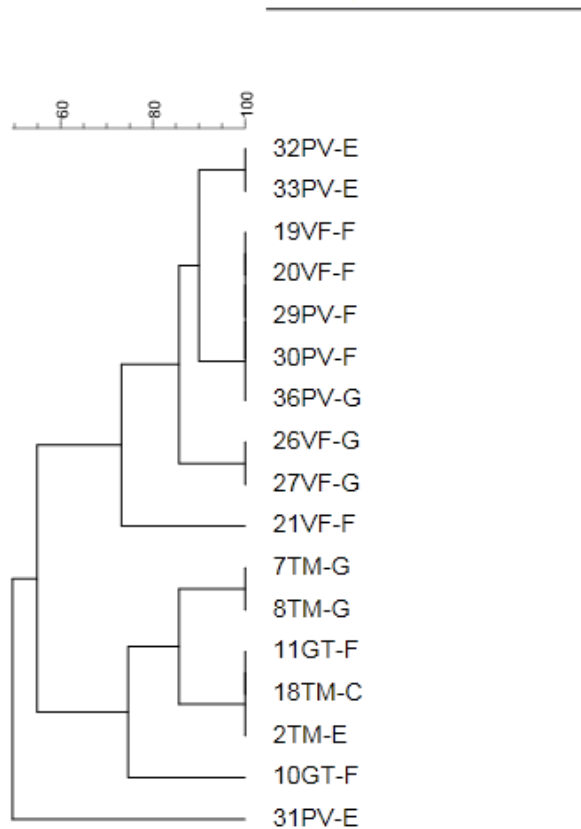
**Figura 7** – Eletroforese em gel de agarose. A) *Primers* universais NS1/NS4; B) *Primers* AML1-AML2; C) *Primers* nu-SSU-0817/AML2-GC. Identificação das amostras: 1) *Teline maderensis* (Encumeada), 2) *Genista tenera* (Faial), 3) *Vicia faba* (Faial), 4) *Phaseolus vulgaris* (Faial), 5) *Teline maderensis* (Ginjas).

Os fragmentos amplificados com o par de *primers* nu-SSU-0817/AML2-GC foram submetidos a uma eletroforese com gradiente de desnaturação (DGGE). Em resultado da separação foram detetadas onze bandas diferentes ou OTUs, num total de 2 a 5 bandas em cada amostra, sendo que as amostras com maior diversidade apresentam 3 ou 4 bandas diferentes. Estas bandas têm diferentes sequências de nucleótidos, visto que o método DGGE separa-as, consoante o seu conteúdo de GC. Então, bandas diferentes pertencerão a grupos diferentes de FMA. Em teoria, cada banda deveria corresponder a uma só espécie ou estirpe, no entanto não é possível afirmar com certeza, pois espécies/estirpes diferentes poderão ter conteúdo de GC muito próximo, sendo difícil a sua separação em gel de poliacrilamida. A diversidade encontrada nas raízes das amostras não é muito grande, mas devemos ter em atenção que esta não é representativa da diversidade de FMA no solo. Alguns trabalhos mostraram haver uma diversidade maior de FMA na rizosfera do que aquela que se encontra nas raízes das plantas (Mirás-Avalos *et al.*, 2011; Bonfim *et al.*, 2015).

Os padrões de bandas obtidos foram analisados, utilizando o programa Fingerprinting II, tendo-se construído o dendrograma apresentado na figura 8. A análise

do dendrograma permite-nos verificar que a diversidade de OTUs separa as amostras em dois grandes grupos, em que os integrantes de cada grupo apresentam similaridade superior a 70% entre si, ficando apenas a amostra 31PV-E isolada. O primeiro grupo é constituído pelas amostras de origem agrícola (PV – *Phaseolus vulgaris*; VF – *Vicia faba*), à exceção de 31PV-E, e o segundo grupo é constituído pelas amostras das plantas silvestres. A similaridade a nível de diversidade e composição de FMA entre estes dois grupos é inferior a 70%. As amostras organizadas em subgrupos na sua maioria por locais de recolha apresentam similaridades de 100% entre as amostras, indicando que há diferenças na composição de FMA que colonizam estas espécies, consoante o local. Esta situação é mais evidente para as espécies agrícolas do que para as plantas silvestres. Nas espécies silvestres é possível observar que amostras de locais diferentes apresentam padrões semelhantes. Este resultado pode dever-se a uma menor diversidade de FMA existente no habitat de *Genista tenera* e *Teline maderensis* que, como foi dito anteriormente, ocorre em locais rochosos e com declive acentuado, ou ainda pela proximidade apresentada por estes dois géneros.

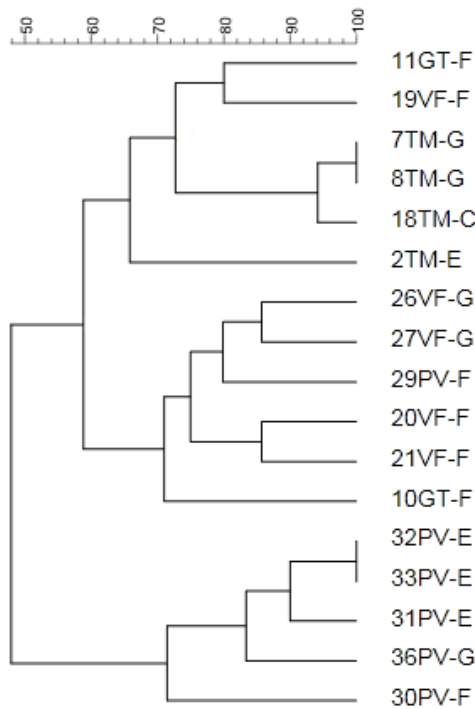
Dice (Opt:0.50%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
DGGE



**Figura 8** – Dendrograma obtido pelo método hierárquico UPGMA e coeficiente de Dice. Opt. 0,5 e Tol. 1,0%-1,0% foram os valores estipulados para normalização das bandas. As amostras estão identificadas consoante indicado nos métodos, ao número acrescentaram-se as iniciais das espécies (TM – *Teline maderensis*; GT – *Genista tenera*; VF – *Vicia faba*; PV – *Phaseolus vulgaris*) e após o hífen a inicial do local de recolha (E – Encumeada; F – Faial; G – Ginjas; C – Cruzinhas).

Para complementar a análise e porque não se conhecem trabalhos que tenham utilizado o par de *primers* nu-SSU-0817/AML2-GC na análise de diversidade de FMA pelo método de DGGE, realizou-se uma análise, com a técnica de RFLP utilizando os fragmentos amplificados pelo par de *primers* AML1/AML2. Os géis gerados pelas duas enzimas de restrição utilizadas (AluI e HinfI) foram submetidos a análise, utilizando o programa Fingerprinting II. Os géis foram conjugados e obteve-se um dendrograma consensual para a diversidade de padrões moleculares (Figura 9).

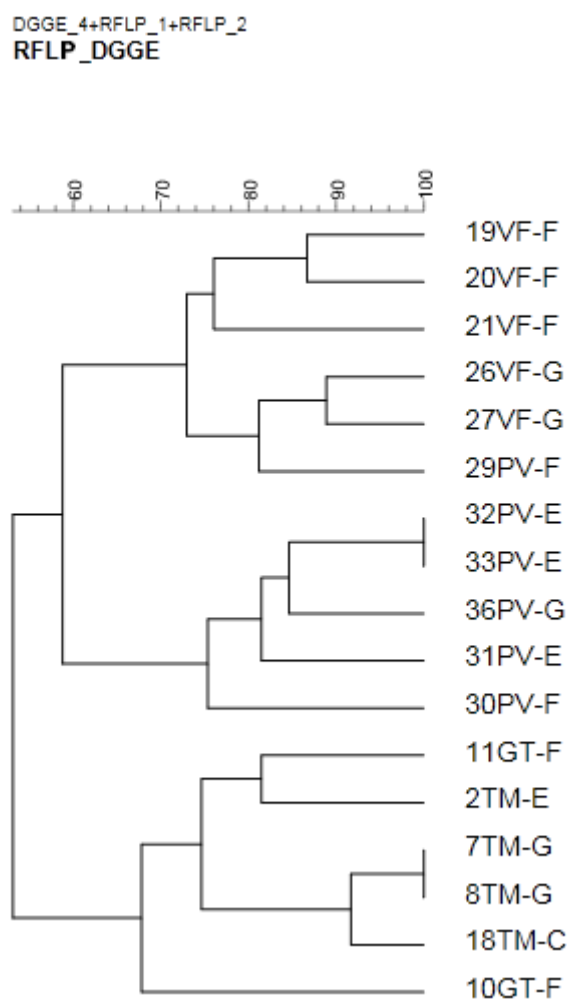
RFLP\_1+RFLP\_2  
RFLP\_ALUI\_HINFI



**Figura 9** – Dendrograma de consenso entre os padrões obtidos pelas duas enzimas de restrição. Opt. 0,5 e Tol. 1,0%-1,0% foram os valores estipulados para normalização das bandas. As amostras estão identificadas consoante indicado nos métodos, ao número acrescentaram-se as iniciais das espécies (TM – *Teline maderensis*; GT – *Genista tenera*; VF – *Vicia faba*; PV – *Phaseolus vulgaris*) e após o hífen o local de recolha (E – Encumeada; F – Faial; G – Ginjas; C – Cruzinhas).

As amostras agruparam-se em três clusters com similaridades igual ou superiores a 65%. Embora ligeiramente diferente do dendrograma obtido, através da técnica de DGGE, mantém-se a separação das espécies agrícolas das silvestres. No entanto, existem algumas exceções, nomeadamente 10GT-F que aparece entre amostras das espécies agrícolas e a 19VF-F que se agrupou com as espécies silvestres. A espécie *Phaseolus vulgaris* separou-se quase totalmente das outras espécies, à exceção de 29PV-F, apresentando uma similaridade inferior a 50% com os outros dois grupos, indicando que a diversidade e composição da comunidade de FMA encontrada nas suas raízes têm pouca similaridade com a encontrada nas raízes das outras espécies. O agrupamento dos padrões por local de recolha é menos evidente neste dendrograma.

Dadas as diferenças encontradas entre as duas técnicas, construiu-se um dendrograma de consenso entre ambas as técnicas (Figura 10).



**Figura 10** — Dendrograma de consenso entre os padrões obtidos pelas duas técnicas. Opt. 0,5 e Tol. 1,0%-1,0% foram os valores estipulados para normalização das bandas. As amostras estão identificadas consoante indicado nos métodos, ao número acrescentaram-se as iniciais das espécies (TM – *Teline maderensis*; GT – *Genista tenera*; VF – *Vicia faba*; PV – *Phaseolus vulgaris*) e após o hífen o local de recolha (E – Encumeada; F – Faial; G – Ginjas; C – Cruzinhas).

Com similaridade igual ou superior a 65% observa-se 3 grupos. O grupo mais afastado, com similaridade inferior a 55% em relação aos restantes grupos, agrupa todas as espécies silvestres. Novamente, temos um grupo composto pela espécie *Phaseolus vulgaris*, com exceção de 29PV-F, e outro composto maioritariamente pela espécie *Vicia faba*. A diversidade e composição das comunidades existente nas raízes de *Vicia faba* estão claramente agrupada por local de recolha, sugerindo que há diferenças nas comunidades de FMA que colonizam as raízes desta espécie de local para local. Contudo, quando analisamos as restantes espécies, verificamos que essas diferenças

entre locais não são tão evidentes, sendo difícil tirar uma conclusão acerca desta questão.

A diversidade de FMA do *Phaseolus vulgaris* seria de esperar que fosse similar à *Vicia faba*, já que foram colhidas nos mesmos terrenos (Ginjas e Faial), embora em alturas diferentes, para além de que são plantas da mesma família. No entanto essa similaridade não foi observada. Jansa *et al.* (2003) observaram alterações na comunidade de FMA que colonizam as raízes de *Zea mays* L. após aplicação de diferentes técnicas de lavoura. Os autores sugeriram que estas alterações podem ter a ver com a tolerância dos diferentes *taxa* em relação às técnicas de lavoura, ou devido a alterações na concentração dos nutrientes no solo, na composição da comunidade microbiana ou da população de ervas daninhas. Embora não haja informação acerca da mobilização do solo dos terrenos, onde as amostras destas duas plantas foram recolhidas, é possível afirmar que houve alteração na concentração de nutrientes, podendo ter sido esta a causa da baixa similaridade entre a diversidade de FMA nas raízes de *Phaseolus vulgaris* e *Vicia faba*. As alterações mais evidentes ocorreram com a concentração de nitratos, fósforo assim ilável, potássio assimilável, ferro e grau de saturação. O cobre também apresentou uma alteração considerável, embora não tão acentuada. Para além disto, o facto de serem géneros diferentes também pode influenciar. Bainard, *et al.* (2014), embora tenham encontrado semelhanças no nível de riqueza e diversidade de FMA nas raízes de dois legumes diferentes (lentilha e ervilha) e que se afastava consideravelmente de outra cultura não-leguminosa (trigo), perceberam que em termos de composição das comunidades de FMA havia diferenças.

No que diz respeito às plantas silvestres, não há uma separação evidente entre as duas espécies, o que decerta forma contraria os resultados obtidos para *Vicia faba* e *Phaseolus vulgaris*. No entanto, os dados da composição dos solos, onde foram colhidas mostra que não há diferenças muito acentuadas. Este facto pode justificar a distribuição das duas espécies num só grupo, apresentando similaridade nos padrões de FMA igual ou superior a 65%. Estes dados são suportados por vários trabalhos que mostram que os fatores edáficos (Schultz, 1996; Bainard *et al.*, 2014; Bonfim *et al.*, 2015), e o hospedeiro (Johnson *et al.*, 1992; Bainard *et al.*, 2014) têm influência na composição das comunidades de FMA. Contudo, *Genista tenera* e *Teline maderensis* são géneros muito próximos, tendo sido inicialmente colocados no mesmo género (*Genista*) (Menezes, 1914), podendo esta também ser uma razão para a sua proximidade em termos de composição de FMA nas suas raízes.

## Conclusões

Os resultados deste trabalho mostram que a composição do solo influencia quer a percentagem de colonização micorrízica arbuscular, quer a composição e diversidade das comunidades de FMA nas raízes. Embora, o P assimilável tenha sido o nutriente que se correlacionou mais fortemente com a colonização AM, apresentando uma correlação negativa, outros nutrientes também apresentaram correlações negativas (K de troca, N, Cu e Fe) ou positivas (Mg de troca e Mn). O grau de saturação e o pH também parecem influenciar a colonização, apresentando uma correlação positiva essencialmente com CV.

A análise de variância entre CH, CV e CA e as altitudes a que foram colhidas não foi significativa, o que nos indica que a altitude a que foram colhidas não influencia nos índices de colonização das raízes. Relativamente à análise feita entre espécies, o resultado não foi conclusivo, visto diferenciar apenas *Phaseolus vulgaris* das restantes espécies em estudo. A análise de variância para o tipo de solo (agrícola ou florestal) foi significativa apenas para a colonização vesicular (CV). Este resultado pode indicar que existem mais *taxa* de FMA que formam vesículas nos solos florestais do que nos solos agrícolas. Uma análise mais aprofundada e recorrendo a técnicas moleculares para identificação dos *taxa* existentes neste tipo de solo poderá dar-nos dados mais consistentes.

A diversidade e composição das comunidades de FMA que colonizam as raízes das plantas em estudo parecem ter sido influenciadas pelos parâmetros edáficos do solo, mas também pelo hospedeiro. Esta conclusão parte do facto de os *clusters* que se formaram nos dendrogramas terem separado *Phaseolus vulgaris* e *Vicia faba*, no entanto terem agrupado *Teline maderensis* e *Genista tenera*. A comparação das características químicas do solo mostra que há diferenças consideráveis entre os solos agrícolas, mas não entre os solos de origem florestal.

No que diz respeito às técnicas moleculares utilizadas neste trabalho, verifica-se que o par de *primers* nu-SSU-0817/AML2, utilizado na técnica de DGGE gerou um dendrograma com algumas diferenças, em termos de *clusters*, do dendrograma gerado pela técnica de RFLP, o que pode indicar que a técnica só por si não é capaz de separar todos os *taxa* existentes nas amostras de DNA de raízes. Esta situação pode dever-se a uma baixa variabilidade na concentração de GC do fragmento amplificado. No entanto, um trabalho mais aprofundado usando este par de *primers*, passando pela sequenciação das bandas obtidas em DGGE, deverá ser feito de forma a validar este resultado. A

utilização deste par de *primers* seria útil dado que é transversal a todas as famílias de FMA, o que não acontece com a maioria dos pares de *primers* utilizados por outros autores na técnica de DGGE.

### **Perspetivas Futuras**

Na ilha da Madeira são poucos os estudos sobre micorrizas arbusculares, pelo que é importante que continue a ser feito trabalho no sentido de perceber as características ecológicas dos FMA que colonizam as plantas da ilha, bem como os *taxa* existentes. Sendo assim, deverão ser desenvolvidos esforços no sentido de complementar este estudo com a identificação dos FMA que colonizam estas plantas e analisar não só as raízes de outras plantas de interesse, mas também as comunidades de FMA existentes no solo. Um melhor conhecimento deste grupo de fungos e a sua identificação são fundamentais para que se possa tirar proveito das vantagens desta simbiose, visto que a utilização de FMA bem adaptados às condições edáficas e ambientais dos locais onde são desenvolvidos os estudos pode ser crucial na obtenção dos resultados desejados.

Um outro aspeto a ter em conta é o par de primers nu-SSU-0817/AML2 que deve ser comparado com outros pares de *primers* utilizados com frequência em estudos de biodiversidade de comunidades de FMA a fim de verificar a sua utilidade na técnica de DGGE ou em outras que necessitem de fragmentos pequenos, como TGGE e SSCP.



## Bibliografia

- Abd-Alla, M.H., Omar, S.A., Karanxha, S., 2000. The impact of pesticides on arbuscular mycorrhizal and nitrogen-fixing symbioses in legumes. *Applied Soil Ecology* 14, 191-200.
- Abdelhalim, T.S., Finckh, M.R., Babiker, A.G., Oehl, F., 2014. Species composition and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in White Nile state, Central Sudan. *Archives of Agronomy and Soil Science* 60, 377-391.
- Akhtar, M., Siddiqui, Z., 2008. Arbuscular Mycorrhizal Fungi as Potential Bioprotectants Against Plant Pathogens. In: Siddiqui, Z., Akhtar, M.S., Futai, K. (Eds.), *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer Netherlands, pp. 61-97.
- Al-Karaki, G., McMichael, B., Zak, J., 2004. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza* 14, 263-269.
- Alguacil, M.M., Roldán, A., Torres, M.P., 2009. Assessing the diversity of AM fungi in arid gypsumophilous plant communities. *Environmental Microbiology* 11, 2649-2659.
- Ames, R.N., Reid, C.P.P., Porter, L.K., Cambardella, C., 1983. Hyphal Uptake and Transport of Nitrogen from Two <sup>15</sup>N-Labelled Sources by *Glomus mosseae*, a Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *New Phytologist* 95, 381-396.
- Azcón, R., Rodríguez, R., Amora-Lazcano, E., Ambrosano, E., 2008. Uptake and metabolism of nitrate in mycorrhizal plants as affected by water availability and N concentration in soil. *European Journal of Soil Science* 59, 131-138.
- Babikova, Z., Gilbert, L., Bruce, T.J.A., Birkett, M., Caulfield, J.C., Woodcock, C., Pickett, J.A., Johnson, D., 2013. Underground signals carried through common mycelial networks warn neighbouring plants of aphid attack. *Ecology Letters* 16, 835-843.
- Bainard, L.D., Bainard, J.D., Hamel, C., Gan, Y., 2014. Spatial and temporal structuring of arbuscular mycorrhizal communities is differentially influenced by abiotic factors and host crop in a semi-arid prairie agroecosystem. *FEMS Microbiology Ecology* 88, 333-344.
- Barea, J.M., Palenzuela, J., Cornejo, P., Sánchez-Castro, I., Navarro-Fernández, C., López-García, A., Estrada, B., Azcón, R., Ferrol, N., Azcón-Aguilar, C., 2011. Ecological and functional roles of mycorrhizas in semi-arid ecosystems of Southeast Spain. *Journal of Arid Environments* 75, 1292-1301.
- Barrett, G., Campbell, C.D., Fitter, A.H., Hodge, A., 2011. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus hoi* can capture and transfer nitrogen from organic patches to its associated host plant at low temperature. *Applied Soil Ecology* 48, 102-105.
- Bever, J.D., Schultz, P.A., Pringle, A., Morton, J.B., 2001. Arbuscular Mycorrhizal Fungi: More Diverse than Meets the Eye, and the Ecological Tale of Why: The high diversity of ecologically distinct species of arbuscular mycorrhizal fungi within a single community has broad implications for plant ecology. *BioScience* 51, 923-931.
- Bills, R., Morton, J., 2015. A combination of morphology and 28S rRNA gene sequences provide grouping and ranking criteria to merge eight into three *Ambispora* species (Ambisporaceae, Glomeromycota). *Mycorrhiza*, 1-14.
- Blanke, V., Renker, C., Wagner, M., Füllner, K., Held, M., Kuhn, A.J., Buscot, F., 2005. Nitrogen supply affects arbuscular mycorrhizal colonization of *Artemisia vulgaris* in a phosphate-polluted field site. *New Phytologist* 166, 981-992.
- Bonfim, J., Vasconcellos, R., Gumiere, T., de Lourdes Colombo Mescolotti, D., Oehl, F., Nogueira Cardoso, E., 2015. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in a Brazilian Atlantic Forest Toposequence. *Microb Ecol*, 1-14.

Borneman, J., Hartin, R.J., 2000. PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples.

Applied Environmental Microbiology 66 4356-4360.

Boyer, L., Brain, P., Xu, X.-M., Jeffries, P., 2015. Inoculation of drought-stressed strawberry with a mixed inoculum of two arbuscular mycorrhizal fungi: effects on population dynamics of fungal species in roots and consequential plant tolerance to water deficiency. *Mycorrhiza* 25, 215-227.

Briccoli Bati, C., Santilli, E., Lombardo, L., 2015. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and on micronutrient and macronutrient uptake and allocation in olive plantlets growing under high total Mn levels. *Mycorrhiza* 25, 97-108.

Bridge, P., Spooner, B., 2001. Soil fungi: diversity and detection. *Plant Soil* 232, 147-154.

Brundrett, M., 1991. Mycorrhizas in Natural Ecosystems. In: M. Begon, A.H.F., Macfadyen, A. (Eds.), *Advances in Ecological Research*. Academic Press, pp. 171-313.

Brundrett, M.C., 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154, 275-304.

Brundrett, M.C., 2008. Mycorrhizal Associations: The Web Resource.

Bucher, M., 2007. Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytologist* 173, 11-26.

Burni, T., Hussain, F., Sharief, M., 2011. Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) Associated With The Rhizosphere of *Mentha Arvensis* L., and *M. Longifolia* Huds. *Pakistan Journal of Botany* 43, 3013-3019.

Campagnac, E., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Debiante, D., Fontaine, J., Laruelle, F., Garçon, G., Verdin, A., Durand, R., Shirali, P., Grandmougin-Ferjani, A., 2010. Arbuscular mycorrhiza partially protect chicory roots against oxidative stress induced by two fungicides, fenpropimorph and fenhexamid. *Mycorrhiza* 20, 167-178.

Carter, K., Smith, J., White, M., Serpe, M., 2014. Assessing the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in semiarid shrublands dominated by *Artemisia tridentata* ssp. *wyomingensis*. *Mycorrhiza* 24, 301-314.

Carvalho, L.M.M.d., 2003. Aspectos Ecológicos das Micorrizas Arbusculares na Vegetação de Sapal. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Universidade de Lisboa, Lisboa, p. 154.

Chandrasekaran, M., Boughattas, S., Hu, S., Oh, S.-H., Sa, T., 2014. A meta-analysis of arbuscular mycorrhizal effects on plants grown under salt stress. *Mycorrhiza* 24, 611-625.

Chao, S., Somers, D.J., 2006. Wheat and Barley DNA Extraction (96-well plate format adapted to robot)

Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J.-K., 2005. Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. *Crop Science* 45, 437-448.

Chirinda, N., Olesen, J.E., Porter, J.R., Schjøning, P., 2010. Soil properties, crop production and greenhouse gas emissions from organic and inorganic fertilizer-based arable cropping systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 139, 584-594/584-594/594.

Christie, P., Li, X., Chen, B., 2004. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. *Plant Soil* 261, 209-217.

Ciftci, V., Turkmen, O., Erdinc, C., Sensoy, S., 2010. Effects of different arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) species on some bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars grown in salty conditions. *African Journal of Agricultural Research* 5, 3408-3416.

- Clapp, J.P., Fitter, A.H., Young, J.P.W., 1999. Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp. *Molecular Ecology* 8, 915-921.
- Corradi, N., Bonfante, P., 2012. The Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis: Origin and Evolution of a Beneficial Plant Infection. *PLoS Pathogens* 8, e1002600.
- Criado, M., H. Gutierrez Boem, F., Roberts, I., Caputo, C., 2015. Post-anthesis N and P dynamics and its impact on grain yield and quality in mycorrhizal barley plants. *Mycorrhiza* 25, 229-235.
- Cruz, C., Ramos, A., Façanha, A., Feijó, J., Martins-Loução, A., M., 2009. Enzyme activity modulated by AMF colonization: the urea cycle and membrane-bound phosphatase activities. In: (eds), A.V. (Ed.), *A Text Book of Molecular Biotechnology*. Springer Publishers, pp. 563-572.
- Doyle, J., Doyle, J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15.
- Duarte, S., Cassio, F., Pascoal, C., 2012. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology - Insights from Freshwaters. In: Magdeldin, D.S. (Ed.), *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*. InTech.
- Dugassa, G.D., von Alten, H., Schönbeck, F., 1996. Effects of arbuscular mycorrhiza (AM) on health of *Linum usitatissimum* L. infected by fungal pathogens. *Plant Soil* 185, 173-182.
- Duponnois, R., Galiana, A., Prin, Y., 2008. The Mycorrhizosphere Effect: A Multitrophic Interaction Complex Improves Mycorrhizal Symbiosis and Plant Growth. In: al., Z.A.S.e. (Ed.), *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer Science + Business Media B.V., pp. 227-240.
- Fang, G., Hammar, S., Grumet, R., 1992. A Quick and Inexpensive Method for Removing Polysaccharides from Plant Genomics *Biotechniques* 13, 52-55.
- Finlay, R.D., 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany* 59, 1115-1126.
- Frey, B., SchÜEpp, H., 1993. Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. *New Phytologist* 124, 221-230.
- Galván, G.A., Parádi, I., Burger, K., Baar, J., Kuyper, T.W., Scholten, O.E., Kik, C., 2009. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in onion roots from organic and conventional farming systems in the Netherlands. *Mycorrhiza* 19, 317-328.
- Garg, N., Pandey, R., 2015. Effectiveness of native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi on nutrient uptake and ion homeostasis in salt-stressed *Cajanus cajan* L. (Millsp.) genotypes. *Mycorrhiza* 25, 165-180.
- Garmendia, I., Goicoechea, N., Aguirreolea, J., 2005. Moderate drought influences the effect of arbuscular mycorrhizal fungi as biocontrol agents against *Verticillium*-induced wilt in pepper. *Mycorrhiza* 15, 345-356.
- Gernns, H., Alten, H., Poehling, H.-M., 2001. Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen – is a compensation possible? *Mycorrhiza* 11, 237-243.
- Gianinazzi-Pearson, V., 1996. Plant Cell Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Getting to the Roots of the Symbiosis. *The Plant Cell* 8, 1871-1883.
- Giasson, P., Karam, A., Jaouich, A., 2008. Arbuscular Mycorrhizae and Alleviation of Soil Stresses on Plant Growth. In: Siddiqui, Z., Akhtar, M.S., Futai, K. (Eds.), *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer Netherlands, pp. 99-134.

- Guidi, L., Lorefice, G., Pardossi, A., Malorgio, F., Tognoni, F., Soldatini, G.F., 1997. Growth and photosynthesis of *Lycopersicon esculentum* (L.) plants as affected by nitrogen deficiency. *Biologia Plantarum* 40, 235-244.
- Gupta, M.L., Prasad, A., Ram, M., Kumar, S., 2002. Effect of the vesicular–arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. *Bioresource Technology* 81, 77-79.
- Habte, M., Osorio, N.W., 2001. Arbuscular Mycorrhizas: Producing and Applying Arbuscular Mycorrhizal Inoculum. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa, Manoa, Hawaii.
- Harrison, M.J., 1997. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. *Trends in Plant Science* 2, 54-60.
- Harrison, M.J., 1998. Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 360–365.
- Harrison, M.J., Buuren, M.L.v., 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378, 626-629.
- Hawkins, H.-J., Johansen, A., George, E., 2000. Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 226, 275-285.
- Helgason, T., Merryweather, J.W., Denison, J., Wilson, P., Young, J.P.W., Fitter, A.H., 2002. Selectivity and Functional Diversity in Arbuscular Mycorrhizas of Co-Occurring Fungi and Plants from a Temperate Deciduous Woodland. *Journal of Ecology* 90, 371-384.
- Hempel, S., Renker, C., Buscot, F., 2007. Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *Environmental Microbiology* 9, 1930-1938.
- Hodge, A., Helgason, T., Fitter, A.H., 2010. Nutritional ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology* 3, 267–273.
- Hodge, A., Storer, K., 2015. Arbuscular mycorrhiza and nitrogen: implications for individual plants through to ecosystems. *Plant Soil* 386, 1-19.
- Hoshino, Y.T., 2012. Molecular Analyses of Soil Fungal Community – Methods and Applications. In: Soriano, D.M.C.H. (Ed.), *Soil Health and Land Use Management*. InTech.
- Hu, J., Lin, X., Wang, J., Cui, X., Dai, J., Chu, H., Zhang, J., 2010. Arbuscular mycorrhizal fungus enhances P acquisition of wheat (*Triticum aestivum* L.) in a sandy loam soil with long-term inorganic fertilization regime. *Appl Microbiol Biotechnol* 88, 781–787.
- Hu, Y., Wu, S., Sun, Y., Li, T., Zhang, X., Chen, C., Lin, G., Chen, B., 2015. Arbuscular mycorrhizal symbiosis can mitigate the negative effects of night warming on physiological traits of *Medicago truncatula* L. *Mycorrhiza* 25, 131-142.
- Husband, R., Herre, E.A., Young, J.P.W., 2002. Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonising seedlings in a tropical forest. *FEMS Microbiology Ecology* 42, 131-136.
- Ibijbijen, J., Urquiaga, S., Ismaili, M., Alves, B.J.R., Boddey, R.M., 1996. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition and nitrogen fixation of three varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *New Phytologist* 134, 353-360.
- Idoia, G., Nieves, G., Jone, A., 2004. Plant Phenology Influences the Effect of Mycorrhizal Fungi on the Development of Verticillium-induced Wilt in Pepper. *European Journal of Plant Pathology* 110, 227-238.
- Jakobsen, I., Rosendahl, L., 1990. Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist* 115, 77-83.

- Jansa, J., Mozafar, A., Kuhn, G., Anken, T., Ruh, R., Sanders, I.R., Frossard, E., 2003. SOIL TILLAGE AFFECTS THE COMMUNITY STRUCTURE OF MYCORRHIZAL FUNGI IN MAIZE ROOTS. *Ecological Applications* 13, 1164-1176.
- Jardim, R., Fernandes, F.M., Carvalho, J.A., Florestas, D.R.d., Madeira, J.B.d., 2006. Flora. In: Faria, B.F. (Ed.), *Fauna e Flora da Madeira*, Funchal.
- Jin, H., Liu, J., Liu, J., Huang, X., 2012. Forms of nitrogen uptake, translocation, and transfer via arbuscular mycorrhizal fungi: A review. *Sci. China Life Sci.* 55, 474-482.
- Jin, H., Pfeffer, P.E., Douds, D.D., Piotrowski, E., Lammers, P.J., Shachar-Hill, Y., 2005. The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 168, 687-696.
- Johansen, A., Finlay, R.D., Olsson, P.A., 1996. Nitrogen Metabolism of External Hyphae of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 133, 705-712.
- Johnson, N.C., Graham, J.H., Smith, F.A., 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum\*. *New Phytologist* 135, 575-585.
- Johnson, N.C., Tilman, D., Wedin, D., 1992. Plant and Soil Controls on Mycorrhizal Fungal Communities. *Ecology* 73, 2034-2042.
- Karanika, E.D., Voulgari, O.K., Mamolos, A.P., Alifragis, D.A., Veresoglou, D.S., 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi in northern Greece and influence of soil resources on their colonization. *Pedobiologia* 51, 409-418.
- Koide, R.T., Li, M., 1990. On host regulation of the vesicular—arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 114, 59-74.
- Koske, R.E., Gemma, J.N., 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research* 92, 486-488.
- Lang, B.F., O'Kelly, C., Nerad, T., Gray, M.W., Burger, G., 2002. The Closest Unicellular Relatives of Animals. *Current Biology* 12, 1773-1778.
- Lee, J., J., S.L.a., Young, P.W., 2008a. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 65, 339–349.
- Lee, J., Lee, S., Young, J.P.W., 2008b. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 65, 339–349.
- Lee, J., Park, S.-H., Eom, A.-H., 2006. Molecular Identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Spores Collected in Korea. *Mycobiology* 34, 7-13.
- Li, B., Ravnskov, S., Xie, G., Larsen, J., 2007. Biocontrol of *Pythium* damping-off in cucumber by arbuscular mycorrhiza-associated bacteria from the genus *Paenibacillus*. *BioControl* 52, 863-875.
- Li, L.-F., Li, T., Zhang, Y., Zhao, Z.-W., 2010. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their distribution patterns related to host-plants and habitats in a hot and arid ecosystem, southwest China. *FEMS Microbiology Ecology* 71, 418-427.
- Li, T., Lin, G., Zhang, X., Chen, Y., Zhang, S., Chen, B., 2014. Relative importance of an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) and root hairs in plant drought tolerance. *Mycorrhiza* 24, 595-602.
- Liang, Z., Drijber, R.A., Lee, D.J., Dwiekat, I.M., Harris, S.D., Wedin, D.A., 2008. A DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 956-966.
- Lingfei, L., Anna, Y., Zhiwei, Z., 2005. Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in southwest China. *FEMS Microbiology Ecology* 54, 367-373.

- Lioussanne, L., Jolicoeur, M., St-Arnaud, M., 2009. Role of Root Exudates and Rhizosphere Microflora in the Arbuscular Mycorrhizal Fungi-Mediated Biocontrol of *Phytophthora nicotianae* in Tomato. In: Varma, A., Kharkwal, A. (Eds.), *Symbiotic Fungi*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 141-158.
- Liu, Y., He, J., Shi, G., An, L., Öpik, M., Feng, H., 2011. Diverse communities of arbuscular mycorrhizal fungi inhabit sites with very high altitude in Tibet Plateau. *FEMS Microbiology Ecology* 78, 355-365.
- Marschner, H., Dell, B., 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* 159, 89-102.
- Marsh, T.L., 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): An emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology* 2, 323-327.
- Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Dechorgnat, J., Chardon, F., Gaufichon, L., Suzuki, A., 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 105, 1141-1157.
- McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.L., Swan, J.A., 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115, 495-501.
- Melo, I., Cardoso, J., 2008. Os Fungos (Fungi) dos Arquipélagos da Madeira e das Selvagens. In: Borges, P.A.V., Abreu, C., Aguiar, A.M.F., Carvalho, P., Jardim, R., Melo, I., Oliveira, P., Sérgio, C., Serrano, A.R.M., Vieira, P. (Eds.), *Listagem dos fungos, flora e fauna terrestres dos arquipélagos da Madeira e Selvagens*. Direcção Regional do Ambiente da Madeira e Universidade dos Açores, Funchal e Angra do Heroísmo, pp. 57-93.
- Menezes, C.A.d., 1914. *Flora do Archipelago da Madeira*. Typ. Bazar do Povo, Funchal.
- Menezes, D., Freitas, I., Gouveia, L., Mateus, M.d.G., Domingues, M.M., Oliveira, P., Fontinha, S., 2004. *A Floresta Laurissilva da Madeira - Património Mundial*. Secretaria Regional do Ambiente e dos Recursos Naturais - Serviço do Parque Natural da Madeira, Funchal.
- Mirás-Avalos, J.M., Antunes, P.M., Koch, A., Khosla, K., Klironomos, J.N., Dunfield, K.E., 2011. The influence of tillage on the structure of rhizosphere and root-associated arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Pedobiologia* 54, 235-241.
- Morton, J., 2013. *INVAM - International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi*
- Muleta, D., 2010. Legume Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi Inoculation in Sustainable Agriculture. In: Khan, M., Musarrat, J., Zaidi, A. (Eds.), *Microbes for Legume Improvement*. Springer Vienna, pp. 293-323.
- Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127-141.
- Navarro-Fernández, C.M., De La Riva, E.G., Vera, J.R., Tosto, A., Olmo, M., Pérez-Ramos, I.M., Villar, R., Marañón, T., 2013. Diversidad funcional de rasgos radiculares y grado de micorrización de especies leñosas mediterráneas a lo largo de un gradiente de disponibilidad de recursos edáficos. 6º Congreso Forestal Español. Montes: servicios y desarrollo rural: 6CFE01-008. Sociedad Española de Ciencias Forestales.
- Nilsson, L.O., Giesler, R., Bååth, E., Wallander, H., 2005. Growth and biomass of mycorrhizal mycelia in coniferous forests along short natural nutrient gradients. *New Phytologist* 165, 613-622.

- Panwar, J., Tarafdar, J.C., 2006. Distribution of three endangered medicinal plant species and their colonization with arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Arid Environments* 65, 337-350.
- Patreze, C.M., Moreira, M., Tsai, S.M., 2012. Advances in Molecular Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (Phylum Glomeromycota) in Forest Ecosystems. In: Blanco, D.J.A. (Ed.), *Forest Ecosystems - More than Just Trees*. InTech.
- Paungfoo-Lonhienne, C., Yeoh, Y.K., Kasinadhuni, N.R.P., Lonhienne, T.G.A., Robinson, N., Hugenholtz, P., Ragan, M.A., Schmidt, S., 2015. Nitrogen fertilizer dose alters fungal communities in sugarcane soil and rhizosphere. *Scientific Reports* 5, 8678.
- Pennings, S.C., Bertness, M.D., 2001. Salt Marsh Communities. In: M. D. Bertness, S.D.G., M. Hay (Ed.), *Marine Community Ecology*. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts, pp. 289-316.
- Prescott, L.M., 2002. *Microbiology*. McGraw-Hill Science/Engineering/Math New York.
- Press, J., Short, M., 1994. *Flora Of Madeira*. HMSO Publications Centre, Londres.
- Redecker, D., Hijri, I., Wiemken, A., 2003. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: Perspectives and problems. *Folia Geobot* 38, 113-124.
- Redecker, D., Kodner, R., Graham, L.E., 2000. Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science* 298, 1920-1921.
- Redecker, D., Schüßler, A., Stockinger, H., Stürmer, S.L., Morton, J.B., Walker, C., 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23, 515–531.
- Sánchez-Castro, I., Ferrol, N., Barea, J.M., 2012. Analyzing the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing the roots of representative shrubland species in a Mediterranean ecosystem. *Journal of Arid Environments* 80, 1-9.
- Sannazzaro, A.I., Echeverría, M., Albertó, E.O., Ruiz, O.A., Menéndez, A.B., 2007. Modulation of polyamine balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 39-46.
- Sawers, R.H., Yang, S.-Y., Gutjahr, C., Paszkowski, U., 2008a. The Molecular Components of Nutrient Exchange in Arbuscular Mycorrhizal Interactions. In: Siddiqui, Z., Akhtar, M.S., Futai, K. (Eds.), *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer Netherlands, pp. 37-59.
- Sawers, R.J.H., Yang, S.-Y., Gutjahr, C., Paszkowski, U., 2008b. The Molecular Components of Nutrient Exchange in Arbuscular Mycorrhizal Interactions. In: al., Z.A.S.e. (Ed.), *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer Science + Business Media B.V., pp. 37–59.
- Scheublin, T.R., Ridgway, K.P., Young, J.P.W., van der Heijden, M.G.A., 2004. Nonlegumes, Legumes, and Root Nodules Harbor Different Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6240-6246.
- Schultz, P.A., 1996. *Arbuscular Mycorrhizal Species Diversity and Distribution in an Old Field Community*. Duke University.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C., 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycology Research* 105 1413-1421.
- Schüßler, A., Walker, C., 2010. *The Glomeromycota. A species list with new families and new genera*. Arthur Schüßler & Christopher Walker, Gloucester, Gloucester, England.
- Schüßler, A., Schwarzott, D., Walker, C., 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol Res.* 105, 1413-1421.

- Shepherd, L., McLay, T.B., 2011. Two micro-scale protocols for the isolation of DNA from polysaccharide-rich plant tissue. *J Plant Res* 124, 311-314.
- Siddiqui, Z., Pichtel, J., 2008. Mycorrhizae: An Overview. In: Siddiqui, Z., Akhtar, M.S., Futai, K. (Eds.), *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer Netherlands, pp. 1-35.
- Simon, L., Bousquet, J., Levesque, R.C., and Lalonde, M., 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363, 67–69.
- Singh, S., Pandey, A., Chaurasia, B., Palni, L., 2008. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated with the rhizosphere of tea growing in ‘natural’ and ‘cultivated’ ecosystems. *Biol Fertil Soils* 44, 491-500.
- Subramanian, K.S., Charest, C., 1999. Acquisition of N by external hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus and its impact on physiological responses in maize under drought-stressed and well-watered conditions. *Mycorrhiza* 9, 69-75.
- Sultenfuss, J.H., Doyle, W.J., 1999. *Better Crops With Plant Food - Phosphorus for Agriculture*. International Plant Nutrition Institute.
- Taiz, L.Z., Eduardo, 2010. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts U.S.A.
- Tajini, F., Drevon, J.-J., 2012. Phosphorus use efficiency in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as related to compatibility of association among arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia. *African Journal of Biotechnology* 11, 12173-12182.
- Tajini, F., Trabelsi, M., Drevon, J.-J., 2012. Combined inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences* 19, 157-163.
- Ultra, V.U., Jr., Tanaka, S., Sakurai, K., Iwasaki, K., 2007. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on arsenic toxicity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and on the transformation of arsenic in the rhizosphere. *Plant Soil* 290, 29-41.
- Wang, P., Wang, Y., 2014. Community Analysis of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Roots of *Poncirus trifoliata* and *Citrus reticulata* Based on SSU rDNA. *The Scientific World Journal* 2014, 8.
- Wu, Q.S., Zou, Y.N., Liu, W., Ye, X.F., Zai, H.F., Zhao, L.J., 2010. Alleviation of salt stress in citrus seedlings inoculated with mycorrhiza: changes in leaf antioxidant defense systems. *Plant, Soil and Environment* 56, 470-475.
- Zaller, J.G., Heigl, F., Ruess, L., Grabmaier, A., 2014. Glyphosate herbicide affects belowground interactions between earthworms and symbiotic mycorrhizal fungi in a model ecosystem. *Scientific Reports* 4, 5634.
- Zangaro, W., Rostirola, L., de Souza, P., de Almeida Alves, R., Lescano, L., Rondina, A., Nogueira, M., Carrenho, R., 2013. Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. *Mycorrhiza* 23, 221-233.



## Anexos

### Anexo I

#### Preparação de soluções

##### A – Quantificação de raízes

###### **PVLG (Polivinil-Lacto-Glicerol)**

Água destilada	100 ml
Ácido láctico	100 ml
Glicerol	10 ml
Álcool Polivinil (PVA)	16,6g

##### B – Extração de DNA

###### **Tris-HCl 1M (100 ml)**

Tris base	12,112 g
ddH <sub>2</sub> O	70 ml
HCl	Ajustar o pH

Adicionar ddH<sub>2</sub>O até perfazer os 100 ml. Autoclavar.

###### **EDTA 0.5M (100 ml)**

2Na.EDTA.2H <sub>2</sub> O	18,608 g
NaOH	2 g
ddH <sub>2</sub> O	70 ml

Ajustar pH com NaOH e perfazer o volume com ddH<sub>2</sub>O. Autoclavar.

###### **Tris-EDTA (TE) pH 8.0 (100 ml)**

1M Tris-HCl	1 ml
0.5M EDTA pH 8.0	0,2 ml
ddH <sub>2</sub> O	98,8 ml

###### **SDS (Sódio-Dodecil-Sulfato) 10% (100 ml)**

SDS	10 g
ddH <sub>2</sub> O estéril	70 ml

Dissolver a 68°C. Adicionar ddH<sub>2</sub>O estéril até perfazer os 100 ml.

###### **Tampão de extração de DNA (100 ml)**

1M Tris-HCl pH 7.5	10 ml
0.5M EDTA pH 8.0	10 ml
10% SDS	125 ml
ddH <sub>2</sub> O	675 ml

**Acetato de Amônia 7.5M (100 ml)**

NH <sub>4</sub> OAc	57,81 g
ddH <sub>2</sub> O	50 ml

Após a dissolução do acetato de amônia, perfazer até os 100 ml.

**C - Eletroforese****TAE 50x (1L)**

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
0.5M EDTA pH 8.0	100 ml

Adicionar ddH<sub>2</sub>O até perfazer 1L. Autoclavar.

**Solução de Brometo de etídeo**

Brometo de Etídeo (SIGMA)	50µl
TAE 1x	200 ml

**Tampão Azul Bromofenol (50 ml)**

Azul de Bromofenol	0,05g
Xileno Cianol	0,05g
FICOLL 400	5g
TAE 1x	50 ml

**D - Técnica DGGE****Solução A 0% desnaturante (Acrilamida/Bis-Acrilamida) (100 ml)**

ABA 40% (ReadySol, HE Healthcare)	20 ml
TAE 50x	2 ml
Formamida desionizada	0 ml
Ureia	0 g
Glicerol (87%)	2,3 ml

Adicionar ddH<sub>2</sub>O estéril até perfazer os 100 ml.

**Solução B 100% desnaturante (Acrilamida/Bis-Acrilamida) (100 ml)**

ABA 40% (ReadySol, HE Healthcare)	20 ml
TAE 50x	2 ml
Formamida desionizada	40 ml
Ureia	42 g
Glicerol (87%)	2,3 ml

Adicionar ddH<sub>2</sub>O estéril até perfazer os 100 ml.

**Solução 40% desnaturante (25 ml)**

Solução A	15 ml
Solução B	10 ml

**Solução 60% desnaturante (25 ml)**

Solução A	10 ml
Solução B	15 ml

**APS (Persulfato de Amónia) 10% (1 ml)**

APS	0,1 g
ddH <sub>2</sub> O	1 ml

## Anexo II

### Análise Estatística

**Tabela 5** – Teste ANOVA para a variável independente “espécies”. A diferença média é significativa no nível 0,05, assinalada a negrito.

		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
CH	Entre Grupos	,916	4	,229	3,701	<b>,014</b>
	Nos grupos	1,919	31	,062		
	Total	2,835	35			
CA	Entre Grupos	,803	3	,268	8,534	<b>,000</b>
	Nos grupos	1,004	32	,031		
	Total	1,807	35			
CV	Entre Grupos	,213	4	,053	7,441	<b>,000</b>
	Nos grupos	,222	31	,007		
	Total	,435	35			

**Tabela 6** – Comparações múltiplas entre espécies, com variável dependente CH. Espécies: 1) *Teline maderensis*, 2) *Genista tenera*, 3) *Vicia faba*, 4) *Phaseolus vulgaris*. A diferença média é significativa no nível 0,05, assinalada a negrito.

Variável dependente		(I) Espécie	(J) Espécie	Erro Padrão	Sig.
CH	Tukey HSD	1,0	2,0	,112617	,997
			3,0	,112617	,935
			4,0	,112617	<b>,014</b>
		2,0	1,0	,112617	,997
			3,0	,112617	,863
			4,0	,112617	<b>,023</b>
		3,0	1,0	,112617	,935
			2,0	,112617	,863
			4,0	,112617	<b>,003</b>
		4,0	1,0	,112617	<b>,014</b>
			2,0	,112617	<b>,023</b>
			3,0	,112617	<b>,003</b>

**Tabela 7** – Comparações múltiplas entre espécies, com variável dependente CA. Espécies: 1) *Teline maderensis*, 2) *Genista tenera*, 3) *Vicia faba*, 4) *Phaseolus vulgaris*. A diferença média é significativa no nível 0,05, assinalada a negrito.

Varável dependente		(I) Espécie	(J) Espécie	Erro Padrão	Sig.
CA	Tukey HSD	1,0	2,0	,083497	,999
			3,0	,083497	<b>,004</b>
			4,0	,083497	,729
		2,0	1,0	,083497	,999
			3,0	,083497	<b>,006</b>
			4,0	,083497	,645
		3,0	1,0	,083497	<b>,004</b>
			2,0	,083497	<b>,006</b>
			4,0	,083497	<b>,000</b>
		4,0	1,0	,083497	,729
			2,0	,083497	,645
			3,0	,083497	<b>,000</b>

**Tabela 8** – Comparações múltiplas entre espécies, com variável dependente CV. Espécies: 1) *Teline maderensis*, 2) *Genista tenera*, 3) *Vicia faba*, 4) *Phaseolus vulgaris*. A diferença média é significativa no nível 0,05, assinalada a negrito.

Variável dependente		(I) Espécie	(J) Espécie	Erro Padrão	Sig.
CV	Tukey HSD	1,0	2,0	,046577	,996
			3,0	,046577	,425
			4,0	,046577	<b>,018</b>
		2,0	1,0	,046577	,996
			3,0	,046577	,555
			4,0	,046577	<b>,031</b>
		3,0	1,0	,046577	,425
			2,0	,046577	,555
			4,0	,046577	,397
		4,0	1,0	,046577	<b>,018</b>
			2,0	,046577	<b>,031</b>
			3,0	,046577	,397

**Tabela 9** – Teste ANOVA para a variável independente “tipo de solo”. A diferença média é significativa no nível 0,05, assinalada a negrito.

		Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
CA	Entre Grupos	,100	1	,100	1,982	,168
	Nos grupos	1,708	34	,050		
	Total	1,807	35			
CV	Entre Grupos	,097	1	,097	9,779	<b>,004</b>
	Nos grupos	,338	34	,010		
	Total	,435	35			
CH	Entre Grupos	,172	1	,172	2,197	,148
	Nos grupos	2,663	34	,078		
	Total	2,835	35			

**Tabela 10** – Teste ANOVA para a variável independente “altitude”. A diferença média é significativa no nível 0,05.

		Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	F	Sig.
CA	Entre Grupos	,132	2	,066	1,300	,286
	Nos grupos	1,675	33	,051		
	Total	1,807	35			
CV	Entre Grupos	,025	2	,012	1,004	,377
	Nos grupos	,410	33	,012		
	Total	,435	35			
CH	Entre Grupos	,297	2	,148	1,927	,162
	Nos grupos	2,539	33	,077		
	Total	2,835	35			