

DL 15.FEV2001*190891

**MICORRIZAS EM *FESTUCA BRIGANTINA*:
FUNCIONAMENTO E SIGNIFICADO ECOLÓGICO**
SUSANA CLÁUDIA DE FREITAS RODRIGUES GONÇALVES

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre em Ecologia.



COIMBRA 2 000

RESUMO

As micorrizas são associações simbióticas de carácter mutualista, estabelecidas entre as raízes das plantas e fungos filamentosos do solo. Comuns à maioria das espécies vegetais, encontram-se em praticamente todos os ecossistemas terrestres, cobrindo uma vasta gama de condições edafoclimáticas. Entre os vários tipos de micorrizas, as micorrizas arbusculares (AM) destacam-se pela sua abundância e carácter ancestral.

O principal efeito benéfico das AM para as plantas é, na maior parte dos casos, a melhoria da nutrição mineral, assumindo especial relevância o aumento da tomada de fósforo (P). Todavia, os efeitos não nutricionais vêm merecendo crescente atenção por parte dos investigadores, nomeadamente o potencial papel das AM na protecção das plantas contra o *stress* hídrico ou a toxicidade por metais pesados.

Os solos serpentínicos, derivados de rochas ultramáficas, possuem baixo teor de nutrientes essenciais, razão cálcio/magnésio desequilibrada e quantidades relativamente elevadas de metais pesados tais como níquel (Ni), crómio e cobalto. Além disso, caracterizam-se por uma constituição física pouco favorável à retenção de água. Em Portugal, localizam-se em Trás-os-Montes e cobrem ca. 8000 ha. O clima é mediterrânico, o que agrava o *stress* hídrico resultante da constituição física do solo.

As comunidades florísticas das áreas serpentínicas revestem-se de extrema

importância do ponto de vista ecofisiológico, pois traduzem uma perfeita adaptação das espécies vegetais às características do solo. De facto, quase todas as plantas serpentinícolas possuem adaptações morfológicas ou fisiológicas específicas que lhes permitem desenvolverem-se nestes *habitats*.

A formação de micorrizas poderá constituir igualmente importante estratégia de adaptação das plantas simbiontes às condições particulares destes solos. Com efeito, a presença de micorrizas foi assinalada em espécies vegetais de solos serpentínicos, tendo sido sugerida a sua importância para a melhoria da nutrição mineral, mas também para a protecção das plantas contra o *stress* hídrico e a toxicidade dos metais pesados.

O principal objectivo do trabalho aqui apresentado foi investigar a ecologia da colonização micorrízica em *Festuca brigantina*, gramínea endémica das áreas serpentínicas portuguesas e para a qual estudos prévios tinham já registado a ocorrência de AM.

Como primeira aproximação, a colonização micorrízica em *F. brigantina* foi quantificada mensalmente, durante um ciclo de crescimento desta espécie, e relacionada com a fenologia da planta, a nutrição fosfatada e as concentrações de Ni no solo rizosférico e nos tecidos vegetais. Os objectivos específicos foram investigar a ocorrência de flutuações sazonais nas taxas de colonização e determinar se a fenologia, o estado nutricional da planta no que respeita ao fósforo e/ou a tole-

rância ao Ni podem ser relacionados com os níveis de colonização no campo.

Como segunda aproximação, para além dos parâmetros já referidos, quantificou-se também a colonização através da localização *in planta* de actividade da fosfatase alcalina fúngica (ALP) com o objectivo de esclarecer a sua potencialidade, anteriormente sugerida por vários autores, como marcador da eficiência da simbiose AM.

F. brigantina apresentou-se sistematicamente colonizada durante o período de amostragem. A colonização AM, do tipo *near-Paris*, caracterizou-se pela abundância de hifas formando enrolamentos, *coils*, no interior das células corticais da raiz.

A razão entre a concentração de Ni na raiz e na parte aérea, extremamente baixa, indicou a existência de um forte mecanismo inibidor da translocação de Ni para a parte aérea em *F. brigantina*. Os fungos AM poderiam estar directamente envolvidos nesse mecanismo. No entanto, uma vez que não foi observada relação significativa entre a colonização e a translocação de Ni para a parte aérea, os resultados não apoiam tal hipótese.

Por seu lado, a relação entre a colonização, a fenologia e o investimento na parte aérea, assim como os dados da nutrição fosfatada, sugerem que as AM contribuem para a melhoria da nutrição fosfatada, providenciando uma reserva de P capaz de ser mobilizada em períodos de elevada procura como, por exemplo, o período reprodutivo.

O aspecto mais relevante da localização de actividade da ALP em *F. brigantina* foi

a forte marcação dos *coils*, apoiando a hipótese de que, nas AM com morfologia de tipo *near-Paris* ou *Paris*, os *coils* possam tornar os arbúsculos desnecessários como locais de transferência de P.

Neste trabalho, não se observou relação significativa entre a actividade da ALP e a concentração de P nos tecidos da planta, nem entre a actividade da ALP e a biomassa aérea da planta. Como consequência, os resultados não apoiam a hipótese segundo a qual as taxas de colonização obtidas por marcação histoquímica de actividade da ALP podem constituir uma medida da fracção funcional da colonização envolvida na transferência de P para a planta. Pelo contrário, os resultados mostram que a actividade da ALP, tal como revelada por marcação histoquímica, não é adequada como marcador funcional da simbiose AM em termos da nutrição fosfatada, e muito menos em termos de crescimento das plantas, pelo menos em estudos de campo.

Os resultados obtidos nesta tese contribuíram para aprofundar o conhecimento relativo ao funcionamento da simbiose AM em condições naturais e ao seu significado para a ecologia de *F. brigantina*. No entanto, dada a complexidade destes estudos, o esclarecimento do funcionamento da simbiose em *F. brigantina* e do seu verdadeiro significado ecológico só será possível com abordagens mais detalhadas.

Este trabalho deverá constituir a base para investigação futura, na procura da obtenção de respostas a algumas das questões aqui levantadas.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. MICORRIZAS	1
1.2. MICORRIZAS ARBUSCULARES	1
1.2.1. COLONIZAÇÃO	2
1.2.2. FISILOGIA	4
1.3. ÁREAS SERPENTÍNICAS	5
1.4. ÁREAS SERPENTÍNICAS DO NORDESTE DE PORTUGAL	5
1.5. AS MICORRIZAS COMO ESTRATÉGIA DE ADAPTAÇÃO AO HABITAT SERPENTÍNICO	7
1.6. OBJECTIVOS E ESTRUTURA DA TESE	9
1.7. BIBLIOGRAFIA	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS	17
2.1. TRABALHO DE CAMPO	17
2.1.1. LOCAL DE ESTUDO	17
2.1.2. COLHEITA DAS AMOSTRAS	18
2.2. TRABALHO DE LABORATÓRIO	19
2.2.1. DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA	19
2.2.2. COLONIZAÇÃO AM	20
2.2.2.1. CLAREAMENTO E COLORAÇÃO	20
2.2.2.2. LOCALIZAÇÃO DE ACTIVIDADE FOSFATÁSICA ALCALINA <i>IN PLANTA</i> NOS AMF	21
2.2.2.3. QUANTIFICAÇÃO DA COLONIZAÇÃO AM E DETERMINAÇÃO DO COMPRIMENTO RADICULAR	22
2.2.3. QUANTIFICAÇÃO DE P E NI NO MATERIAL VEGETAL	22
2.2.3.1. P TOTAL	22
2.2.3.2. NI TOTAL	23
2.2.4. SOLO RIZOSFÉRICO	23
2.2.4.1. P DISPONÍVEL	23
2.2.4.2. NI DE TROCA	23
2.3. BIBLIOGRAFIA	24

3. COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA, FENOLOGIA, NUTRIÇÃO FOSFATADA E CONCENTRAÇÕES DE NI EM <i>F. BRIGANTINA</i> : FUNCIONAMENTO E SIGNIFICADO ECOLÓGICO DA SIMBIOSE	25
3.1. INTRODUÇÃO	25
3.2. TRATAMENTO DOS DADOS	26
3.3. RESULTADOS	26
3.4. DISCUSSÃO	33
3.5. BIBLIOGRAFIA	34
4. A ACTIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA COMO MARCADOR DA EFICIÊNCIA DAS AM.	35
4.1. INTRODUÇÃO	35
4.2. TRATAMENTO DOS DADOS	36
4.3. RESULTADOS	37
4.4. DISCUSSÃO	42
4.5. BIBLIOGRAFIA	43
5. DISCUSSÃO GERAL	47
5.1. EFEITOS NUTRICIONAIS DA SIMBIOSE	47
5.2. EFEITOS NÃO NUTRICIONAIS DA SIMBIOSE	49
5.3. CONSIDERAÇÕES GERAIS	50
5.4. BIBLIOGRAFIA	51
6. CONCLUSÕES	55

O CAP. 3 foca a relação entre a colonização e a fenologia de *F. brigantina*, a nutrição fosfatada da planta e a tolerância ao Ni. No CAP. 4 estuda-se a utilização, no caso em estudo, de um possível marcador fisiológico da eficiência da simbiose AM.

A discussão geral dos resultados, à luz dos conhecimentos actuais acerca da fisiologia e ecologia das AM é feita no CAP. 5 e as principais conclusões do trabalho são apresentadas no CAP. 6.

10

1.5. BIBLIOGRAFIA

- Bago, B., Azcón-Aguilar, C., Goulet, A. & Piché, Y. 1998. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* **139**: 375-388
- Bonfante-Fasolo, P. 1984. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In *VA Mycorrhizae*. C.L. Powell & D.K. Bagyaraj (eds). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 5-13.
- Bonfante, P. & Perotto, S. 1995. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.* **130**: 3-21.
- Borowicz, V.A. 1997. A fungal root symbiont modifies plant resistance to an insect herbivore. *Oecologia* **112**: 534-542.
- Brooks, R.R. 1987. *Serpentine and its vegetation: A multidisciplinary approach*. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Bryla, D.R. & Duniway, J. 1997. Effects of mycorrhizal infection on drought tolerance and recovery in safflower and wheat. *Plant Soil* **197**: 95-103.
- Chiarucci, A., Maccherini, S., Bonini, I. & De Dominicis, V. 1999. Effects of nutrient addition on community productivity and structure of serpentine vegetation. *Plant Biol.* **1**: 121-126.
- Colpaert, J.V. & Van Tichelen, K.K. 1996. Mycorrhizas and environmental stress. In *Fungi and environmental change*. J.C. Frankland, N. Magan & G.M. Gadd (eds). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 109-128.
- Cooper, K.M. & Tinker, P.B. 1978. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. II. Uptake and translocation of phosphorus, zinc and sulphur. *New Phytol.* **81**: 43-52.
- Daft, M.J. & Nicolson, T.H. 1974. Arbuscular mycorrhizas in plants colonizing wastes in Scotland. *New Phytol.* **107**: 163-172.
- Dehn, B. & Schüepp, H. 1989. Influence of VA mycorrhizae on the uptake and distribution of heavy metals in plants. *Agric. Ecosyst. Environ.* **29**: 79-83.
- Dixon, N.E., Gazzola, C., Blakeley, R.L., Zerner, B. 1975. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *J. Am. Chem. Soc.* **97**: 4131-4133.
- Douds, D.D., Johnson, C.R. & Koch, K.E. 1988. Carbon cost of the fungal symbiont relative to the net leaf P accumulation in a split-root VA mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.* **86**: 491-496.
- Dueck, T.A., Visser, P., Ernst, W.H.O. & Schat, H. 1986. Vesicular-arbuscular mycorrhizae decrease zinc-toxicity to grasses growing in zinc-polluted soil. *Soil Biol. Biochem.* **18**: 331-333.
- Dunne, M.J. & Fitter, A.H. 1989. The phosphorus budget of a field-grown strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Hapil) crop: evidence for a mycorrhizal contribution. *Ann. Appl. Biol.* **114**: 185-193.

- Eissenstat, D.M., Graham, J.H., Syvertsen, J.P. & Drouillard, D.L. 1993. Carbon economy of sour orange in relation to mycorrhizal colonization and phosphorus status. *Ann. Bot.* **71**: 1-10.
- El-Kherbawy, M., Angle, J.S., Heggo, A. & Chaney, R.L. 1989. Soil pH, rhizobia, and vesicular-arbuscular mycorrhizae inoculation effects on growth and heavy metal uptake of alfafa (*Medicago sativa* L.). *Biol. Fertil. Soils* **8**: 61-65.
- Faber, B.A., Zasoski, R.J., Burau, R.G. & Uriu, K. 1990. Zinc uptake by corn as affected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Plant Soil* **129**: 121-130.
- Forster, B.A. & Baker, D.E. 1997. Characterisation of the serpentine soils of central Queensland, Australia. *ORSTOM Nouméa, Doc. Sci. Tech.* **III 6**: 27-37.
- Francis, R. & Read, D.J. 1984. Direct transfer of carbon between plants connected by vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium. *Nature* **307**: 53-56.
- Freitas, H. & Mooney, H. 1996. Effects of water stress and soil texture on the performance of two genotypes of *Bromus hordeaceus* from sandstone and serpentine soils. *Acta Oecologica* **17**: 307-317.
- Friese, C.F. & Allen, M.F. 1991. The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia* **83**: 409-418.
- Gadd, G.M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* **124**: 25-60.
- Gallaud, I. 1905. Études sur les mycorrhizes endotrophes. *Rev. Gén. de Botanique* **XVII**: 5-48, 66-85, 123-136, 223-239, 313-325, 423-433, 479-500.
- Galli, U., Schüepp, H. & Brunold, C. 1994. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant.* **92**: 364-368.
- Gambi, O.V. 1992. The distribution and ecology of the vegetation of ultramafic soils in Italy. In *The ecology of areas with serpentinized rocks. A world view*. B.A. Roberts & J. Proctor (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 217-247.
- Gange, A.C. & West, H.M. 1994. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and foliar-feeding insects in *Plantago lanceolata* L. *New Phytol.* **128**: 79-87.
- Gianinazzi-Pearson, V., Dumas-Gaudot, E., Gollote, A., Tahiri-Alaoui, A. & Gianinazzi, S. 1996. Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* **133**: 45-57.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gollote, A., Lherminier, J., Tisserant, B., Franken, P., Dumas-Gaudot, E., Lemoine, M.-C., van Tuinen, D. & Gianinazzi, S. 1995. Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. *Can. J. Bot.* **73** (Suppl. 1): 526-532.
- Gianinazzi-Pearson, V. 1996. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of symbiosis. *Plant Cell* **8**: 1871-1883.
- Gildon, A. & Tinker, P.B. 1983. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and heavy metals in plants. I. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* **95**: 247-261.
- Giovannetti, M., Avio, L., Sbrana, C. & Citernesi, A.S. 1993a. Factors affecting apressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. and Trappe. *New Phytol.* **123**: 115-122.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Citernesi, A.S. & Logi, C. 1993b. Differential hyphal

- morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytol.* **125**: 587-593.
- Gonçalves, S.C., Gonçalves, M.T., Freitas, H. & Martins-Loução, M.A. 1997. Mycorrhizae in a Portuguese serpentine community. *ORSTOM Nouméa, Doc. Sci. Tech.* **III 6**: 87-89.
- Guo, Y., George, E. & Marschner, H. 1996. Contribution of an arbuscular mycorrhizal fungus to the uptake of cadmium and nickel in bean and maize plants. *Plant Soil* **184**: 195-205.
- Harris, K.K. & Paul, E.A. 1987. Carbon requirements of vesicular-arbuscular mycorrhizae. In *Ecophysiology of VA mycorrhizae*. G.R. Safir (ed). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 93-105.
- Haselwandter, K., Leyval, C. & Sanders, F.E. 1994. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi upon plant uptake of heavy metals and radionuclides from soil. In *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. S. Gianinazzi & H. Schüepp (eds). Birkhäuser, Basel. pp. 179-190.
- Heggo, A., Angle, J.S. & Chaney, R.L. 1990. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil Biol. Biochem.* **22**: 865-869.
- Hopkins, N.A. 1987. Mycorrhizae in a California serpentine grassland community. *Can. J. Bot.* **65**: 484-487.
- Jaffré, T., Reeves, R.D. & Becquer, T. (eds). 1997. The ecology of ultramafic and metaliferous areas. *ORSTOM Nouméa, Doc. Sci. Tech.* **III 6**.
- Jakobsen, I. & Rosendahl, L. 1990. Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytol.* **115**: 77-83.
- Jakobsen, I. & Rosendahl, L. 1991. Effects of phosphorus inflow in pea plants. *New Phytol.* **104**: 573-581.
- Johansen, A., Jakobsen, I. & Jensen, E.S. 1992. Hyphal transport of ^{15}N -labelled nitrogen by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and its effect on depletion of inorganic soil N. *New Phytol.* **122**: 281-288.
- Joner, E.J. & Jakobsen, I. 1994. Contribution of two arbuscular fungi to uptake by cucumber (*Cucumis sativus* L.) from ^{32}P -labelled organic matter during mineralisation of soil. *Plant Soil* **163**: 203-209.
- Joner, E.J. & Leyval, C. 1997. Uptake of ^{109}Cd by roots and hyphae of a *Glomus mosseae*/*Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. *New Phytol.* **135**: 353-360.
- Jones, M.D. & Hutchinson, T.C. 1988. Nickel toxicity in mycorrhizal birch seedlings infected with *Lactarius rufus* or *Sclerotinia flavidum*. Effects on growth, photosynthesis, respiration and transpiration. *New Phytol.* **108**: 451-459.
- Killham, K. & Firestone, M.K. 1983. Vesicular arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acid and heavy metal deposition. *Plant Soil* **72**: 39-48.
- Koch, R. & Johnson, C.R. 1984. Photosynthate partitioning in split-root citrus seedlings with mycorrhizal and non-mycorrhizal root systems. *Plant Physiol.* **75**: 26-30.
- Koide, R.T. 1991. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytol.* **117**: 365-386.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M. & Smith, J.A.C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* **379**: 635-638.
- Leake, J.R. 1994. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytol.* **127**: 171-216.
- Lei, J., Bécard, G., Catford, J.G. & Piché, Y. 1991. Root factors stimulate ^{32}P uptake and

- plasmalemma ATPase activity in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol.* **118**: 289-294.
- Leyval, C., Turnau, K. & Haselwandter, K. 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: Physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* **7**: 139-153.
- Li, X.-L., George, E. & Marschner, H. 1991a. Phosphorus depletion and pH decrease at the root-soil and hyphae-soil interfaces of VA mycorrhizal white clover fertilized with ammonium. *New Phytol.* **119**: 307-404.
- Li, X.-L., Marschner, H. & George, E. 1991b. Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root-to-shoot transport in white clover. *Plant Soil* **136**: 49-57.
- Lioi, L. & Giovannetti, M. 1989. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and species of the *Endogonaceae* in an Italian serpentine soil. *Giorn. Bot. Ital.* **123**: 1-8.
- Marschner, H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Second edition. Academic Press, London.
- Meisch, H.U., Beckmann, I. & Schmitt, J.A. 1983. A new cadmium-binding phosphoglycoprotein, cadmium-mycophosphatin, from the mushroom *Agaricus macrosporus*. *Biochem. Biophys. Acta* **745**: 259-266.
- Menezes de Sequeira, E. & Pinto da Silva, A.R. 1992. The ecology of serpentinized areas of north-east Portugal. In *The ecology of areas with serpentinized rocks. A world view*. B.A. Roberts & J. Proctor (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 169-197.
- Menezes de Sequeira, E. 1969. Toxicity and movement of heavy metals in serpentinic soils (North-east Portugal). *Agronomia Lusit.* **30**: 115-154.
- Morton, J.B. & Benny, G.L. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*): A new order, *Glomales*, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporinae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon* **37**: 471-491.
- Nabais, C. 1994. *Dendroanálise de Quercus ilex L. em áreas serpentinicas do nordeste de Portugal*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Nagy, L. & Proctor, J. 1997. Soil Mg and Ni as causal factors of plant occurrence and distribution at the Meikle Klirannoch ultramafic site in Scotland. *New Phytol.* **135**: 561-566.
- Newman, E.I., Devoy, C.L.N., Easen, N.J. & Fowles, K.J. 1994. Plant species can be linked by VA mycorrhizal fungi. *New Phytol.* **126**: 691-693.
- Newman, E.I. & Redell, P. 1987. The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytol.* **106**: 745-751.
- Newsham, K.K., Fitter, A.H. & Merryweather, J. 1995. Multifunctionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *TREE* **10**: 407-411.
- Nielsen, J.D. & Jensen, A. 1983. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on growth and uptake of various nutrients as well as uptake ratio of fertilizer P for lucerne (*Medicago sativa*). *Plant Soil* **70**: 165-172.
- Noyd, R.K., Pflieger, F.L. & Norland, M.R. 1996. Field responses to added organic matter, arbuscular mycorrhizal fungi, and fertilizer in reclamation of taconite iron ore tailing. *Plant Soil* **179**: 89-97.
- Pinto da Silva, A.R. 1970. A flora e a vegetação das áreas ultrabásicas do nordeste transmontano. Subsídios para o seu estudo. *Agronomia Lusit.* **30**: 175-364.

- Pirozynski, K.A. 1981. Interactions between fungi and plants through the ages. *Can. J. Bot.* **59**: 1824-1827.
- Proctor, J. 1999. Toxins, nutrient shortages and droughts: the serpentine challenge. *TREE* **14**: 334-335.
- Proctor, J. & Woodell, S.R.J. 1975. The ecology of serpentine soils. *Adv. Ecol. Res.* **9**: 256-347.
- Read, D.J. 1991. Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* **47**: 376-391.
- Reedy, G.N. & Prasad, M.N.V. 1990. Heavy metal-binding proteins/peptides: Occurrence, structure, synthesis and functions. A review. *Environ. Exp. Bot.* **30**: 251-264.
- Reeves, R.D., Baker, A.J.M., Borhidi, A. & Berazaín, R. 1999. Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Cuba. *Ann. Bot.* **83**: 29-38.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H. & Kerp, H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 11841-11843.
- Roberts, B.A. & Proctor, J. (eds). *The ecology of areas with serpentinized rocks. A world view*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Roberts, B.A. & Proctor, J. Introduction. In *The ecology of areas with serpentinized rocks. A world view*. B.A. Roberts & J. Proctor (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 1-5.
- Ruiz-Lozano, J.M., Azcón, R. & Palma, J.M. 1996. Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress. *New Phytol.* **134**: 327-333.
- Shetty, K.G., Hetrick, B.A.D., Figge, D.A.H. & Schwab, A.P. 1994. Effects of mycorrhizae and other soil microbes on revegetation of heavy metal contaminated mine spoil. *Environ. Pollut.* **86**: 181-188.
- Shetty, K.G., Hetrick, B.A.D. & Schwab, A.P. 1995. Effects of mycorrhizae and fertilizer amendments on zinc tolerance of plants. *Environ. Pollut.* **88**: 307-314.
- Simard, S.W., Perry, D.A., Jones, M.J., Myrold, D.D., Durall, D.D. & Molina, R. 1997. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* **388**: 579-582.
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R.C. & Lalonde, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363**: 67-69.
- Smith, F.A. & Smith, S.E. 1997. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* **137**: 373-388.
- Smith, S.E. & Gianinazzi-Pearson, V. 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular arbuscular mycorrhizal plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **39**: 221-224.
- Smith, S.E. & Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Second edition. Academic Press, London.
- Smith, S.E. & Smith, F.A. 1990. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbiosis as they relate to nutrient transport. *New Phytol.* **114**: 1-38.
- Taylor, T.N., Remy, W., Hass, H. & Kerp, H. 1995. Fossil arbuscular mycorrhizae from the early Devonian. *Mycologia* **87**: 560-573.
- Tester, M., Smith, S.E. & Smith, F.A. 1987. The phenomenon of 'nonmycorrhizal' plants. *Can. J. Bot.* **65**: 419-431.
- Tobar, R., Azcón, R. & Barea, J.M. 1994. Improved nitrogen uptake and transport from ¹⁵N-labelled nitrate by external

hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. *New Phytol.* **126**: 119-122.

Trappe, J.M. 1987. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. G.R. Safir (ed). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 5-25.

Turnau, K., Kottke, I. & Oberwinkler, F. 1993. Element localization in mycorrhizal roots of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn collected from experimental plots treated with cadmium dust. *New Phytol.* **123**: 313-324.

Walker, C. 1995. AM or VAM: What's in a word? In *Mycorrhiza: Structure, function, molecular biology and biotechnology*. A. Varma & B. Hock (eds). Springer-Verlag, Berlin. pp. 25-28.

Walker, C. & Trappe, J.M. 1993. Names and epithets in the *Glomales* and *Endogonales*. *Mycol. Res.* **97**: 339-344.

Weissenhorn, I., Glashoff, A., Leyval, C. & Berthelin, J. 1994. Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. *Plant Soil* **167**: 189-196.

Weissenhorn, I., Leyval, C. & Berthelin, J. 1993. Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted soil. *Plant Soil* **157**: 247-256.

2.3. BIBLIOGRAFIA

- Ezawa, T., Saito, M. & Yoshida, T. 1995. Comparison of phosphatase localization in the intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus* spp. and *Gigaspora* spp. *Plant Soil* **176**: 57-63.
- Giovannetti, M. & Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular infection in roots. *New Phytol.* **84**: 489-500.
- 24 Koske, R.E. & Gemma, J.N. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* **92**: 486-488.
- Menezes de Sequeira, E. & Pinto da Silva, A.R. 1992. Ecology of serpentinized areas of north-east Portugal. In *The ecology of areas with serpentinized rocks. A world view*. B.A. Roberts & J. Proctor (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 169-197.
- Murphy, J. & Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* **27**: 31-36.
- Newman, E.I. 1966. A method of estimating the total length of root in a sample. *J. Appl. Ecol.* **3**: 139-145.
- Olsen, S.R. & Sommers, L.E. 1982. Phosphorus. In *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Second edition. A.L. Page, R.H. Miller & D.R. Keeney (eds). Soil Society of America, Inc. Publisher. Madison, Wisconsin. pp. 403-430.
- Perkin-Elmer (ed). 1994. *Analytical methods for atomic absorption spectroscopy*. The Perkin-Elmer Corporation, U.S.A.
- Phillips, J.M. & Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **55**: 158-161.
- Pinto da Silva, A.R. 1970. A flora e a vegetação das áreas ultrabásicas do nordeste transmontano. Subsídios para o seu estudo. *Agronomia Lusit.* **30**: 175-364.
- Saito, M. 1995. Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall. *New Phytol.* **129**: 425-431.
- Tennant, D. 1975. A test of a modified line intersect method of estimating root length. *J. Ecology* **63**: 995-1001.
- Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. & Gollotte, A. 1993. *In planta* histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycol. Res.* **97**: 245-250.

3.5. BIBLIOGRAFIA

- Brundrett, M. & Kendrick, B. 1990. The roots and mycorrhizas of herbaceous woodland plants. I. Quantitative aspects of morphology. *New Phytol.* **114**: 457-468.
- Dunne, M.J. & Fitter, A.H. 1989. The phosphorus budget of a field-grown strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Hapil) crop: evidence for a mycorrhizal contribution. *Ann. Appl. Biol.* **114**: 185-193.
- Fitter, A.H. 1986. Effect of benomyl on leaf phosphorus concentration in alpine grasslands: a test of mycorrhizal benefit. *New Phytol.* **103**: 767-776.
- Fitter, A.H. 1989. The role and ecological significance of vesicular-arbuscular mycorrhizas in temperate ecosystems. *Agric. Ecosyst. Environ.* **29**: 137-151.
- Fitter, A.H. 1991. Costs and benefits of mycorrhizas: implications for functioning under natural conditions. *Experientia* **47**: 350-355.
- Galli, U., Schüepp, H. and Brunold, C. 1994. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant.* **92**: 364-368.
- Giovannetti, M. 1985. Seasonal variations of vesicular-arbuscular mycorrhizas and Endogonaceous spores in a maritime sand dune. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **84**: 679-684.
- Jakobsen, I. & Rosendahl, L. 1990. Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytol.* **115**: 77-83.
- Koide, R.T. & Elliott, G. 1989. Costs, benefit and efficiency of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Funct. Ecol.* **3**: 252-255.
- Koide, R.T. 1991. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytol.* **117**: 365-386.
- Marschner, H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Second edition. Academic Press, London.
- McGonigle, T.P. & Fitter, A.H. 1988. Growth and phosphorus inflows of *Trifolium repens* L. with a range of indigenous vesicular-arbuscular mycorrhizal infection levels under field conditions. *New Phytol.* **108**, 59-65.
- Menezes de Sequeira, E. & Pinto da Silva, A.R. 1992. The ecology of serpentinized areas of north-east Portugal. In *The ecology of areas with serpentinized rocks. A world view*. B.A. Roberts & J. Proctor (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 169-197.
- Merryweather, J. & Fitter, A.H. 1995a. Phosphorus and carbon budgets: mycorrhiza contribution in the obligately mycorrhizal *Hyacinthoides non-scripta* (L.) Chouard ex Rothm. under natural conditions. *New Phytol.* **129**: 619-627.
- Merryweather, J. & Fitter, A.H. 1995b. Arbuscular mycorrhiza and phosphorus as controlling factors in the life history of the obligately mycorrhizal *Hyacinthoides non-scripta* (L.) Chouard ex Rothm. *New Phytol.* **129**: 629-636.
- Merryweather, J. & Fitter, A.H. 1996. Phosphorus nutrition of an obligately mycorrhizal plant treated with the fungicide benomyl in the field. *New Phytol.* **132**: 307-311.
- Mullen, R.B. & Schmidt, S.K. 1993. Mycorrhizal infection, phosphorus uptake and phenology in *Ranunculus adoneus*: implications for the functioning of mycorrhizae in alpine systems. *Oecologia* **94**: 229-234.
- Nabais, C. 1994. *Dendroanálise de Quercus ilex L. em áreas serpentinicas do nordeste de Portugal*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra, Coimbra.

- Newsham, K.K., Fitter, A.H. & Merryweather, J. 1995. Multifunctionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *TREE* 10: 407-411.
- Newsham, K.K., Fitter, A.H. & Watkinson, A.R. 1994. Root pathogenic and arbuscular mycorrhizal fungi determine fecundity of asymptomatic plants in the field. *J. Ecol.* 82: 805-814.
- Sanders, I.R. & Fitter, A.H. 1992. The ecology and functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas in co-existing grassland species. II. Nutrient uptake and growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal plants in a semi-natural grassland. *New Phytol.* 120: 525-533.
- Smith, F.A. & Smith, S.E. 1981a. Mycorrhizal infection and growth of *T. subterraneum*: comparison of natural and artificial inocula. *New Phytol.* 88: 311-325.
- Smith, F.A. & Smith, S.E. 1981b. Mycorrhizal infection and growth of *T. subterraneum*: use of sterilized soil as a control treatment. *New Phytol.* 88: 299-309.
- Smith, F.A. & Smith, S.E. 1997. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 137: 373-388.
- Smith, S.E. & Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Second edition. Academic Press, London.
- Weissenhorn, I., Glashoff, A., Leyval, C. & Berthelin, J. 1994. Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. *Plant Soil* 167: 189-196.

sentou actividade da ALP (inferior a 15,5%), nos meses de Maio e Julho (Fig. 4.3.), representaria um custo extra, uma vez que só uma pequena parte da colonização corresponderia a biomassa fúngica activa na transferência de P para a planta. Porém, se se tomar a actividade da ALP apenas como medida do metabolismo fúngico, estes valores podem, na realidade, traduzir benefício para a planta, uma vez que a diminuição da proporção da colonização que apresenta actividade da ALP significaria redução do metabolismo fúngico, traduzindo-se em menor consumo de carbono (ver Johnson *et al.*, 1997). Estes resultados parecem, por isso, sugerir coordenação temporal entre as actividades fúngica e vegetal.

Neste trabalho, não se observou relação significativa entre a actividade da ALP e a concentração de P nos tecidos da planta (Figs. 4.5.e 4.6.), nem entre a actividade da ALP e a biomassa aérea da planta (Fig. 4.7.). Como consequência, os resultados não apoiam a sugestão de que as taxas de colonização obtidas por marcação histoquímica de actividade da ALP possam constituir uma medida da fracção funcional da colonização envolvida na transferência de P para a planta (Tisserant *et al.*, 1993; Guillemin *et al.*, 1995).

Os resultados deste estudo mostram que a actividade da ALP, tal como revelada por marcação histoquímica, não é adequada como marcador funcional da simbiose AM em termos da nutrição fosfatada das plantas, e muito menos em termos de crescimento das plantas, pelo menos em estudos de campo.

4.5. BIBLIOGRAFIA

- Ashford, A.E., Ryde, S. & Barrow, K.D. 1994. Demonstration of a short chain polyphosphate in *Pisolithus tinctorius* and the implications for phosphorus transport. *New Phytol.* **126**: 239-247.
- Beever, R.E. & Burns, D.J.W. 1980. Phosphorus uptake, storage and utilisation by fungi. *Adv. Bot. Res.* **8**: 128-219.
- Brundrett, M.C., Piché, Y. & Peterson, R.L. 1984. A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Can. J. Bot.* **63**: 184-194.
- Callow, J.A., Cappacio, L.C.M., Parish, G. & Tinker, P.B. 1978. Detection and estimation of polyphosphate in vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* **80**: 125-134.
- Cappacio, L.C.M. & Callow, J.A. 1982. The enzymes of polyphosphate metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* **91**: 81-91.
- Cox, G., Moran, K.J., Sanders, F., Nockolds, C. & Tinker, P.B. 1980. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. III. Polyphosphate granules and phosphorus translocation. *New Phytol.* **84**: 649-659.
- Ezawa, T., Saito, M. & Yoshida, T. 1995. Comparison of phosphatase localization in the intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus* spp. and *Gigaspora* spp. *Plant Soil* **176**: 57-63.
- Gianinazzi-Pearson, V. & Gianinazzi, S. 1976. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. I. Effect of mycorrhiza formation and phosphorus nutrition on soluble phosphatase activities in onion roots. *Physiol. Vég.* **14**: 833-841.
- Gianinazzi-Pearson, V. & Gianinazzi, S. 1978. Enzymatic studies on the metabolism of

- vesicular arbuscular mycorrhiza. II. Soluble alkaline phosphatase specific to mycorrhizal infection in onion roots. *Physiol. Plant Pathol.* **12**: 45-53.
- Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V. & Dexheimer, J. 1979. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhiza. III. Ultrastructural localization of acid and alkaline phosphatase in onion roots infected by *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.). *New Phytol.* **82**: 127-132.
- Guillemain, J.P., Orozco, M.O., Gianinazzi-Pearson, V. & Gianinazzi, S. 1995. Influence of phosphate fertilization on fungal alkaline phosphatase and succinate dehydrogenase activities in arbuscular mycorrhiza of soybean and pineapple. *Agric. Ecosyst. Environ.* **53**: 63-69.
- Hepper, C.M., Azcón-Aguilar, C., Rosendahl, S. & Sen, R. 1988. Competition between three species of *Glomus* used as spatially separated introduced and indigenous mycorrhizal inocula for leek (*Allium porrum* L.). *New Phytol.* **106**: 707-715.
- Hepper, C.M., Sen, R. & Maskall, C.S. 1986. Identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in roots of leek (*Allium porrum* L.) and maize (*Zea mays* L.) on the basis of enzyme mobility during polyacrylamide gel electrophoresis. *New Phytol.* **102**: 529-539.
- Jakobsen, I., Abbott, L.K. & Robson, A.D. 1992a. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. I. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytol.* **120**: 371-380.
- Jakobsen, I., Abbott, L.K. & Robson, A.D. 1992b. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. II. Hyphal transport of ^{32}P over defined distances. *New Phytol.* **120**: 509-516.
- Johnson, N.C., Graham, J.H. & Smith, F.A. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol.* **135**: 575-585.
- Koske, R.E. & Gemma, J.N. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* **92**: 486-488.
- Lei, J., Bécard, G., Catford, J.G. & Piché, Y. 1991. Root factors stimulate ^{32}P uptake and plasmalemma ATPase activity in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol.* **118**: 289-294.
- McGee, P.A. & Smith, A.E. 1990. Activity of succinate dehydrogenase in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after enzymic digestion from roots of *Allium porrum*. *Mycol. Res.* **94**: 305-308.
- McGonigle, T.P. & Fitter, A.H. 1988. Growth and phosphorus inflows of *Trifolium repens* L. with a range of indigenous vesicular-arbuscular mycorrhizal infection levels under field conditions. *New Phytol.* **108**: 59-65.
- Merryweather, J. & Fitter, A.H. 1991. A modified method for elucidating the structure of the fungal partner in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Mycol. Res.* **95**: 1435-1437.
- Phillips, J.M. & Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **55**: 158-161.
- Saito, M., Stribley, D.P. & Hepper, C.M. 1993. Succinate dehydrogenase activity of external and internal hyphae of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerdemann and Trappe, during mycorrhizal colonization of roots of leek (*Allium porrum* L.) as revealed by *in situ* histochemical staining. *Mycorrhiza* **4**: 59-62.
- Sanders, I.R. & Fitter, A.H. 1992. The ecology and functioning of vesicular-arbuscular

mycorrhizas in co-existing grassland species II. Nutrient uptake and growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal plants in a semi-natural grassland. *New Phytol.* **120**: 525-533.

Smith, F.A. & Smith, S.E. 1997. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* **137**: 373-388.

Smith, S.E. & Gianinazzi-Pearson, V. 1990. Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L.: effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Aust. J. Plant Physiol.* **17**: 177-188.

Smith, S.E. & Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Second edition. Academic Press, London.

Smith, S.E. & Smith, F.A. 1990. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbiosis as they relate to nutrient transport. *New Phytol.* **114**: 1-38.

Smith, S.E., St John, B.J., Smith, F.A. & Nicholas, D.J.D. 1985. Activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Trifolium subterraneum* L. and *Allium cepa* L.: effects of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. *New Phytol.* **99**: 211-227.

Thingstrup, I. & Rosendahl, S. 1994. Quantification of fungal activity in arbuscular mycorrhizal symbiosis by polyacrylamide gel electrophoresis and densitometry of malate dehydrogenase. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 1483-1489.

Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. & Gollotte, A. 1993. *In planta* histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycol. Res.* **97**: 245-250.

fungos. Na natureza, *F. brigantina* encontra-se, seguramente, colonizada por diversas espécies de AMF (Merryweather & Fitter, 1998a). Tal deverá constituir uma simbiose multifuncional, com determinadas espécies mais eficientes no transporte de P e outras com funções predominantemente não nutricionais (Fitter *et al.*, 1996). As populações de AMF nas raízes deverão variar ao longo do tempo, assumindo as distintas espécies fúngicas diferente importância relativa ao longo do ciclo de vida da planta (Merryweather & Fitter, 1998b). Para além disso, o estabelecimento das AM e do micélio extra-radicular do solo deverá proporcionar a *F. brigantina* interações com outros exemplares da mesma espécie e/ou espécies diferentes (Newman *et al.*, 1994). Estas interações originam fenómenos de competição e mutualismo difíceis de avaliar (e.g. Marler *et al.*, 1999) e contribuem para a determinação da estrutura, diversidade e dinâmica sucessional da comunidade vegetal (Grime *et al.*, 1987; Francis & Read, 1994, 1995; Hartnett & Wilson, 1999).

Por tudo isto, o esclarecimento do funcionamento da simbiose AM em *F. brigantina* e do seu significado ecológico só será possível com abordagens mais detalhadas. Espera-se que a abordagem geral deste estudo possa constituir ponto de partida para a investigação de aspectos particulares e obtenção de respostas a algumas das questões levantadas.

5.4. BIBLIOGRAFIA

- Azcón-Aguilar, C. & Barea, J.M. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens — an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457-464.
- Bonfante, P. & Perotto, S. 1995. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.* 130: 3-21.
- Cui, M. & Caldwell, M.M. 1996a. Facilitation of plant phosphate acquisition by arbuscular mycorrhizas from enriched soil patches. I. Roots and hyphae exploiting the same soil volume. *New Phytol.* 133: 453-460.
- Cui, M. & Caldwell, M.M. 1996b. Facilitation of plant phosphate acquisition by arbuscular mycorrhizas from enriched soil patches. II. Hyphae exploiting root-free soil. *New Phytol.* 133: 461-467.
- Dunne, M.J. & Fitter, A.H. 1989. The phosphorus budget of a field-grown strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Hapil) crop: evidence for a mycorrhizal contribution. *Ann. Appl. Biol.* 114: 185-193.
- Fitter, A.H. 1986. Effect of benomyl on leaf phosphorus concentration in alpine grasslands: a test of mycorrhizal benefit. *New Phytol.* 103: 767-776.
- Fitter, A.H. 1991. Costs and benefits of mycorrhizas: implications for functioning under natural conditions. *Experientia* 47: 350-355.
- Fitter, A.H., Newsham, K.K. & Merryweather, J.W. 1996. Diversity and function of arbuscular mycorrhizas in natural ecosystems. In *Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development*. J.M. Barea & C. Azcón-Aguilar (eds). ECSC-EC-EAEC, Brussels. pp. 58-62.
- Francis, R. & Read, D.J. 1994. The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. *Plant Soil* 159: 11-25.

- Francis, R. & Read, D.J. 1995. Mutualism and antagonism in the mycorrhizal symbiosis, with special reference to impacts on plant community structure. *Can. J. Bot.* **73** (Suppl. 1): 1301-1309.
- Gange, A.C. & Brown, V.K. 1992. Interactions between soil-dwelling insects and mycorrhizas during early plant succession. In *Mycorrhizas in ecosystems*. D.J. Read, D.H. Lewis, A.H. Fitter & I.J. Alexander (eds). CAB International, Wallingford. pp.177-182.
- Gange, A.C. & West, H.M. 1994. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and foliar-feeding insects in *Plantago lanceolata* L. *New Phytol.* **128**: 79-87.
- Gianinazzi-Pearson, V., Dumas-Gaudot, E., Gollote, A., Tahiri-Alaoui, A. & Gianinazzi, S. 1996. Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* **133**: 45-57.
- Gonçalves, S.C., Gonçalves, M.T., Freitas, H. & Martins-Loução, M.A. 1997. Mycorrhizae in a Portuguese serpentine community. *ORSTOM Nouméa, Doc. Sci. Tech.* **III 6**: 87-89.
- Graham, J.H., Eissenstat, D.M. & Drouillard, D.L. 1991. On the relationship between a plant's mycorrhizal dependency and rate of vesicular-arbuscular colonization. *Funct. Ecol.* **5**: 773-779.
- Grime, J.P., Mackey, J.M.L., Hillier, S.H. & Read, D.J. 1987. Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. *Nature* **328**: 420-422.
- Guillemin, J.P., Orozco, M.O., Gianinazzi-Pearson, V. & Gianinazzi, S. 1995. Influence of phosphate fertilization on fungal alkaline phosphatase and succinate dehydrogenase activities in arbuscular mycorrhiza of soybean and pineapple. *Agric. Ecosyst. Environ.* **53**: 63-69.
- Hartnett, D.C. & Wilson, G.W.T. 1999. Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tallgrass prairie. *Ecology* **80**: 1187-1195.
- Haselwandter, K., Leyval, C. & Sanders, F.E. 1994. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi upon plant uptake of heavy metals and radionuclides from soil. In *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. S. Gianinazzi & H. Schüepp (eds). Birkhäuser, Basel. pp. 179-190.
- Hopkins, N.A. 1987. Mycorrhizae in a California serpentine grassland community. *Can. J. Bot.* **65**: 484-487.
- Jakobsen, I., Abbott, L.K. & Robson, A.D. 1992. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. II. Hyphal transport of ³²P over defined distances. *New Phytol.* **120**: 509-516.
- Jones, M.D. & Hutchinson, T.C. 1988. Nickel toxicity in mycorrhizal birch seedlings infected with *Lactarius rufus* or *Scleroderma flavidum*. Effects on growth, photosynthesis, respiration and transpiration. *New Phytol.* **108**: 451-459.
- Koide, R., Li, M., Lewis, J. & Irby, C. 1988. Role of mycorrhizal infection in the growth and reproduction of wild vs. cultivated plants. I. Wild vs. cultivated oats. *Oecologia* **77**: 573-543.
- Koide, R.T. & Lu, X. 1991. *Avena fatua* L. seed and seedling nutrient dynamics as influence by mycorrhizal infection of the maternal generation. *Plant Cell. Env.* **14**: 931-939.
- Koide, R.T. 1991. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytol.* **117**: 365-386.

- Kunst, L. & Roomans, G.M. 1985. Intracellular localization of heavy metals in yeast by X-ray microanalysis. *Scan. Electr. Microsc.* **1**: 191-199.
- Larsen, J., Thingstrup, I., Jakobsen, I. & Rosendahl, S. 1995. Benomyl inhibits phosphorus transport but not fungal alkaline phosphatase activity in a *Glomus*-cucumber symbiosis. *New Phytol.* **132**: 127-133.
- Lewis, J.D. & Koide, R.T. 1990. Phosphorus supply, mycorrhizal infection and plant offspring vigor. *Funct. Ecol.* **4**: 695-702.
- Lioi, L. & Giovannetti, M. 1989. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and species of the *Endogonaceae* in an Italian serpentine soil. *Giorn. Bot. Ital.* **123**: 1-8.
- Marler, M.J., Zabinski, C.A. & Callaway, R.M. 1999. Mycorrhizae indirectly enhance competitive effects of an invasive forb on a native bunchgrass. *Ecology* **80**: 1180-1186.
- Marschner, H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. Second edition. Academic Press, London.
- McGonigle, T.P. 1988. A numerical analysis of published field trials with vesicular-arbuscular fungi. *Funct. Ecol.* **2**: 773-778.
- Menezes de Sequeira, E. & Pinto da Silva, A.R. 1992. The ecology of serpentinized areas of north-east Portugal. In *The ecology of areas with serpentinized rocks. A world view*. B.A. Roberts & J. Proctor (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 169-197.
- Merryweather, J. & Fitter, A. 1998a. The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta*. I. Diversity of fungal taxa. *New Phytol.* **138**: 117-129.
- Merryweather, J. & Fitter, A. 1998b. The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta*. II. Seasonal and spatial patterns of fungal populations. *New Phytol.* **138**: 131-142.
- Newman, E.I., Devoy, C.L.N., Easen, N.J. & Fowles, K.J. 1994. Plant species can be linked by VA mycorrhizal fungi. *New Phytol.* **126**: 691-693.
- Newsham, K.K., Fitter, A.H. & Merryweather, J. 1995. Multifunctionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. *TREE* **10**: 407-411.
- Newsham, K.K., Fitter, A.H. & Watkinson, A.R. 1994. Root pathogenic and arbuscular mycorrhizal fungi determine fecundity of asymptomatic plants in the field. *J. Ecol.* **82**: 805-814.
- Proctor, J. 1999. Toxins, nutrient shortage and droughts: the serpentine challenge. *TREE* **14**: 334-335.
- Read, D.J. 1986. Non-nutritional effects of mycorrhizal infection. In *Mycorrhizae: physiology and genetics*. V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi (eds). INRA, Paris. pp. 169-176.
- Read, D.J. 1991. Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* **47**: 376-391.
- Ruiz-Lozano, J.M., Azcón, R. & Palma, J.M. 1996. Superoxide dismutase activity in arbuscular mycorrhizal *Lactuca sativa* plants subjected to drought stress. *New Phytol.* **134**: 327-333.
- Smith, F.A. & Smith, S.E. 1996. Mutualism and parasitism: biodiversity in function and structure in the 'arbuscular' (VA) mycorrhizal symbiosis. *Adv. Bot. Res.* **22**: 1-43.
- Smith, F.A. & Smith, S.E. 1997. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* **137**: 373-388.
- Smith, S.E. & Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Second edition. Academic Press, London.
- Tisdall, J.M. 1994. Possible role of soil microorganisms in aggregation of soils. *Plant Soil* **159**: 115-121.

Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. & Golotte, A. 1993. *In planta* histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycol. Res.* **97**: 245-250.