

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM TRÊS ESTÁDIOS DE ESTABILIZAÇÃO DE DUNAS⁽¹⁾

A. S. CÓRDOBA⁽²⁾, M. M. MENDONÇA⁽³⁾ & E. F. ARAÚJO⁽⁴⁾

RESUMO

A diversidade genética de fungos micorrízicos arbusculares, recuperados de três estádios de estabilização de dunas, foi avaliada por técnicas moleculares e comparada com resultados obtidos anteriormente por técnicas baseadas na caracterização morfológica dos esporos. O uso da técnica de PCR-RFLP do rDNA, extraído de esporos, permitiu definir impressões características de espécies presentes nas dunas, evidenciar a presença de diferentes comunidades em cada estádio e identificar a anteduna como aquela com comunidades com maior polimorfismo. Esse estádio também apresentou maior diversidade, quando, no estudo das comunidades, foram utilizadas técnicas baseadas em aspectos morfológicos. A combinação de ambas as estratégias, molecular e baseada em aspectos morfológicos, forneceu importantes informações sobre a diversidade destes fungos, visando ao estudo do seu papel no ecossistema.

Termos de indexação: diversidade genética, fungos micorrízicos arbusculares, técnicas moleculares, dunas.

⁽¹⁾ Trabalho extraído da Tese de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Financiada pelo CNPq. Recebido para publicação em setembro de 2001 e aprovado em junho de 2002.

⁽²⁾ Mestre em Biotecnologia, Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL. Av. José Acácio Moreira 787, CEP 88704-900 Tubarão (SC). E-mail: analia_cordoba@terra.com.br

⁽³⁾ Professor Titular do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Campus Trindade. CEP 88040-900 Florianópolis (SC). E-mail: margarid@floripa.com.br

⁽⁴⁾ Professor Titular do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa – UFV. CEP 36571-000 Viçosa (MG). E-mail: ezfa@ufv.br

SUMMARY: *EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY IN ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN THREE STAGES OF DUNE STABILIZATION*

The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi, recovered from three dune stabilization stages, was evaluated using molecular techniques and compared to results previously obtained by techniques based on morphological spore characterization. The use of the PCR-RFLP technique of spore-extracted rDNA defined the characteristic fingerprint of fungal species in the dunes, identified the presence of different communities at each stage, and detected communities with the highest polymorphism in the intermediate dune. This stage also presented the highest community diversity when morphology-based techniques were used. The combination of both, molecular and morphologically based strategies, provided important information on the diversity of these fungi, thus contributing to the understanding of their role in the ecosystem.

Index terms: genetic diversity, arbuscular mycorrhizal fungi, molecular techniques, dunes.

INTRODUÇÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) estabelecem simbiose com cerca de 80 % das espécies de plantas terrestres (Smith & Read, 1997). Esses fungos beneficiam as plantas, de forma direta, melhorando a sua nutrição e, indiretamente, promovendo a sua tolerância a condições restritivas de origem biótica e, ou, abiótica. Em ecossistemas naturais, influenciam o estabelecimento de plantas pioneiras e o rumo da sucessão vegetal, sendo a diversidade desses fungos um fator primordial na manutenção da diversidade vegetal e no funcionamento do ecossistema (van der Heijden et al., 1998). Embora todas as espécies de FMA se integrem no mesmo grupo funcional, as suas comunidades variam na estrutura, número e composição de espécies.

As dunas são um ecossistema restritivo para a maioria dos seres vivos. Nesse sistema, os FMAs assumem papel fundamental na estabilização do substrato, porque as plantas colonizadas por esses fungos têm maior capacidade de retenção das partículas de areia pelo emaranhado de hifas do micélio extra-radicular, ocorrendo, assim, uma modificação da estrutura do substrato. Os agregados formados são também mais resistentes à ação dos ventos, proporcionando maior estabilidade às dunas (Koske et al., 1975; Sutton & Sheppard, 1976). Os programas de estabilização de dunas, empreendidos em diferentes partes do mundo, na maioria dos casos, dependem de estratégias de revegetação, porém, freqüentemente, não atendem à importância dos FMAs neste ecossistema (Koske & Polson, 1984).

Em Santa Catarina, a crescente ocupação pelo homem de áreas junto às dunas móveis resultará, em curto prazo, em necessidade de implementação de estratégias de estabilização. Antecipadamente a

este processo, a diversidade dos FMAs vem sendo avaliada de acordo com as famílias e espécies (Sturmer & Bellei, 1994; Córdoba, 1998; Córdoba et al., 2001). Como os FMAs são simbioses obrigatórios, a avaliação da diversidade envolve procedimentos complexos. Um aspecto complicador reside no fato de que os fungos proliferam tanto no solo como no córtex radicular; portanto, dispõem de uma fase extra-radicial e de uma fase intra-radicial. A fase extra-radicial inclui hifas e esporos que são os componentes mais freqüentemente utilizados nas avaliações. A contagem e a identificação de esporos recuperados do solo constituem a medida mais usada para quantificar a diversidade.

A taxonomia dos FMAs baseia-se na morfologia dos esporos. No entanto, a identificação precisa dos esporos coletados em campo é problemática, uma vez que, geralmente, encontram-se deteriorados por hiperparasitas ou, então, em fases de desenvolvimento inadequadas para a identificação das estruturas diferenciadoras (Morton et al., 1995). Nesta situação, as técnicas moleculares apresentam grande potencial para estudos da diversidade dos FMAs em comunidades naturais. Uma grande vantagem da análise de DNA, em comparação à análise das características morfológicas, consiste na possibilidade de seleção de regiões específicas do DNA e do uso de técnicas específicas, estratégias que possibilitam o aumento da resolução taxonômica, permitindo identificar diferentes taxa, superiores à espécie, população ou indivíduo (Kohn, 1992).

O DNA ribossômico que codifica para a subunidade 5.8 S e as duas regiões espaçadoras transcritas ITS, que o flanqueiam, têm sido utilizados para estudar as relações filogenéticas entre os fungos. Os *primers* universais ITS1 e ITS4 são os mais comumente utilizados na amplificação

desta região (White et al., 1990). As regiões ITS dispõem de características interessantes para a identificação dos fungos em nível molecular. Uma delas é que, nos fungos, esta região, que compreende entre 600 e 800 pares de bases, é amplificada, utilizando os *primers* universais, os quais são complementares às seqüências altamente conservadas dos genes que codificam o rRNA. Outra característica importante deve-se à natureza repetitiva do rDNA, que torna esta região fácil de amplificar a partir de amostras pequenas, diluídas e altamente degradadas (Gardes & Bruns, 1993).

Em estudos com FMA, Simon et al. (1992) demonstraram que, se a seqüência gênica desta região diferia entre espécies ou isolados, então poderiam ser utilizadas em propostas de identificação e em estudos de diversidade genética. Os FMAs não são susceptíveis de cultivo em meios laboratoriais, sendo, portanto, difícil a obtenção de quantidades de DNA suficientes para proceder à análise de RFLP. Assim, Sanders et al. (1996) indicaram que as técnicas de identificação ou de avaliação da diversidade genética, nestes fungos, deveriam ser previamente sujeitas à reação da polimerase em cadeia (PCR) (Mullis & Fallona, 1987).

A aplicação de técnicas moleculares ao estudo de fungos micorrízicos teve um grande impacto após o desenvolvimento da técnica de PCR, que consiste na amplificação *in vitro* do número de cópias de regiões do DNA situadas entre seqüências terminais reconhecidas por oligonucleotídeos específicos, sendo necessárias quantidades mínimas de DNA. A técnica do PCR-RFLP do rDNA consiste na amplificação da região do rDNA seguida da restrição dos fragmentos amplificados com enzimas de restrição e sua análise eletroforética.

Este trabalho objetivou avaliar a diversidade genética das populações de FMAs, em três diferentes estádios de estabilização de dunas, utilizando técnicas moleculares, PCR-RFLP do rDNA, em comparação às estratégias convencionais baseadas na caracterização morfológica utilizadas por Córdoba et al. (2001).

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo

O estudo foi realizado no mês de fevereiro de 1997, na praia da Joaquina, situada na Ilha de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil (27° 50'S e 48° 34'W). A região litorânea da Ilha de Santa Catarina, assim como todo o litoral catarinense, é coberta por um solo aluvial composto de areia, geralmente profundo e móvel, e, em alguns pontos, coberto por lodo (Reitz, 1961; Bresolin, 1979). O clima é subtropical

com temperaturas médias de aproximadamente 20 °C. As chuvas estão distribuídas uniformemente durante o ano. Os ventos predominantes são dos quadrantes NE e N, com vento sul, geralmente, determinando mudanças de temperatura.

Na coleta das amostras de solo, foram escolhidos três lotes em dunas, com aproximadamente 700 m², com estádios crescentes de estabilização. Os estádios, denominados duna embrionária, anteduna e duna fixa, conforme descrição de Moreno-Casasola & Espejel (1986), encontravam-se em uma única direção no sentido da costa para o interior da ilha. O primeiro lote, na duna embrionária (27°37'54,3" S e 48°27'07,7" W), foi considerado o ponto de referência zero. A anteduna (27°37'52,6" S e 48°27'07,5" W) e a duna fixa (27°37'45,0" S e 48°27'29,6" W) encontravam-se, respectivamente, a uma distância de 40 e 650 m, aproximadamente, do ponto de referência. As medições das coordenadas e das distâncias entre as três dunas foram efetuadas com o auxílio de um equipamento GPS (*Global Position System*), modelo *Plus Garmin*, que avalia distâncias com um erro variável entre 30 e 120 m. Nas dunas da Joaquina, por se tratar de uma área livre, portanto, susceptível de capturar o sinal de vários satélites, o erro de medição foi inferior a 30 m.

As características físicas e as comunidades vegetais nos três estádios foram descritas por Reitz (1961) e Bresolin (1979). A duna embrionária, constituída por estreita área de areia, encontrava-se sujeita aos efeitos diretos e periódicos da maré. O substrato era ondulado com diversas elevações irregulares com freqüente movimentação dos grãos de areia. As plantas e o substrato eram constantemente influenciados por aerossol proveniente do mar. As comunidades vegetais eram dominadas por vegetação pioneira, caracterizada por plantas halofílicas, rizomatosas e estoloníferas perenes.

Na anteduna, o efeito do aerossol era reduzido, atingindo a temperatura na superfície do substrato freqüentemente 60 °C. O substrato neste estádio dispunha de níveis baixos de matéria orgânica, estando as plantas sujeitas a períodos de seca freqüentes. As comunidades vegetais incluíam espécies com rizomas, assim como espécies com sistema radicular profundo adaptado à captura de água no lençol freático. A espécie vegetal dominante neste estádio era a gramínea *Spartina ciliata* Brongn.

Na duna fixa, o solo apresentava maior compactação, níveis mais elevados de matéria orgânica e argila do que a duna embrionária e a anteduna. O substrato era estável, não estando sujeito à movimentação pelo vento, com manchas de vegetação mais densa, incluindo arbustos e até árvores de pequenas dimensões.

De acordo com Córdoba et al. (2001), foram recuperados, nos três estádios de estabilização, representantes de todas as famílias de FMA. A

abundância relativa das diferentes famílias modificou-se à medida que aumentou a estabilização. Na duna embrionária, as espécies da família Gigasporaceae representaram 78 % do total das espécies identificadas, não sendo observada a recuperação de membros da família Glomaceae. Já na anteduna, foram observados membros das três famílias, sendo Acaulosporaceae dominante com 54 % do total dos esporos recuperados. Na duna fixa, a família das Glomaceae predominou com 83 % do total de esporos recuperados. Esporos de quatro gêneros de Glomales foram recuperados nos três estádios (Quadro 1). *Glomus* incluiu cinco espécies presentes, sobretudo na duna fixa, seguido de *Scutellospora* e *Acaulospora* (com três espécies cada, Quadro 1). *Gigaspora* foi representada por *G. albida*, e *Entrophospora* não foi encontrado.

Obtenção de esporos e extração de DNA

Na obtenção de esporos e na subsequente extração de DNA, foram utilizadas amostras de 100 g de substrato, provenientes da anteduna e duna fixa, e de 500 g da duna embrionária. Esta diferença deveu-se à necessidade de se aproximar o número de esporos entre as amostras (aproximadamente 100). Para atingir este objetivo, os esporos foram recuperados pela técnica de peneiragem e decantamento úmido e centrifugados, posteriormente, em gradiente de sacarose, de acordo com Geder mann & Nicolson (1963). Sob microscópio estereoscópio (Nikon, modelo CELM), com aumento de 40 vezes, os esporos foram coletados com o auxílio de uma pipeta Pasteur e colocados em papel de filtro umedecido dentro de placas de Petri.

A extração de DNA dos esporos de FMA foi feita, segundo o protocolo de extração de Zézé et al. (1994), com modificações no que se refere à velocidade e à temperatura de centrifugação. Os esporos coletados foram lavados em 1 mL de solução-tampão A (Tris HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 3 mM; MgCl₂ 50 mM; NaCl 50 mM; b-mercapto etanol 10 mM) e centrifugados a 12.000 g, por 20 segundos. O sedimento resultante foi ressuscitado em 200 µL da mesma solução-tampão A.

Dentro de um tubo Eppendorf de 1,5 mL, os esporos foram quebrados com um micropistilo e centrifugados a 12.000 g, durante 20 segundos. O sobrenadante e o sedimento foram separados, e o último ressuscitado em 200 µL de solução-tampão B (Tris HCl 50 mM; EDTA 25 mM; SDS 2 %; N-Lauryl-sarcocinato 1 %; proteinase K 1 mg mL⁻¹; b-mercapto etanol 10 mM; Rnase 10 µg mL⁻¹). Ambos, sedimento e sobrenadante, foram incubados a 65 °C, por 30 min. Após a incubação, foram centrifugados, durante 5 min, a 12.000 g. Os sedimentos resultantes foram ressuscitados em 200 µL de solução tampão B e a eles acrescentado 0,4 volume de acetato de potássio 5 M.

Após este último procedimento, os quatro tubos Eppendorf foram incubados no gelo, durante 15 min, e logo depois centrifugados a 12.000 g, por 15 min. As proteínas foram desnaturadas e removidas, extraído, subsequentemente, os sobrenadantes com 200 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoanílico (IAA), 24:24:1 (v/v/v), cada vez. Aos sobrenadantes resultantes foram acrescentados 1/10 volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol frio e,

Quadro 1. Espécies e famílias de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) associados às plantas recuperadas dos três estádios de estabilização das dunas

Família e espécie de FMA	Duna embrionária	Anteduna	Duna fixa
Acaulosporaceae			
<i>Acaulospora appendicula</i> Schenck, Spain & Sieverding		x ⁽¹⁾	x
<i>Acaulospora gerdemannii</i> Schenck & Nicolson	x		
<i>Acaulospora</i> sp. ⁽²⁾	x	x	x
<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe		x	
Gigasporaceae			
<i>Gigaspora albida</i> Schenck & Smith	x	x	x
<i>Scutellospora coralloidea</i> Walker & Sanders	x	x	
<i>Scutellospora pellucida</i> Nicolson & Schenck	x	x	x
<i>Scutellospora weresubiae</i> Koske & Walker	x		
Glomaceae			
<i>Glomus aggregatum</i> Schenck & Smith			x
<i>Glomus constrictum</i> Trappe		x	x
<i>Glomus occultum</i> Walker & Koske			x
<i>Glomus</i> sp.1 ⁽²⁾			x
<i>Glomus</i> sp.2 ⁽²⁾			x

Fonte: Córdoba et al. (2001).

⁽¹⁾ Presença da espécie. ⁽²⁾ Espécie não identificada.

então, armazenados no freezer a -20 °C, pelo menos, por duas horas. Após este tempo, foram centrifugados a 12.000 g por 10 min. Os sobrenadantes foram descartados e o sedimento foi seco numa estufa a vácuo. Uma vez seco, o sedimento foi ressuspensionado em 20 µL de solução-tampão TE (Tris HCL, 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0).

Considerando as dificuldades na amplificação do DNA nas reações de PCR, foi necessário proceder à purificação do DNA dos esporos de FMA. Para tal, foi utilizado o kit de purificação de DNA "Glass MAX" da GIBCO BRL.

Amplificação e análise do DNA por RFLP

A região do DNA, que foi amplificada, corresponde à região espaçadora ITS do DNA ribossômico. Os pares de *primers*, ITS1 e ITS4, foram utilizados na amplificação desta região, descritos por White et al. (1990) e sintetizados pela GIBCO BRL/Life Technologies, Inc.

Para as reações de amplificação, foi preparada uma mistura de reagentes suficientes para seis reações de PCR de acordo com White et al. (1990) e Goosen (1993). Esta mistura incluiu 30 µL (= 300 pmol) do *primer* ITS1, 30 µL (= 300 pmol) do *primer* ITS4, 63 µL dNTP 0,1 mM, *mix* (que continha 0,1 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 63 µL de MgCl₂ (concentração final de 15 mM), 380 µL água Milli Q, 2 µL de *Taq* DNA polimerase (10 unidades).

Desta mistura, foram transferidos 90 µL para cada tubo, seguindo-se a adição de 25 ng de DNA de cada uma das amostras. Os tubos foram colocados num termociclador *Programamable Thermal Controller-100* (MJ Research Inc.) programado para 27 ciclos, sendo constituído cada de três etapas: uma etapa de desnaturação de 30 segundos a 95 °C, uma etapa de pareamento de 30 segundos a 52 °C e uma de alongamento a 72 °C, por 1,5 min. No primeiro ciclo, a etapa de desnaturação a 95 °C foi realizada por três minutos. Após o último ciclo, uma etapa de sete min a 72 °C promoveu a elongação final e a temperatura foi, então, reduzida para 4 °C e mantida até à retirada das amostras. Posteriormente, as amostras de DNA foram analisadas em gel de agarose 1,5 %.

A precipitação do DNA foi efetuada com 50 µL do reagente de PCR ao qual foram acrescentados 100 mM de cloreto de sódio e 2,5 volumes de etanol gelado (125 µL). A amostra foi conservada a -20 °C, por 48 h; após esse tempo, foi centrifugada a 12.000 g durante 30 min. O sobrenadante resultante foi descartado, e o sedimento foi seco em estufa e ressuspensionado em 10 µL de água. Destes 10 µL, 3 µL foram utilizados para testar o DNA no gel de agarose 1,5 % e aos 7 µL restantes foi adicionado 1 µL de tampão de clivagem, cinco unidades da enzima de restrição e 1 µL de água. Os fragmentos de DNA foram, então, analisados em gel de agarose 2,0 %. O

tamanho dos fragmentos foi comparado com o marcador de tamanho pUC 18, clivado pelas enzimas de restrição *Rsa* I e *Hinf* I.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade de DNA total foi estimada pela comparação com um padrão de DNA de quantidade conhecida. O DNA íntegro, não degradado, mostrado na figura 1, corresponde às populações de esporos de FMA da duna fixa, anteduna e duna embrionária. O DNA amplificado, correspondente à região ITS do rDNA das populações de FMA, nos três estádios de estabilização das dunas, é apresentado na figura 2. Estes resultados mostraram polimorfismo de tamanho da região ITS e, conseqüentemente, diferenças entre as populações de FMA em cada duna. Na duna fixa, foram observadas duas bandas, uma de aproximadamente 676 pb e outra em torno de 517 pb. Na anteduna, também foi observada a banda de aproximadamente 676 pb e, ainda, uma segunda banda, de aproximadamente 500 pb. Na duna embrionária, as duas bandas que foram observadas são semelhantes às da anteduna.

No caso das espécies utilizadas como padrões, a *Gigaspora albida*, espécie comum nas três dunas (Quadro 1), mostrou uma única banda de, aproximadamente, 500 pb (Figura 2). Estes valores estão de acordo com aqueles observados por Redecker

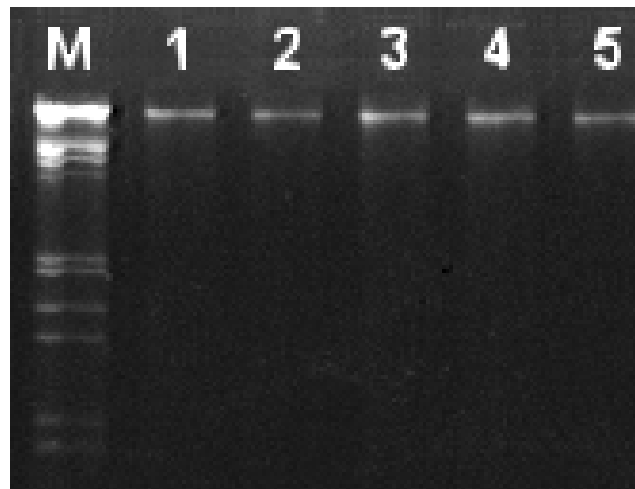


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % do DNA total. M marcador de tamanho: DNA fago lambda clivado com *Hind* III/*Eco* RI. 1-DNA total extraído de esporos de duna fixa. 2-DNA total extraído de esporos de anteduna 3-DNA total extraído de esporos de embrionária 4-DNA total extraído de esporos *Gigaspora albida* 5-DNA total extraído de esporos de *Acaulospora scrobiculata*.

et al. (1997), para a mesma espécie. *Acaulospora scrobiculata*, espécie de FMA predominante na duna embrionária (Sturmer & Bellei, 1994), apresentou uma banda de, aproximadamente, 600 pb (Figura 2).

Os fragmentos de DNA de restrição, gerados pela endonuclease *Hinf* I, na clivagem da região ITS do rDNA das populações de esporos, nas diferentes dunas, encontram-se na figura 3. Estes fragmentos evidenciaram um perfil de banda característico para as populações de cada duna. Nas amostras da duna embrionária e da anteduna, observaram-se perfis de bandas semelhantes. Na amostra da duna embrionária, observaram-se aproximadamente cinco fragmentos de restrição de DNA de diferentes tamanhos; já na anteduna, observaram-se, aproximadamente, sete. O maior fragmento de restrição observado nestas dunas foi de, aproximadamente, 517 pb. As populações de FMA na duna fixa exibiram o menor número de fragmentos de restrição de DNA, três fragmentos, atingindo o maior deles cerca de 241 pb.

Redecker et al. (1997) determinaram padrões de restrição para várias espécies de FMA, utilizando três enzimas diferentes, *Mbo* I - *Hinf* I e *Taq* I. Foram obtidos padrões de bandas praticamente idênticos com as três enzimas para todas as espécies de *Gigaspora* selecionadas (*G. albida*, *G. rosea* e *G. candida*). No mesmo trabalho, observou-se uma estreita relação filogenética entre as espécies de *Gigaspora* e *Scutellospora* ao serem analisados os

fragmentos de DNA de restrição, gerados por cada uma das enzimas utilizadas. Nestes padrões de restrição, não foi observada, após o uso das três enzimas, uma diferenciação clara entre os fragmentos de DNA, gerada nas espécies de *Gigaspora* e *Scutellospora* analisadas. A única espécie que mostrou um padrão de bandas diferente, quando tratada com *Hinf* I, foi *Scutellospora pellucida*, espécie presente nos três estádios (Quadro 1).

Estes resultados evidenciam que as divergências dentro da seqüência ITS nas espécies de *Glomus* foram maiores do que nas Gigasporaceae. No entanto, este fato não foi observado na duna fixa, onde se constatou o menor polimorfismo, embora a composição da comunidade de FMA se caracterize pela predominância de *Glomus*. No entanto, é importante ressaltar que Redecker et al. (1997) fizeram estas observações com espécies de *Glomus* diferentes daquelas encontradas na duna fixa.

De acordo com a técnica de PCR-RFLP do rDNA o maior polimorfismo foi detectado nas comunidades de FMA na anteduna, sendo que as avaliações por métodos convencionais, contagem direta de esporos em campo e recuperação por culturas armadilhas, detectaram a maior diversidade na duna embrionária (Córdoba, 1998; Córdoba et al., 2001). O caráter intermediário na composição das comunidades de FMA e da vegetação, da posição da duna no ecossistema e de suas características edáficas, assim como a

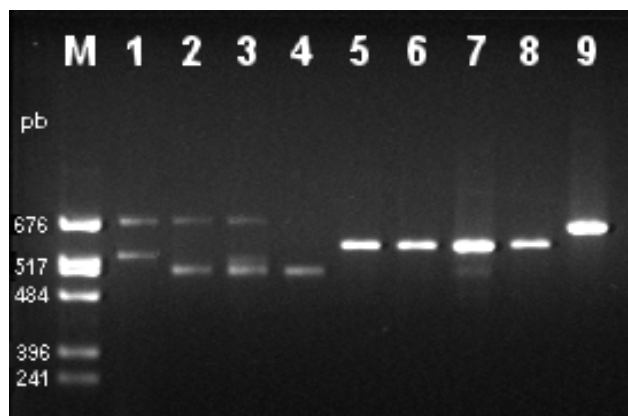


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1.5 % de DNA, obtido a partir de esporos de FMA, amplificado por PCR. As bandas foram amplificadas utilizando-se os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4, respectivamente. M- marcador de DNA plasmidial pUC18 clivado com *Rsa* e *Hinf* I. 1- esporos de duna fixa; 2-esporos de anteduna ; 3- esporos de duna embrionária; 4- esporos de *Gigaspora albida*; 5- esporos de *Acaulospora scrobiculata*; esporos recuperados em segunda época de coleta (maio de 1997) na: 6- duna fixa; 7- anteduna; 8- duna embrionária; 9- micélio de *Pisolithus tinctorius* (testemunha).

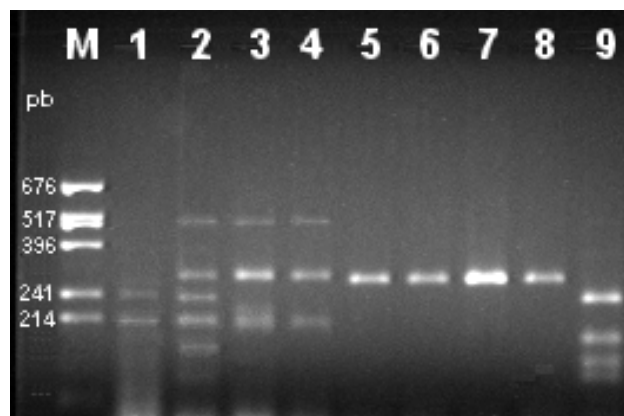


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 2 % da região ITS do rDNA obtido a partir de esporos de populações de FMA nos três estádios de estabilização de dunas. A clivagem foi realizada com a enzima de restrição *Hinf* I. M- marcador pUC 18/ *RSA-Hinf* I. 1-esporos de duna fixa; 2- esporos de anteduna; 3- esporos de duna embrionária; 4- esporos de *Gigaspora albida*; 5- esporos de *Acaulospora scrobiculata*; esporos recuperados em segunda época de coleta (Maio de 1997) na: 6-duna fixa; 7- anteduna; 8- duna embrionária; 9- micélio de *Pisolithus tinctorius*.

intensidade dos fatores restritivos, bióticos e abióticos, podem ser responsáveis pela maior diversidade genética para a manutenção das espécies dos FMAs neste estágio de estabilização da duna.

CONCLUSÃO

1. A utilização combinada de estratégias moleculares (técnica de PCR-RFLP do rDNA) e convencionais (morfológicas) forneceu informações importantes na avaliação da diversidade, na análise e comparação das comunidades de FMA, nos três estágios de estabilização, obtendo-se, assim, subsídios para o estudo do seu papel no ecossistema.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, entidade financiadora, pela concessão da bolsa de mestrado para AS Córdoba, Programa de Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina. Ao CNPq, pelo financiamento do projeto de pesquisa.

LITERATURA CITADA

- BRESOLIN, A. Flora da restinga da Ilha de Santa Catarina. *Insula*, 10:1-54, 1979.
- CORDOBA, A.S. Avaliação da diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em três estágios de estabilização de dunas. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 1998. 93p. (Tese de Mestrado)
- CORDOBA, AS.; MENDONÇA, M.M.; STURMER, S.L. & RYGIEWICZ, P.T. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi along a sand dune stabilization gradient: A case study at Praia da Joaquina, Ilha de Santa Catarina, South Brazil. *Mycoscience*, 42:379-387, 2001.
- GARDES, M. & BRUNS T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – Application to the identification of mycorrhizae and rust. *Mol. Ecol.*, 2:113-118, 1993.
- GEDERMAN, J.W. & NICOLSON, T.H. Spore of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 80:552-557, 1963.
- GOOSEN, T. DNA cloning. In: Molecular biology of arbuscular mycorrhizas. International workshop – Institute Nationale de la Recherche Agronomique. Dijon-France, Center Nationale de la Recherche Cientifique. 1993. p.40-46.
- KOHN, L.M. Developing new characters for fungal systematics: an experimental approach for determining the rank of resolution. *Mycologia*, 84:139-153, 1992.
- KOSKE, R.E. & POLSON, W.R. Are VA mycorrhizae required for sand dune stabilization? *BioScience*, 34:420-424, 1984.
- KOSKE, R.E.; SUTTON, J.C. & SHEPPARD, B.R. Ecology of *Endogone* in lake Huron sand dunes. *Can. J. Bot.*, 53:87-93, 1975.
- MORENO-CASASOLA, P. & ESPEJEL, I. Classification and ordination of coastal sand dune vegetation along the Gulf and Caribbean Sea of Mexico. *Vegetatio*, 66:147-182, 1986.
- MORTON, B.J.; BENTIVENGA, S.P. & BEVER, J.D. Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes). *Can. J. Bot.*, 73:S25-S32, 1995.
- MULLIS, K.B. & FALLONA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymol.*, 155:335-350, 1987.
- REITZ, P.R. Vegetação da zona marítima de Santa Catarina. *Sellowia*, 13:17-115, 1961.
- REDECKER, D.; THIERFELDER, H.; WALKER, C. & WERNER, D. Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacer of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order Glomales. *App. Environ. Microbiol.*, 63:1756-1761, 1997.
- SANDERS, I.R.; CLAPP, J.P. & WIEMKEN, A. The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystem. A key to understanding the ecology and function of the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 133:123-134, 1996.
- SIMON, L.; LALONDE, M. & BRUNS, T.D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots by fluorescent single-strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction. *App. Environ. Microbiol.*, 58:291-295, 1992.
- SMITH, S.E. & D.J. READ Mycorrhizal symbioses. Second edition. London, Academic Press, 1997, 605p.
- STÜRMER, S.L. & BELLEI, M.M. Composition and seasonal variation of spore populations of arbuscular mycorrhizal fungi in dune soils on the Island of Santa Catarina, Brazil. *Can. J. Bot.*, 72:359-363, 1994.
- SUTTON, J.C. & SHEPPARD, B.R. Aggregation of sand dune soil by endomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.*, 54:326-333, 1976.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; KLIRONOMOS, J.N.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEKEN, A. & SANDERS, I.R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396:69-72, 1998.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In: INNIS, M.A.; GELFALD, D.H.; SNINSKY, J.J. & WHITE, T.J., eds. PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego, Academic Press, 1990, p.315-322.
- ZÉZÉ, A.; DULIEU, H. & GIANINAZZI- PEARSON, V. DNA cloning and screening of a partial genomic library from arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora castanea*. *Mycorrhizae*, 4:251-254, 1994.

