

ANALÍA SUSANA CÓRDOBA

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES
EM TRÊS ESTÁGIOS DE ESTABILIZAÇÃO DE DUNAS

FLORIANÓPOLIS

1998

ANALÍA SUSANA CÓRDOBA

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES
EM TRÊS ESTÁGIOS DE ESTABILIZAÇÃO DE DUNAS

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre.

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Prof. Dr. Margarida Matos de
Mendonça.

FLORIANÓPOLIS

1998

**“AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES EM TRÊS ESTÁGIOS DA ESTABILIZAÇÃO
DE DUNAS”**

POR


ANALÍA SUSANA CÓRDOBA

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**

Comissão Examinadora:



Margarida Matos de Mendonça
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
em Biotecnologia da UFSC - Orientadora
(MIP/CCB/UFSC)



Elza Fernandes Araújo
(UFV – Membro Titular)



Ricardo Iglesias Rios
(UFRJ – Membro Titular)

Florianópolis, abril de 1998

Ao Etzel, ao Andres

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui minha gratidão à Professora Margarida Matos de Mendonça pela inteligente escolha desse trabalho e por sua eficaz assistência e orientação.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de realizar este curso.

À Universidade Federal de Viçosa, à Professora Elza Fernandes de Araújo e a Eliane Gomes pela assistência na realização de parte deste trabalho.

Ao Professor Ricardo Iglesias Rios pelas importantes sugestões dadas a esse trabalho.

À Mônica Meinert pela amizade e apoio durante todo o curso

Ao Doutor Raymond Pakovsky pelo tempo dedicado às interessantes e estimulantes discussões.

Agradeço ao Sidney Stürmer pela valiosa colaboração na taxonômia desse trabalho, ao José Renato Pereira Cavallazzi e ao Gilson Milde principalmente pelo apoio na parte experimental.

A meu esposo e meu filho pelo constante estímulo e dedicação a mim dispensados durante todo o curso

À CAPES, pelo suporte financeiro por mim recebido.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Biodiversidade: Conceito, Significado e Preservação	3
2.2 Avaliações e Medidas da Biodiversidade	9
2.3 A Biodiversidade Microbiana – O Caso Específico dos Fungos	12
2.4 Os Fungos Micorrízicos: Importância e Avaliações da Diversidade.....	17
2.4.1 Diversidade a Nível de Família e Espécie.....	17
2.4.2 Diversidade Genética	21
2.5 As Dunas Como Ecossistema Modelo Para Estudos de Biodiversidade	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Características do Local de Estudo	26
3.2 Avaliação da Diversidade a Nível de Espécies e de Famílias dos FMA Após Coleta de Esporos - Métodos Diretos.	28

	Página
3.2.1 Coleta, Identificação das Famílias e Espécies.....	28
3.2.2 Abundância e Riqueza	29
3.2.3 Modelos de Abundância	30
3.2.4 Índices	30
3.3 Avaliação da Diversidade Específica Por Métodos Indiretos	32
3.3.1 Riqueza Após Cultura Armadilha	32
3.3.2 Abundância Avaliada por meio de Bioensaio	33
3.4 Diversidade Genética	34
3.4.1 Extração de DNA	34
3.4.2 Preparação Gel de Eletroforese de DNA	35
3.4.3 Purificação do DNA	36
3.4.4 Metodologia Utilizada para a Avaliação do Polimorfismo do rDNA por PCR-FRLP	37
 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 39
4.1 Avaliação da Diversidade a Nível de Família e Espécies Após Coleta Direta de Esporos	39
4.1.1 Coleta, Identificação das Famílias e das Espécies	39
4.1.2 Abundância e Riqueza	41
4.1.3 Modelos de Abundância	44
4.1.4 Índices	48
4.2 Avaliação da Diversidade Específica por meio de Métodos Indiretos ...	49
4.2.1 Diversidade Após Culturas Armadilhas	49
4.2.2 Abundância Avaliada por meio de Bioensaio	54
4.3 Avaliação da Diversidade Genética	58
 5 CONCLUSÕES	 63
 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 65

ANEXO 1 - Fluxograma das Atividades Desenvolvidas	74
ANEXO 2 - Número de Esporos de FMA nos Três Estágios de Estabilização das Dunas	76
ANEXO 3 - Cálculo dos Índices	78
ANEXO 4 - Ajustes aos Modelos de Distribuição de Abundância	83
ANEXO 5 - Resumo dos Resultados Obtidos da Avaliação da Diversidade a Nível de Espécie Após Coleta Direta de Esporos	91

LISTA DE ABREVIATURAS

Al	- Alumínio
°C	- Temperatura em graus centígrados
Ca	- Cálcio
ClMg	- Cloreto de magnésio
CO ₂	- Dióxido de carbono
dATP	- Deoxiadenosina trifosfato
dCTP	- Deoxicitidina trifosfato
dGTP	- Deoxiguanosina trifosfato
dTTP	- Deoxitimidina trifosfato
dm ³	- decímetro cúbico
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
FMA	- Fungo micorrízico arbuscular
g	- grama
GPS	- Global Position System
HCl	- Ácido clorídrico
H ₂ O ₂	- Peróxido de oxigênio
IGS	- Seqüências espaçadoras não transcritas do rDNA
ITS	- Seqüências espaçadoras transcritas do rDNA
K	- Potássio
Kg	- Quilograma
KOH	- Hidróxido de potássio
L	- Litro
ln	- Logaritmo natural

log	- Logaritmo de base 10
m ²	- metro quadrado
Mg	- Magnésio
mg	- miligrama
m mol	- milimol
N	- Norte
Na	- Sódio
NaCl	- Cloreto de sódio
NH ₂ OH	- Hidróxido de amônia
P	- Fósforo
pb	- Par de base
PCR	- Reação da polimerase em cadeia
pH	- Potência do hidrogênio (símbolo do grau de acidez ou alcalinidade)
p/v	- Peso sobre volume
PVLG	- Álcool Polivinil-lacto-glicerol
rDNA	- DNA ribossômico
RFLP	- Polimorfismo de tamanho em fragmentos de restrição
RNA	- Ácido ribonucléico
rpm	- Rotações por minuto
rRNA	- RNA ribossômico
S	- Sul
SDS	- Sulfato dodecil de sódio
<i>Taq</i> DNA	
Polimerase	- DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	- Tris-borato 0,09 M e EDTA 0,002 M
TE	- Tris-HCL 10mM pH 8,0 e EDTA 1 mM
Tris	- Tris hidroximetil aminometano
UNEP	- United Nations Environment Programme
UV	- Ultravioleta
v/v	- Volume sobre volume
W	- Oeste

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Esquema do DNA ribossômico. Os retângulos representam as seqüências que codificam para as subunidades 18S, 25S, 5.8S e 5S do RNA ribossômico. As linhas na parte superior do esquema representam as seqüências intergênicas não transcritas IGS e, na parte inferior, as seqüências internas espaçadoras transcritas ITS. Os sítios de anelamento dos <i>primers</i> ITS1 e ITS4 são delineados com setas ao lado das seqüências codificadoras.	38
Figura 2	Abundância relativa das famílias de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) nos três estágios de estabilização das dunas.	43
Figura 3	Curva do Componente Dominância da Diversidade das espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) nos três estágios de estabilização das dunas.	47
Figura 4	Riqueza específica nos três estágios de estabilização, ante-duna, duna semi-fixa e duna fixa, calculada após utilização de métodos combinados 1 – Coleta direta, 2 – Coleta direta e primeiro ciclo de cultura armadilha, 3 - Coleta direta, primeiro ciclo de cultura armadilha e segundo ciclo de cultura armadilha.	53
Figura 5	Porcentagem de colonização radicular em milho aos 20, 30 e 40 dias após plantio.	54

- Figura 6 Eletroforese em gel de agarose 0.8% do DNA total. 1-DNA total extraído de esporos de duna fixa. 2-DNA total extraído de esporos de duna semi-fixa. 3-DNA total extraído de esporos de ante-duna. 4-DNA total extraído de esporos *Gigaspora albida*. 5-DNA total extraído de esporos de *Acaulospora scrobiculata*. M, marcador de tamanho: DNA fago lambda clivado com *Hind* III / *Eco* R I. 60
- Figura 7 Eletroforese em gel de agarose 1.5% de DNA amplificado. As bandas foram amplificadas utilizando-se os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4 respectivamente. M, marcador de DNA plasmidial pUC18 clivado com *Rsa*I e *Hinf* I. 1-esporos de duna fixa, 2-esporos de duna semi-fixa, 3-esporos de ante-duna, 4-*Gigaspora albida*, 5-*Acaulospora scrobiculata*. 6-duna fixa, 7-semi-fixa, 8-ante-duna, de esporos obtidos em outra época de coleta (Maio 97). 9-*Pisolithus tinctorius* (testemunha). 61
- Figura 8 Eletroforese em gel de agarose 2% da região ITS do rDNA de populações de fungos endomicorrízicos nos três estágios de estabilização de dunas. A clivagem foi realizada com a enzima de restrição *Hinf* I. M, corresponde ao marcador pUC 18/ *Rsa*I-*Hinf* I. 1-esporos de duna fixa, 2-esporos de duna semi-fixa, 3-esporos de ante-duna, 4-*Gigaspora albida*, 5- *Acaulospora scrobiculata*. Esporos de 6-duna fixa, 7-semi-fixa, 8-ante-duna em outra época de coleta. 9-*Pisolithus tinctorius*. 62
- Figura A1 Fluxograma apresentando os procedimentos realizados para a avaliação da diversidade específica e genética dos fungos micorrízicos arbusculares e os locais onde ocorreram os procedimentos (MIP - Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina, UFV – Universidade Federal de Viçosa). 75

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Características químicas e físicas de amostras de solo dos três lotes de coleta nas dunas.	27
Tabela 2	Famílias e espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), recuperados nos três estágios de estabilização das dunas.	40
Tabela 3	Abundância e riqueza das espécies em cada família de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), associados às plantas nos três estágios de estabilização das dunas.	42
Tabela 4	Abundância média e abundância relativa em ordem decrescente de ocorrência, das espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) nos três estágios de estabilização das dunas.	46
Tabela 5	Probabilidade de ajuste das Curvas do Componente Dominância da Diversidade obtidas para os três estágios de estabilização das dunas (Figura 3) aos modelos clássicos de distribuição da abundância.	47
Tabela 6	A diversidade dos três estágios de estabilização calculada através dos diversos índices de heterogeneidade .	48
Tabela 7	Famílias e espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), identificadas na ante-duna por meio da coleta direta de esporos e de dois ciclos de cultura armadilha.	50

		Página
Tabela 8	Famílias e espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), identificadas na duna semi-fixa através da coleta direta de esporos e de dois ciclos de cultura armadilha.	51
Tabela 9	Famílias e espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), identificadas na duna fixa através da coleta direta de esporos e de dois ciclos de cultura armadilha.	52
Tabela 10	Análise da variância por meio do teste Tukey para as médias de colonização radicular em cada estágio de estabilização, considerando os 20, 30 e 40 dias após plantio.	55
Tabela 11	Análise da variância através do teste Tukey para as médias de colonização radicular em cada estágio de estabilização.	56
Tabela A1	Número de esporos na subamostra, abundância média e frequência das espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) associadas às plantas nos três estágios de estabilização das dunas. Valores obtidos a partir de seis subamostras de cada lote de coleta.	77
Tabela A2	Valores necessários para os cálculos dos diversos índices de dominância, diversidade e equitatividade para a ante-duna.	79
Tabela A3	Valores necessários para os cálculos dos diversos índices de dominância, diversidade e equitatividade para a duna semi-fixa.	80
Tabela A4	Valores necessários para os cálculos dos diversos índices de dominância, diversidade e equitatividade para a duna fixa.	81

		Página
Tabela A5	Recálculo dos diversos índices de diversidade, dominância e equitatividade para a ante-duna	82
Tabela A6	Ajuste dos dados ao modelo de distribuição de abundância das espécies, série geométrica, para os três estágios de estabilização das dunas.	84
Tabela A7	Ajuste dos dados ao modelo de distribuição de abundância das espécies, série log, para os três estágios de estabilização das dunas.	87
Tabela A8	Ajuste dos dados ao modelo de distribuição de abundância das espécies, <i>broken stick</i> , para os três estágios de estabilização das dunas.	90
Tabela A9	(A) A diversidade nos três estágios de estabilização calculada através dos diversos índices de riqueza (I) e dos índices de heterogeneidade (II). (B) Adaptação das distribuições da abundância das espécies, encontradas nos três estágios de estabilização das dunas, a três dos modelos clássicos de distribuição de abundância das espécies, série geométrica, série log, <i>broken stick</i> .	92

RESUMO

A diversidade específica e genética dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foi avaliada em três estágios de estabilização (duna móvel, dunas semi-fixa e fixa) das dunas na praia da Joaquina, Ilha de Santa Catarina. Na avaliação da diversidade específica foram utilizados métodos diretos por meio da coleta de esporos, indiretos a partir de esporos multiplicados em sistemas de culturas armadilhas (dois ciclos), respectivamente, e uma combinação de ambos os métodos. O potencial de inoculo dos FMA nos três estágios de estabilização foi também avaliado por meio de bioensaios. Dez amostras de solo foram coletadas de cada tipo de duna, durante o verão 97 e processadas seis subamostras de 100 g de solo para a contagem e identificação de esporos em cada duna. A partir da abundância média das diferentes espécies foram calculados os índices de riqueza e de heterogeneidade e a abundância relativa foi plotada em seqüência decrescente obtendo-se as Curvas do Componente Dominância da Diversidade para cada estágio. As curvas foram ajustadas matematicamente aos modelos clássicos de distribuição da abundância. A avaliação da diversidade genética foi realizada por meio da técnica de PCR-FRLP do rDNA. Esta consistiu na ampliação do rDNA de esporos correspondente às comunidades de FMA de cada estágio por meio da reação de polimerização em cadeia, seguida das restrição dos fragmentos amplificados com a enzima *Hinf I* e a subsequente análise eletroforética. Treze espécies foram recuperadas por meio da coleta direta. Espécies de todas as famílias de FMA foram recuperadas das dunas, porém nem todos os representantes das diversas famílias ocorreram nos três estágios de estabilização. Membros da família Glomaceae não foram recuperados na ante-duna. A abundância média das espécies de FMA e a riqueza específica aumentaram com o estágio de estabilização. O índice de Margalef que também avalia a riqueza específica detectou um número proporcionalmente elevado de espécies na comunidade de FMA da ante-duna. A abundância relativa das diferentes famílias se modificou a medida que aumentou a estabilização. As Curvas evidenciaram diferentes níveis de adaptação das espécies às condições de cada estágio. A ante-duna apresentou a distribuição das espécies mais uniforme, mais adaptadas às condições deste estágio, ajustando-se com maior probabilidade ao modelo *broken stick*, da mesma forma que a duna fixa. Já a duna semi-fixa se ajustou preferencialmente ao modelo da série log. Os índices de heterogeneidade indicaram a maior diversidade para a comunidade de FMA na ante-duna. A utilização combinada da coleta direta de esporos e das culturas armadilhas permitiu um acréscimo de três espécies às treze identificadas por meio da coleta direta, tendo sido conseqüentemente detectadas dezesseis espécies nos três estágios. O potencial de inoculo dos FMA estimado pelos bioensaios aumentou progressivamente com o estágio de estabilização. Os resultados da avaliação genética mostraram um maior polimorfismo do material genético dos FMA nas comunidades da duna semi-fixa. Este resultado contrariou os resultados expressos pelos índices e pelos modelos de abundância que indicaram uma baixa diversidade específica e uma adaptação intermediária dos FMA às condições ambientais, respectivamente.

ABSTRACT

Specific and genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) was assessed in three stages of stabilization of dunes (foredunes, intermediate and fixed dunes) in Joaquina Beach, Santa Catarina Island. Specific diversity was assessed using direct methods based on countings of field collected spores, indirect methods based on countings of spores obtained after two cycles of trap-culturing, and the combination of both methods. In all stages of stabilization, the inoculum potential of AMF was also evaluated by means of bioassays. In the summer of 97, ten soil samples were collected from each dune stage. Six-100g sub-samples were selected and processed for countings and taxonomic identification of spores within each dune. The average species abundance and the species richness and heterogeneity indices were assessed. The relative abundances were plotted to obtain the "dominance diversity curves" representative of each stage. These curves were mathematically fitted to the classic models of abundance distribution. Genetic diversity was assessed by rDNA PCR-RFLP, a technique consisting of a PCR amplification of the rDNA region obtained from spores representing communities of AMF from each dune, followed by the restriction of the amplified fragments with the enzyme Hinf I and their eletrophoretic analysis. Thirteen species were recovered by direct methods. Species belonging to all families were present. However, not all the representatives of each family were present in the three stages. Moreover, no members of Glomaceae were recovered from the foredune. The average specific abundance and species richness increased with the stabilization stage. The Margalef's index, another assessment of species richness, indicated the foredune as the stage with the highest number of species of AMF. The relative abundance for species of the different families presented a different pattern as stabilization increased. Species abundance models indicated different levels of species adaptation to each dune stage. In both the foredune and the fixed dune, the most uniform distribution of the species and the best adaptation of species to environmental conditions were detected, the patterns corresponding to the broken stick model. However, in the intermediate dune the pattern tended to follow the log model. As for the heterogeneity indices, in the three stages assessed the highest diversity for the AMF community occurred in the foredune. The combined use of direct and indirect methods added three species to the thirteen identified with the use of field collected spores. As a result, a total of sixteen species were detected from all collections. The inoculum potential of AMF assessed by bioassays increased gradually with the stabilization stage. The result of the genetic assessment indicated a higher polymorphism in the genetic material of the AMF present in the intermediate dune. In contrast, the indices and the models of abundance indicated, for the intermediate dune, the lowest species diversity and a reduced adaptation of the AMF communities to the environmental conditions.

1 - INTRODUÇÃO

Atualmente os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) vêm sendo utilizados em vários processos biotecnológicos. Dentre estes se encontram a restauração de áreas degradadas pela extração mineral, a biorremediação de solos contaminados por metais pesados e a estabilização de dunas sujeitas à destruição por causas naturais ou antropogênicas. Estes processos podem ser viabilizados através da revegetação com plantas colonizadas por FMA.

A maioria das plantas terrestres estabelece uma simbiose mutualística com os FMA. Nesta simbiose, as plantas se beneficiam pelo aumento da capacidade de absorção de nutrientes do solo e os fungos pela obtenção de carboidratos produzidos pelas plantas. Além do benefício direto na nutrição mineral das plantas, os FMA podem promover a tolerância a estresses abióticos e bióticos.

Em ecossistemas como as dunas, sujeitos a alta salinidade, seca, ventos, baixas concentrações de nutrientes e altas temperaturas, entre outros, os FMA desempenham um papel vital no estabelecimento das plantas pioneiras, na composição vegetal e no progresso da sucessão. Programas de estabilização de dunas, por meio da revegetação com plantas adaptadas aos diversos fatores bióticos e abióticos deste ecossistema, e, portanto, colonizadas por FMA, requerem previamente a avaliação da biodiversidade, particularmente de grupos chaves da biota do solo, como os FMA a elas associadas. O conhecimento desta diversidade é essencial, uma vez que modificações na estrutura das comunidades do solo podem resultar em alterações das características funcionais da biota e conseqüentemente alterar os processos ecológicos.

A seleção de métodos eficientes de avaliação da diversidade dos FMA, associados às plantas nativas em diferentes estágios de estabilização nas dunas, torna-se fundamental para o estabelecimento e o monitoramento dos programas de estabilização.

Este trabalho teve como objetivo principal, avaliar a diversidade dos FMA em três estágios de estabilização de dunas.

Especificamente objetivou:

1. Avaliar a diversidade em nível de famílias e espécies, por meio de métodos diretos - coleta direta de esporos- e indiretos - culturas armadilhas e bioensaios.
2. Avaliar a diversidade genética por meio da técnica de PCR-FRLP do rDNA.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – BIODIVERSIDADE: CONCEITO, SIGNIFICADO E PRESERVAÇÃO.

A palavra “Biodiversidade” resultou da contração das expressões “diversidade biótica” ou “diversidade biológica” e foi introduzida em 1985, como “BioDiversidade,” no título do encontro científico *National Forum on BioDiversity*, realizado na cidade de Washington D.C., Estados Unidos (WILSON, 1988). O primeiro registro na literatura científica da palavra “Biodiversidade” ocorreu em 1987, quando um autor anônimo apresentou um relatório sobre uma exibição de painéis, intitulado “Biodiversidade em risco” (*Biodiversity Endangered*) (HAWKSWORTH, 1997). A partir de então, o número de publicações científicas com títulos que incluem a palavra biodiversidade aumentou exponencialmente até 1992, estabilizando-se nos anos seguintes em um número médio de 250 publicações por ano (HOGARTH, 1993; DYTHAM, 1996).

Biodiversidade refere-se à variabilidade entre os organismos vivos, provenientes de todas as fontes, incluindo ecossistemas terrestres, marinhos e demais ecossistemas aquáticos, e aos complexos ecológicos que integram: incluindo a diversidade inter- e intra-específica e entre os ecossistemas. Esta definição foi adotada pela Convenção da Diversidade Biológica (UNEP, 1992) e registrada no artigo 2 desta convenção. Existem, no entanto, outras definições sobre biodiversidade, tema amplo e complexo, que freqüentemente conduz à discordância, de tal forma que HULBERT (1971), citado por MAGURRAN (1988), considerou biodiversidade um exemplo de um não-conceito.

Devido à complexidade, é fundamental subdividir a biodiversidade em diferentes níveis. A importância de avaliar a diversidade biológica, não apenas em nível de espécies, mas também em nível genético e de ecossistema, foi inicialmente reconhecida por NORSE et al. (1980), citado por HAWKSWORTH (1997). A

diversidade genética pode ser considerada como o primeiro nível de diversidade e indica uma medida da informação que uma espécie tem codificada nos seus genes, de importância crucial para a sobrevivência. Já a diversidade específica refere-se à variedade das espécies de organismos presentes em determinado local. Por último, a diversidade em nível de ecossistemas refere-se à variedade das espécies assim como aos processos ecológicos envolvidos. Pode-se considerar, ainda, a diversidade em nível de paisagem (*landscape diversity*), que atende à geografia dos diferentes ecossistemas em áreas mais amplas e as conexões que ocorrem (SZARO, 1996).

A atual crise da biodiversidade é comparada frequentemente às extinções em massa, documentadas pelos relatórios obtidos após análise de fósseis. Os registros geológicos nos fornecem a única informação histórica sobre as respostas das espécies, populações, comunidades e ecossistemas frente às grandes perturbações ambientais. Através destes registros é possível enquadrar as extinções que ocorrem atualmente num contexto evolutivo de tempo mais amplo (RAUPP, 1988; ERWIN, 1996).

A vida surgiu na terra no final do período Pré-Cambriano e início do Cambriano. O aumento exponencial da diversidade dos organismos multicelulares, oriundos da evolução lenta de organismos menores e mais simples, ocorreu há 3 bilhões de anos. A maioria dos principais filos se originou durante esta fase. Após este período de diversificação das espécies, a formação de novas espécies, assim como a sua extinção, constituíram eventos naturais e o tempo de vida médio de uma espécie foi de aproximadamente 10 milhões de anos. Porém, a composição biológica da terra foi alterada diversas vezes, pelo menos em nível de espécies. O período Fanerozóico, que incluiu a era Paleozóica, Mesozóica e Cenozóica, foi afetado por profundas perturbações que culminaram em extinções em massa. A mais séria extinção ocorreu no final do Paleozóico, período Permiano, há 250 milhões de anos, e eliminou em torno de 52% das famílias de animais marinhos, tendo efeito, porém, menor nas plantas e nos animais terrestres. Outras quatro ou cinco extinções em massa no Fanerozóico são citadas na literatura, com possibilidade de eliminação de metade das espécies de animais existentes na época (RAUPP, 1988).

A perda contínua de espécies, em extinções em massa, aconteceu por processos naturais (ERWIN, 1996). No entanto, os episódios de extinção, que vivemos atualmente, têm características diferentes, pois são causados pelas atividades do próprio

homem e vêm ocorrendo a velocidades superiores àquelas dos acontecimentos naturais. Os registros geológicos mostram que a vida prosperou após extinções drásticas, mas que sua recuperação levou milhões de anos para ser atingida. Assim, se a situação atual for equivalente a um episódio correspondente a uma extinção em massa, é possível que o homem não tenha condições para testemunhar sua própria recuperação.

A biodiversidade deve ser considerada um recurso global que precisa ser conservado. Várias são as causas que, atualmente, vêm provocando a erosão da biodiversidade, entre elas, o modelo de explosão demográfica, a destruição e a fragmentação de habitats naturais, provocada pelas atividades do homem, tais como as práticas extrativistas, a poluição química do solo, da água e do ar, além de catástrofes, entre outras (WILSON, 1988).

Sólidos argumentos sustentam a importância da conservação da biodiversidade. Estes são de ordem ética e estética, além daqueles que suscitam maior discussão e que são de ordem ecológica e econômica. Há preocupações estéticas quando ocorre a perda de paisagens e espécies raras, empobrecendo-se, conseqüentemente, a experiência humana. Há preocupações éticas quando são perdidos outros seres vivos e se concede a prerrogativa à espécie humana de eliminar outras espécies do planeta (SOLBRIG, 1991).

Nos Estados Unidos da América do Norte, o movimento ambientalista denominado “ecologia profunda” (*deep ecology*), criado em 1972, contrasta com o movimento contra a poluição e a exaustão de recursos nos países desenvolvidos, denominado “ecologia superficial”. O primeiro tem como princípio básico o direito à existência de todos os seres vivos e rejeita a visão antropocêntrica, baseada no princípio de que o homem é o elemento central do planeta e que o valor dos restantes seres vivos está relacionado com seu valor utilitário. Ecologistas, como Paul Ehrlich, consideram este movimento suscetível de mudar os valores, que hoje governam parte da atividade humana, e que em conseqüência são essenciais à persistência da nossa civilização. Embora todos estes argumentos sejam igualmente importantes, os de natureza ecológica e econômica são os que se apresentam para a sociedade humana como os mais convincentes para a preservação da biodiversidade (NATIONS, 1988; EHRLICH, 1993).

Diversos cientistas sustentam que a alta diversidade específica é essencial para o funcionamento e sustentabilidade dos ecossistemas. NAEM et al. (1994) forneceram as primeiras evidências experimentais que sustentam esta hipótese. Desenvolveram experimentos em câmaras de crescimento com condições controladas, mantendo em cada câmara o mesmo número de organismos dentro dos quatro níveis tróficos, porém variando, em cada nível, o número de espécies. Concluíram que as comunidades com maior biodiversidade exibiam maiores taxas de produção primária (biomassa) e maior consumo de CO₂ (respiração). Em seqüência, TILMAN & DOWNING (1994) realizaram experimentos em condições de campo, com diferentes espécies de gramíneas permanentes, numa vasta área experimental e durante vários anos. Estes pesquisadores observaram que, quanto maior é a biodiversidade, maior é a estabilidade dos ecossistemas, concluindo, assim, que os ecossistemas com maior riqueza específica foram os mais resistentes à devastação por estresses como a seca, apresentando também maior capacidade de recuperação. Recentemente, TILMAN, WEDIN, & KNOPS (1996) fizeram um notável avanço, quando demonstraram que, à medida que aumentou a biodiversidade, em diferentes ecossistemas de gramíneas, aumentou também a produtividade e a eficiência na utilização dos recursos minerais do solo. Estes pesquisadores alertaram para o fato de que esta conclusão pode não ter sido apenas um resultado direto do aumento da biodiversidade, mas um reflexo do aumento do número de papéis funcionais no ecossistema, resultante do aumento no número de espécies. Foi, assim, evidenciada a importância do papel da biodiversidade funcional nos ecossistemas. Existem, entretanto, críticas aos trabalhos de Tilman e colaboradores, especificamente no que se refere ao delineamento experimental e à interpretação dos resultados (HUSTON, 1997).

As publicações mais recentes vêm sugerindo a necessidade de reavaliação destes conceitos, indicando que o aumento da produtividade, assim como o aumento da capacidade de aquisição de nutrientes e da sustentabilidade dos ecossistemas podem estar associados com o maior número de espécies chaves e não apenas a uma maior riqueza específica (GRIME, 1997).

Por outro lado, NAEM & LI (1997) reforçaram a hipótese de que a biodiversidade pode representar uma segurança biológica contra as ameaças externas. Em experimentos com microcosmos e diversas espécies de microrganismos em

diferentes grupos funcionais ou tróficos, verificaram que quanto maior foi o número de espécies em cada grupo funcional, maior foi a capacidade de produção de biomassa no ecossistema. Estes pesquisadores verificaram também que a redundância de espécies, presença de múltiplas espécies em cada grupo funcional, constituiu um importante *commodity* para o ecossistema. A base ecológica deste “seguro biológico” foi explicada pelo princípio do crescimento compensatório, um processo ecológico amplamente observado na natureza, que ocorre quando uma espécie, dentro de um grupo funcional, aumenta o seu crescimento em função da redução ou perda de outra espécie no mesmo grupo funcional. Como resultado, pode-se, portanto, concluir que o efetivo papel da biodiversidade nos ecossistemas é assunto controverso.

No que se refere à conservação da biodiversidade, os interesses econômicos têm prevalecido em relação às preocupações éticas, estéticas e ambientais. A Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, realizada no Rio de Janeiro em 1992, colocou frente a frente interesses e poderes de decisão desiguais entre os países que controlam a tecnologia e aqueles que detêm maiores biodiversidades. A biodiversidade constitui a matéria-prima da biotecnologia e a fonte de novos produtos, principalmente aqueles de origem microbiana. É na demanda de produtos novos, assim como na substituição de outros já produzidos por vias não biológicas, que reside o maior interesse na exploração da biodiversidade (BULL,1991; IWU,1996).

A biotecnologia microbiana não é uma ciência nova, mas, atualmente, com o desenvolvimento de novas tecnologias, principalmente no que se refere às técnicas moleculares, vem ampliando seu espectro de aplicações. Através dela, vêm sendo obtidos metabólitos, utilizados na indústria farmacêutica, na química fina e na agroquímica, enzimas para o processamento de alimentos e biotransformações, proteínas humanas, como a insulina, obtidas por meio da engenharia genética. Além destes produtos, os microrganismos vêm sendo utilizados nos tratamentos de efluentes e resíduos, e muitos vêm fornecendo genes para a obtenção de plantas transgênicas de importância agrícola, medicinal e industrial. Diversos microrganismos são também utilizados na preparação de inóculos, que propiciam o aumento da produtividade agrícola e florestal, como por exemplo, as bactérias fixadoras de nitrogênio e os fungos micorrízicos. Estes últimos podem ser também utilizados na recuperação de áreas degradadas (PETERSON, et al. 1984; NIESBET et al. 1991).

O sucesso da biotecnologia depende sobretudo da biodiversidade microbiana e da conservação dos recursos genéticos que dela advém. Os microrganismos, principalmente os fungos e as bactérias, exibem uma extraordinária diversidade no que se refere à sua nutrição, à exploração dos nichos ecológicos, à interação com outros organismos e a seus metabolismos secundários (NIESBET et al., 1991).

O germoplasma de interesse para a indústria biotecnológica concentra-se, sobretudo, nos países tropicais e em desenvolvimento, sendo Brasil, Colômbia, México e Indonésia os quatro países mais ricos em biodiversidade. O Brasil, por sua vez, lidera as estatísticas mundiais neste sentido, reunindo o mais elevado número de espécies de organismos do planeta. Do total dos organismos já descritos, mais de 10% ocorrem em território brasileiro. A exploração racional desta riqueza daria uma nova face à política de desenvolvimento do país e a perda desse patrimônio, além de constituir um desastre de proporções planetárias, repercutiria profundamente na área econômica do próprio país (MITTERMEIER et al., 1992).

A diversidade biológica e sua conservação vem gerando grande interesse a nível científico e político, e são numerosas as iniciativas nacionais e internacionais desenvolvidas nestes dois planos. Em Maio de 1989, foram lançadas pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (*United Nations Environment Programme*- UNEP) as primeiras tentativas para desenvolver a estrutura da Convenção sobre a Diversidade Biológica. Nessa época, o Conselho Governamental da UNEP deu início às negociações através da realização de uma convenção internacional para a discussão do tema da conservação da biodiversidade global. Esta convenção ocorreu em Junho de 1992, no Rio de Janeiro, durante a Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente e Desenvolvimento, com a participação de membros de cerca de 160 países. O tratado estabelecido tornou-se efetivo em Dezembro de 1993 e foi ratificado por 152 países em Julho de 1996 (IWU, 1996; SZARO, 1996; HAWKSWORTH, 1997).

A Convenção Internacional é um documento que consta de 42 artigos e 2 anexos e apresenta, como objetivos, a conservação da diversidade biológica mundial, a utilização sustentável de seus componentes, o reconhecimento dos direitos soberanos e da autoridade dos estados e países sobre seus recursos naturais, a divisão dos benefícios originados da exploração dos recursos genéticos e a definição de mecanismos legais e multilaterais para o intercâmbio de material genético (IWU, 1996).

2.2 – AVALIAÇÕES E MEDIDAS DA BIODIVERSIDADE

As medidas da biodiversidade levam em conta dois componentes: a riqueza específica, ou variedade ou densidade de espécie e a uniformidade (*evenness*) ou equitatividade na repartição de indivíduos entre as espécies, representada pela abundância relativa ou o grau de dominância das diferentes espécies (ODUM, 1985). Esta dependência da biodiversidade de dois componentes é um dos motivos que tornam sua avaliação complexa (MAGURRAN, 1988).

As medidas de diversidade mais utilizadas pelos ecologistas podem ser divididas em três categorias principais: os índices de riqueza específica, os modelos da abundância das espécies e os índices de heterogeneidade (MAGURRAN, 1988).

Dentro dos índices de riqueza, o mais simples e o mais freqüentemente utilizado é o índice de riqueza (S) que representa o número total das espécies presentes em uma comunidade (ODUM, 1985). No caso de áreas de estudo bem delimitadas, tanto no espaço quanto no tempo, incluindo espécies adequadamente enumeradas e identificadas, o índice de riqueza das espécies pode fornecer uma medida de diversidade intuitiva e extremamente útil (MAGURRAN, 1988). No entanto, com freqüência torna-se difícil a caracterização das comunidades, em parte devido a problemas taxonômicos e também devido a problemas de amostragem. O número de espécies depende do número de amostras coletadas e também do volume de habitat explorado (BEGON, 1986). Sendo, portanto, fundamental, nestas determinações, a definição de um sistema de amostragem representativo do local e das espécies em estudo (MAGURRAN, 1988).

Existem, entretanto, outros índices que expressam a riqueza específica, dentre os quais, o índice de Menhinick's e o de Margalef. Estes índices utilizam uma combinação entre a riqueza (S) e o número total de indivíduos (N) presentes na amostra. O índice de Margalef, assim como a riqueza (S), é sensível ao tamanho da amostra.

Dentre as medidas de avaliação da diversidade, estão ainda os modelos de distribuição da abundância das espécies. Embora diversos pesquisadores tenham proposto vários modelos, a diversidade pode ser representada por quatro modelos principais: a log normal, a série geométrica, as séries logarítmicas e o modelo *broken stick* de MacArthur (MAGURRAN, 1988). Estes modelos expressam uma progressão que representa, nas séries geométricas, poucas espécies dominantes e as restantes pouco

representadas; nas séries log e log normal, maior número de espécies com a abundância intermediária e, finalizando, no modelo *broken stick*, espécies com abundância equitativa. Quando a abundância das espécies é plotada, em seqüência decrescente, em um gráfico, as séries geométricas são representadas por linhas retas com pendentes íngremes. As séries log também são representadas por uma linha reta com pendente íngreme, embora não tão pronunciada como no modelo anterior. Já as séries log normal são representadas por curvas sigmoidais e, por último, as curvas do modelo *broken stick* são apresentadas por pendentes suaves (MAGURRAN, 1988). BURTON et al. (1992) sugeriram que uma curva com forte pendente representou a dominância de uma ou poucas espécies relativas ao número total de espécies (baixa riqueza e/ou baixa uniformidade), enquanto uma curva com pendente suave expressou um maior equilíbrio entre a distribuição das espécies, mas uma alta diversidade e/ou riqueza. Estes modelos de distribuição de abundância podem explicar também a repartição de nichos ecológicos. Nesse sentido, as séries geométricas representam um caso de máxima ocupação dos nichos, enquanto a série *broken stick* de MacArthur pode refletir um caso de mínima ocupação de nicho por cada espécie, sendo os recursos divididos equitativamente. Estas duas possibilidades representam o que corresponde a situações extremas, sendo que a maioria das distribuições que ocorrem na natureza se aproxima ao tipo de curva sigmoidal intermediária, indicando um padrão mais complexo de diferenciação e de superposição de nichos (ODUM, 1985).

Por último, a terceira categoria das medidas de avaliação da biodiversidade é constituída pelos índices de heterogeneidade. Estes índices são proporções ou expressões matemáticas, que levam em consideração, de forma combinada, a riqueza específica e a abundância relativa (ODUM, 1985). De acordo com MARGALEF (1991), qualquer função monótona (funções que são apenas crescentes ou decrescentes) que tenha um valor mínimo, quando todos os elementos pertencem a uma única classe ou espécie, e um valor máximo, quando cada elemento pertence a uma classe ou espécie distinta, pode servir de índice de diversidade. Dos vários índices de heterogeneidade propostos, distinguem-se duas classes, os índices informacionais e os índices de dominância (MAGURRAN, 1988).

Os índices informacionais baseiam-se no princípio de que a diversidade, ou informação, num sistema natural, pode ser medida de forma similar à informação

contida num código ou mensagem. Dentro destes índices, o mais utilizado é o índice de Shannon (H). Este índice considera que todas as espécies estão representadas na amostra. Outro índice informacional é o índice de Brillouin, que é apropriado para o caso de indivíduos não aleatoriamente amostrados. Este último índice, no entanto, requer cálculos mais complexos que o de Shannon (H) (MAGURRAN, 1988).

O segundo grupo dos índices de heterogeneidade refere-se aos índices de dominância, que consideram com maior peso as espécies dominantes. Entre estes, encontra-se o índice de Berger-Parker, o qual representa uma medida de dominância simples e fácil de calcular, contudo, com pouca capacidade discriminativa. Outro índice deste grupo é o índice de diversidade de Simpson (D ou D'), que é um dos mais freqüentemente utilizados.

De todos os índices de heterogeneidade, os mais utilizados em pesquisas ecológicas são o índice de Simpson (D) e o índice de Shannon (H). Estes dois índices diferem principalmente quanto à forma de evidenciar as espécies na amostra. O primeiro, evidencia as espécies dominantes, enquanto o segundo, o índice de Shannon (H), evidencia espécies raras na amostra (ODUM, 1985). Ambos têm uma capacidade de discriminação moderada e um nível intermediário quanto à complexidade dos cálculos. Em termos de sensibilidade ao tamanho da amostra, o índice de Simpson (D) apresenta uma sensibilidade menor (MAGURRAN, 1988). A partir dos índices de diversidade de Simpson (D) e Shannon (H) calculam-se os respectivos índices de uniformidade ou equitatividade, os quais correspondem a uma normatização dos índices de diversidade (ODUM, 1985).

As medidas de biodiversidade podem ser aplicadas em diversas escalas e hierarquias taxonômicas. WHITTAKER (1960), citado por ODUM (1985), dividiu a diversidade em diferentes escalas espaciais: *alfa*, que se refere à diversidade que ocorre dentro de um mesmo habitat ou dentro de uma comunidade; *beta*, para a diversidade que ocorre entre habitats; e *gama* para a diversidade que ocorre numa escala geográfica, em nível de bioma, de continente, de ilha, entre outros.

No que se refere aos diferentes níveis hierárquicos, as medidas de diversidade, teoricamente, podem ser aplicadas desde a diversidade genética até a diversidade dos ecossistemas. Também podem ser utilizadas nas diferentes categorias taxonômicas, podendo se aplicar a riqueza e o *evenness* às famílias, aos gêneros, às raças, às

variedades ou aos ecotipos. Na maioria das pesquisas, estes componentes geralmente se referem à diversidade específica (BURTON et al., 1992).

As medidas de biodiversidade podem ser importantes, no monitoramento ambiental onde se presume que os efeitos adversos da poluição reduzam a diversidade ou impliquem em alterações nas formas da distribuição da abundância das espécies. Nos dois casos, a diversidade é sinônimo de “qualidade ecológica” e é utilizada como um índice da “saúde” do ecossistema. Para o monitoramento ambiental, utilizam-se amplamente os índices de diversidade e da distribuição da abundância das espécies, sendo que para o manejo, com finalidade de preservação, se adotam quase exclusivamente as medidas de riqueza de espécies (MAGURRAN,1988).

2.3 - A BIODIVERSIDADE MICROBIANA - O CASO ESPECÍFICO DOS FUNGOS

A avaliação da biodiversidade é uma tarefa complicada. Os principais problemas são a amplitude da própria diversidade biológica, a dificuldade na recuperação e na identificação taxonômica de diversos grupos de seres vivos e a carência de taxonomistas capacitados. Estes problemas são amplificados quando se trata de avaliar a diversidade microbiana (BOUSSIENGUET, 1991).

Estimativas indicam a existência de 30 milhões de espécies vivas no planeta. Dentre estas, apenas 5% foram descritas numa proporção de 15.000 a 20.000 espécies por ano. Desta forma, com base na utilização dos métodos atuais de avaliação e nas proporções indicadas, estima-se que serão necessários quase 2 milênios para se descrever todos os organismos existentes no planeta. Lastimavelmente, a erosão dos recursos genéticos, como resultado da destruição das florestas e de outros ecossistemas, tem ocorrido em velocidades maiores do que ocorre a avaliação da diversidade de alguns grupos de seres vivos, como por exemplo, os microrganismos (WILSON, 1988; BOUSSIENGUET, 1991; HUNTER, 1996).

No caso dos microrganismos, alguns autores indicam que aproximadamente 99% das espécies presentes em ecossistemas naturais ainda não foram identificadas,

sendo este conhecimento essencial para um manejo efetivo dos recursos naturais como fonte de novos microrganismos ou genes para a inovação tecnológica (ATKINSON, 1996). Os trabalhos de TORSVIK et al. (1990a ; 1990b) mostraram a situação de precariedade em que se encontra o conhecimento da diversidade microbiana. Estes pesquisadores coletaram duas amostras de solo de apenas uma grama, sendo uma proveniente de uma floresta e outra de sedimentos marinhos, na Noruega. De cada amostra foram recuperadas bactérias e extraído o DNA total. Após análise do DNA foi estimado o número aproximado de espécies presentes, concluindo-se que, de cada amostra, mais de 4.000 espécies estavam presentes com reduzida sobreposição nas duas amostras. Foram, entretanto, até presentemente identificadas cerca de 4.000 espécies de bactérias, ou seja, um número equivalente àquele identificado por TORSVIK em uma amostra de solo reduzida. Esta situação também ocorre com outros grupos de microrganismos.

A diversidade microbiana, até hoje identificada, inclui 82.500 espécies, dentro das quais, cerca de 72.000 correspondem a espécies fúngicas. Os fungos constituem, após os insetos, o maior grupo de organismos no planeta. Conseqüentemente, a tarefa de se obter um inventário a nível mundial é de maior magnitude para os fungos do que para outro grupo de microrganismos. Estima-se, com base na relação plantas vasculares–fungos (6:1), na Grã Bretanha, onde ambos grupos vêm sendo amplamente estudados, que a diversidade fúngica global seja de aproximadamente 1.500.000 espécies. Estes dados foram confirmados pelos resultados do projeto “Avaliação da biodiversidade global” (*Global biodiversity assessment*), empreendido pelo Programa Ambiental das Nações Unidas entre 1993-95 (HAWKSWORTH, 1995; 1997). No entanto, de acordo com LODGE (1997), os micologistas que pesquisam alguns ecossistemas tropicais concluíram que a diversidade fúngica nestas regiões é maior do que nas regiões temperadas, considerando-se, portanto, o valor obtido subestimado.

A dificuldade na avaliação da diversidade fúngica deve-se a diversos fatores, que vão desde os metodológicos à dimensão desses microrganismos, como ao elevado número de espécies presentes nos locais de estudo, entre outros. Apenas alguns grupos de fungos estão completamente caracterizados e identificados taxonomicamente, fato que resulta não só da carência de profissionais capacitados, como de informações sobre as características taxonômicas diferenciadoras dos grupos ou das espécies. A falta de

consenso entre os microbiologistas no que se refere ao conceito de “espécie” e de “especificidade face ao hospedeiro” constitui, também, um fator complicador. (CANNON, 1997). Tradicionalmente, a biodiversidade se baseia na espécie como unidade de avaliação. Entretanto, quando se considera o caso dos microrganismos o conceito clássico de espécie não pode ser aplicado (TORSVIK et al., 1996). Segundo HAWKSWORTH (1995), o conceito de morfo-espécie vem, assim, sendo o mais utilizado pelos micologistas. Este conceito reconhece as unidades, baseando-se nas características morfológicas dos indivíduos, mas dados moleculares vêm mostrando que algumas morfo-espécies compreendem várias espécies biológicas e/ou filogenéticas.

Embora os fungos constituam um grupo numeroso de microrganismos com grande potencial biotecnológico e desempenhem funções importantes nos ecossistemas, pouca atenção vêm recebendo na área científica. Os fungos podem desempenhar atividades saprófitas, parasitas e ainda simbióticas, sendo que neste caso diversos fungos podem desenvolver associações mutualísticas com as raízes da maioria das plantas vasculares, as micorrizas (HAWKSWORTH, 1991).

As micorrizas podem ser consideradas simbioses quase universais, não só pelo grande número de plantas susceptíveis como também pela ocorrência generalizada na maioria dos habitats. De acordo com as estruturas produzidas na raiz e sua função são distinguidos diversos tipos, sendo os principais, as ericóides, as ectomicorrizas, as endomicorrizas.

Os fungos envolvidos nas endomicorrízicas de tipo arbuscular (FMA) são simbioses obrigatórios, ou seja, só completam seu ciclo de vida na presença de uma planta hospedeira. Estes fungos desenvolvem a simbiose associados a 90% das plantas terrestres, constituindo o tipo mais difundido entre as micorrizas. As plantas associadas aos FMA se beneficiam principalmente pelo aumento da capacidade de absorção de nutrientes, particularmente o fósforo; e os fungos, por sua vez, se beneficiam recebendo carboidratos fornecidos pelas plantas hospedeiras (HARLEY & SMITH, 1983). Além do benefício direto na nutrição das plantas, os FMA podem promover a tolerância a estresses abióticos e bióticos. Os FMA podem colonizar um número elevado de plantas de grupos taxonômicos diferentes, apresentando uma falta de especificidade generalizada para o hospedeiro (BAREA, et al., 1984). Porém, é importante distinguir entre “especificidade”, ou seja, a capacidade inata para colonizar; “infectividade”, isto

é, o nível de colonização; e "efetividade", a resposta do hospedeiro à colonização. Cada espécie de FMA dispõe de infectividades distintas e também pode propiciar diferentes efeitos no desenvolvimento das plantas, o que, por sua vez, depende de fatores ambientais particularmente do solo. A infectividade de uma comunidade de FMA depende do número, do tipo e do vigor de propágulos fúngicos e pode ser avaliada através de bioensaios com hospedeiros de fácil crescimento em condições controladas.

Existem evidências que plantas fósseis apresentavam colonizações radiculares datadas de aproximadamente 400 milhões de anos (PIROZYNSKI & DALPÉ, 1989). Estas evidências vêm sendo corroboradas por meio da análise molecular dos genes ribossômicos. A seqüência gênica 17S do RNA ribossômico foi utilizada como um relógio molecular para inferir as épocas de divergência entre as famílias e os gêneros dos FMA. Da mesma forma, se estimou a época em que poderiam ter sido originados os FMA, e se concluiu que ocorreu entre 350-460 milhões de anos (SIMON et al., 1993, 1996). Ambas evidências reforçam a hipótese de que estes fungos desempenharam um papel fundamental na colonização do ambiente terrestre pelas plantas.

As associações micorrízicas afetam de forma relevante o funcionamento dos ecossistemas terrestres. Os fungos micorrízicos interagem diretamente com a comunidade microbiana, a comunidade animal e a comunidade vegetal. Estas interações envolvem competições por espaço e por nutrientes, quer entre fungos micorrízicos, entre fungos saprófitas e parasitas, e ainda, com a restante biota do solo. As interações com a comunidade animal podem ser tanto positivas quanto negativas. Os fungos competem com os animais pelo carbono das plantas com as quais se associam. Alguns animais utilizam o micélio como substrato nutricional, resultando na perda de biomassa fúngica. Algumas interações têm também um papel importante na dispersão dos fungos micorrízicos. Desta forma, as micorrizas influenciam a composição e o funcionamento das comunidades vegetais, regulando a distribuição dos recursos e o desenvolvimento das plantas. Esta regulação pode ser realizada por meio do transporte de nutrientes, preferencialmente de um indivíduo para o outro, assim como, pela distribuição dos nutrientes e do carbono através da comunidade (ALLEN, 1991).

A transferência de carbono entre as raízes de plantas interligadas por meio dos micélios de FMA foi comprovada por FRANCIS et al. (1984). Estes pesquisadores utilizaram experimentalmente plantas micorrizadas e não micorrizadas de uma única espécie e as submetem a um tratamento com carbono radiativo. Estas plantas foram consideradas como "doadoras", promovendo a infecção micorrízica e a transferência do carbono. Por outro lado, plantas de outra espécie, que não estavam micorrizadas, foram consideradas como "receptoras" dos benefícios fornecidos pelas "doadoras". Estas últimas foram submetidas a distintas intensidades de sombreamentos. Os resultados obtidos por meio de auto-radiografia mostraram que as interligações funcionavam como uma via direta na transferência de carbono entre as raízes das plantas "doadoras" micorrizadas e as "receptoras" não micorrizadas, e, ainda, que a magnitude da transferência foi maior na direção das plantas receptoras, submetidas à baixa iluminação, em comparação com as plantas que receberam uma iluminação total.

O papel dos FMA nas comunidades foi investigado por GRIME et al. (1987) em condições controladas. Estes pesquisadores concluíram que a colonização micorrízica causou um aumento da produtividade do ecossistema por intermédio da espécie vegetal dominante, que favoreceu as restantes espécies associadas. Todas as espécies colonizadas apresentaram biomassa relativamente maior que as mesmas espécies sem micorrizas. A maior diversidade vegetal foi, em parte, resultante do aumento da sobrevivência das plantas colonizadas. Da mesma forma que FRANCIS, estes autores verificaram a ocorrência de transferência carbono radioativo das plantas colonizadas para aquelas não colonizadas.

As plantas diferem quanto à sua dependência micorrízica. Aquelas que têm o crescimento estimulado pela associação são denominadas micotróficas e podem ser obrigatórias ou facultativas. As obrigatórias não se desenvolvem sem micorrizas, enquanto que as facultativas se desenvolvem na ausência da simbiose quando em solos férteis, mas se beneficiam da associação quando se encontram em solos pobres. Em sucessões vegetais, o tipo de planta que ocorre em cada estágio apresenta dependências distintas da simbiose micorrízica (JANOS, 1980). Este pesquisador verificou que nos primeiros estágios de uma sucessão ocorreu uma predominância das plantas não micotróficas, as quais foram substituídas gradualmente por espécies micotróficas facultativas e, finalmente, nos últimos estágios sucessionais por plantas micotróficas

obrigatórias. Este modelo evidenciou a importância dos FMA nos processos ecológicos, tal como, as sucessões vegetais. No entanto, estudos realizados por KOSKE & POLSON (1984) em dunas, em Rhode Island, nos Estados Unidos, mostraram alguns resultados contrastantes, particularmente no estágio inicial de sucessão. Estes pesquisadores verificaram que *Ammophila breviligulata*, a gramínea predominante nos estágios iniciais de estabilização de dunas, apresentou altos índices de colonização micorrízica. Esta evidência sugeriu que o estabelecimento de micorrizas foi essencial no processo de estabilização das dunas e sua sucessão subsequente.

2.4 - OS FUNGOS MICORRÍZICOS: IMPORTÂNCIA E AVALIAÇÕES DA DIVERSIDADE.

2.4.1 - DIVERSIDADE A NÍVEL DE FAMÍLIA E DE ESPÉCIE

São reconhecidas atualmente cerca de 150 espécies de FMA o que representa um número baixo, quando comparado aos milhares de espécies de ascomicetos e basidiomicetos que constituem as estimativas de fungos ectomicorrízicos (SANDERS, 1997).

Os grupos taxonômicos dos FMA estão subdivididos de acordo com a estrutura e o processo de desenvolvimento do fungo. As espécies, aproximadamente 150, os seis gêneros: *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Glomus*, e *Sclerocystis*; as três famílias: *Acaulosporaceae*, *Gigasporaceae*, *Glomaceae* e as duas subordens: Glominae e Gigasporinae estão agrupados na Ordem Glomales, Classe Zigomicetes, Subdivisão Zigomicota. Esta ordem inclui fungos micorrízicos que produzem arbúsculos nas células do cortex radicular. Já os membros de cada subordem diferem quanto ao tipo de estrutura micorrízica produzida e quanto à seqüência de eventos na formação dos esporos. Por outro lado, as famílias e os gêneros diferem quanto ao modo de formação dos esporos, à sua organização e ao processo germinativo.

Finalmente, as espécies são diferenciadas por características subcelulares geralmente associadas ao processo germinativo (SYLVIA, 1998).

Sendo os FMA simbiotes obrigatórios, a avaliação da diversidade envolve procedimentos complexos. Um aspecto complicador reside no fato de que os fungos proliferam tanto no solo como no cortex radicular, portanto, dispondo de uma fase extra-radicial e de uma fase intra-radicial. A fase extra-radicial inclui esporos e hifas e é o componente mais freqüentemente utilizado nas avaliações. A contagem de esporos recuperados do solo é uma das medidas usadas para quantificar a diversidade, sendo uma estratégia direta de avaliação. Porém, vários pesquisadores vêm considerando insuficiente a utilização dos esporos como única fonte para as avaliações. MORTON (1993) aponta dois motivos de consideração problemática para a avaliação da diversidade de FMA com base em esporos. O primeiro problema pode surgir uma vez que a ausência de esporos não indica necessariamente a ausência de fungos micorrízicos, já que estes podem estar presentes intra-radicialmente ou sob a forma micelial no solo. O segundo, pode estar relacionado à dificuldade na identificação dos fungos a partir de esporos coletados a campo, geralmente deteriorados por hiperparasitismo ou, então, por se encontrarem em fases de desenvolvimento inadequadas para a identificação das estrutura diferenciadoras.

Outro aspecto a ser observado é que as avaliações por métodos diretos refletem eventos passados da simbiose, sendo conseqüentemente incorreta a relação desta informação com a situação contemporânea, o que pode comprometer a interpretação dos dados das avaliações. O uso isoladamente de métodos diretos pode desta forma conduzir a subestimação ou superestimação da diversidade (SANDERS, 1996).

Métodos complementares que permitam a avaliação da diversidade dos FMA são fundamentais. Dentre estes, podem ser utilizados as culturas armadilhas e os bioensaios, que consistem em métodos indiretos da avaliação. MORTON (1995 b) estimou a diversidade específica dos FMA em quatro diferentes ecossistemas, incluindo as dunas. Para tal, utilizou uma combinação de métodos, como a avaliação direta a partir de esporos recuperados diretamente do solo e a avaliação complementada com esporos resultantes de três gerações de culturas armadilhas. As culturas armadilhas são importantes na complementação da diversidade e podem ser obtidas após a multiplicação dos esporos de FMA coletados a campo, em hospedeiros alternativos,

obtendo-se assim populações mistas de fungos com esporos de alta viabilidade e, portanto, de fácil identificação taxonômica. Através das culturas armadilhas é, por vezes, possível recuperar espécies não detectadas a campo. Segundo MORTON (1995b), o número de espécies identificadas, em solos de dunas, aumentou com a utilização desta estratégia, tendo permanecido constante após a segunda geração das culturas armadilhas.

No bioensaio, método indireto para avaliação da abundância, é estimado o número de propágulos (esporos, hifas e raízes infectadas) viáveis presentes no solo, que na contagem direta de esporos não é identificado. Neste método, são avaliados os pontos de entrada dos fungos na raiz, ou a porcentagem de infecção radicular, da planta hospedeira ao final de diferentes períodos de tempo, de cultivo em solo proveniente do sítio em estudo (MOORMAN & REEVES, 1979).

A maioria dos resultados publicados sobre a diversidade dos FMA se baseou exclusivamente em esporos coletados diretamente do solo (MORTON, 1993). Nas diversas publicações em que foi apresentada a diversidade específica dos FMA, utilizando-se esporos coletados a campo em sistema de dunas em várias regiões do planeta, os resultados foram expressados na sua grande maioria através do índice de riqueza específica (S) e da abundância. Um dos primeiros estudos sistemáticos sobre os FMA em dunas foi realizado por NICOLSON (1960). Neste trabalho, o pesquisador verificou que o grau de colonização micorrízica nas gramíneas das dunas, na Escócia, variava conforme a estação do ano e a posição das plantas nas dunas, aumentando desde a ante-duna à duna fixa. Em pesquisas realizadas em dunas da Austrália, KOSKE (1975) mostrou que a abundância, assim como a riqueza específica, eram menores na ante-duna e que estes valores aumentaram com o estágio de estabilização. Da mesma forma, KOSKE & HALVARSON (1981), em dunas em Rhode Island, analisaram as variações da abundância e da frequência dos FMA, considerando a cobertura vegetal e algumas características químicas e físicas do solo, tais como, pH, matéria orgânica e tamanho dos grãos de areia. Concluíram que a abundância e a riqueza aumentavam com a cobertura vegetal, ou seja, com o nível de estabilização, ocorrendo uma baixa correlação com os fatores analisados, exceto o tamanho dos grãos de areia. Trabalhos recentes realizados nas dunas do Golfo do México (CORDIKI & RINCON, 1997a) avaliaram o estado micorrízico e o potencial de inóculo dos FMA, ao longo de um

gradiente sucessional, utilizando para tal, dois tipos de bioensaio diferentes. Um dos bioensaios foi realizado em condições controladas e outro, em condições de campo. De acordo com os resultados dos dois bioensaios, ocorreu um aumento da atividade micorrízica com os estágios sucessionais. Trabalhos sobre a avaliação de diversidade dos FMA em estágio sucessionais de uma plantação de *Ammophila breviligulata* em regiões de dunas em Massachussetts, Estados Unidos, verificaram que a riqueza, a abundância e a porcentagem de raiz colonizada aumentavam com a sucessão de forma similar às sucessões naturais.

Poucos pesquisadores têm avaliado a diversidade específica de forma integrada, envolvendo diversos métodos. No entanto, KOSKE (1987) analisou a composição das espécies de FMA ao longo de uma linha de aproximadamente 350 Km de dunas na costa Atlântica. Este pesquisador recuperou um total de 23 espécies, sendo que *Gigaspora sp* e *Scutellospora sp* foram as espécies predominantes. Nesta região, o principal fator de variação foi a temperatura, tendo se observado uma relativa uniformidade no que se refere a outros fatores como as condições edáficas, a precipitação anual e a vegetação, entre outros. A uniformidade das condições possibilitou a avaliação da composição dos FMA em resposta a uma variável. Para tal, foram utilizados parâmetros, como a densidade de espécies, a riqueza específica, o índice de dominância de Berger-Parker modificado e as curvas do componente dominância da diversidade e observados que os efeitos da temperatura numa comunidade de FMA foram separados em dois componentes, o primeiro com efeito direto sobre o fungo e segundo sobre a planta hospedeira. KOSKE (1987) concluiu, ainda, que ocorreu um aumento na riqueza e na densidade de esporos com a temperatura. Através das curvas, concluiu que as pendentes mais íngremes correspondiam às regiões submetidas às menores temperaturas e conseqüentemente ao maior estresse para as comunidades de FMA. O índice de dominância também mostrou os valores mais altos nos locais de maior estresse térmico.

No Brasil, poucos trabalhos foram publicados sobre as comunidades de FMA em dunas. Os primeiros estudos sistemáticos foram efetuados por STÜRMER & BELLEI (1994) nas dunas da praia da Joaquina, Ilha de Santa Catarina. Neste trabalho foram definidas a composição e a variação sazonal das populações de FMA, associadas com *Spartina ciliata* – gramínea predominante nas ante-dunas e dunas semi-fixas no sul do

país. Foi observado que a riqueza específica na duna semi-fixa foi de 12 espécies e que as espécies predominantes, determinadas por contagem de esporos no solo, foram *Acaulospora scrobiculata* e *Gigaspora albida*. A abundância das espécies de FMA nestas dunas apresentou sazonalidade e a riqueza específica variou entre 4.6 a 6.8, sendo o verão a estação que apresentou a maior abundância de esporos no solo (380 esporos por 100 gramas de solo). Além da riqueza e da abundância, foi utilizada a curva componente dominância da diversidade com o objetivo de se analisar a estrutura da comunidade de FMA nesta duna, a qual se adaptou ao modelo *broken stick*. Foi verificado, ainda, que a composição e a riqueza de espécies de FMA nestas dunas apresentou semelhança com aquelas das dunas da costa Atlântica dos Estados Unidos.

2.4.2 - DIVERSIDADE GENÉTICA

As mutações gênicas dão origem à diversidade genética presente na natureza. A seleção natural, porém, determina se essas mutações se estabelecerão ou serão eliminadas. A ampla diversidade dos seres vivos resulta da distribuição de mutações favoráveis que vêm ocorrendo nos últimos três bilhões de anos, em bilhões e trilhões de células. As variações genéticas presentes na natureza envolvem aspectos vinculados às funções fisiológicas e bioquímicas do organismo e, conseqüentemente, interferem no desempenho ecológico das espécies (KAMALJIT et al., 1991).

A diversidade genética pode se manifestar em quatro níveis de organização: entre espécies, entre populações, dentro das populações e dentro dos indivíduos (HUNTER, 1996). Esta diversidade pode ser detectada e avaliada através de diferentes abordagens. Uma delas é a abordagem molecular, que envolve a análise das alterações na estrutura da molécula de DNA ou de proteínas codificadas por genes específicos (KAMALJIT et al., 1991).

Atualmente existem várias técnicas moleculares, que são freqüentemente utilizadas com objetivos ecológicos. Para um número elevado de organismos, a análise do polimorfismo de tamanho em fragmentos de restrição (RFLP) pode ser utilizada na avaliação da diversidade genética. Esta técnica se baseia no fato de que uma seqüência

específica de DNA apresenta um número único de sítios de restrição reconhecidos por determinada enzima de restrição. Os fragmentos de DNA, gerados pela enzima ou enzimas de restrição, podem ser separados por eletroforese, produzindo um padrão de bandas, característico para cada espécie. Qualquer mutação pontual num sítio de restrição ou outras modificações na seqüências de DNA, como inserções ou deleções, mudarão o padrão de restrição gerado pela enzima. O RFLP é um procedimento interessante para caracterizar e identificar genótipos fúngicos (MARMESSE, 1993).

Os FMA não são suscetíveis de cultivo em meios laboratoriais sendo, portanto, difícil a obtenção de quantidades de DNA suficiente 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, devem ser previamente sujeitas à reação da polimerase em cadeia (PCR).

A técnica denominada PCR foi criada por KARY MULLIS, em 1987, e descrita por SAIKI et al. (1988). Através desta técnica se amplificou um segmento de DNA, situado entre duas regiões de seqüências conhecidas. As amplificações foram realizadas a partir de dois oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*, que se ligaram a sítios opostos de uma seqüência específica de DNA dupla fita e de uma DNA polimerase termoestável, que catalisou a reação de polimerização de novas fitas. Os *primers* foram orientados de modo que a síntese de DNA ocorreu na região compreendida entre os mesmos.

Os ciclos de amplificação de DNA compreendem a desnaturação do DNA-molde, o pareamento dos *primers* aos sítios que lhes são homólogos no DNA e a síntese ou a polimerização dos fragmentos de DNA. Estes ciclos são repetidos várias vezes e permitem a amplificação exponencial do fragmento de DNA, que é, posteriormente, analisado eletroforeticamente (WHITE et al., 1990). LEE et al. (1990), assim como, SANDER et al. (1995), utilizando a técnica do PCR, amplificaram certas seqüências de DNA a partir de pequenas quantidades de amostras, tal como um único esporo de FMA.

Os primeiros a utilizar o PCR nos fungos micorrízicos arbusculares foram SIMON et al. (1992a, 1992b) com o objetivo de obter inicialmente o seqüenciamento dos genes nucleares que codificam para o RNA ribossômico 17S. Este seqüenciamento permitiu posteriormente o desenvolvimento de um *primer* específico para os FMA

(VAN S₁), que possibilitou a ampliação do rDNA dos FMAs a partir de uma mistura de plantas e outros fungos.

O DNA ribossômico tem sido utilizado freqüentemente em estudos taxonômicos e filogenéticos dos fungos. Na maioria dos eucariontes, o rDNA apresenta-se como um arranjo repetitivo de três dos quatro genes que codificam para os diferentes RNA ribossômicos. Os genes que codificam para as subunidades 17 S, 5.8 S e 25 S estão separados entre si por seqüências espaçadoras transcritas (ITS), e as unidades repetitivas, constituídas pelos três genes, estão separadas por regiões espaçadoras não transcritas (IGS). A ordem dos genes parece ser conservada em todos os organismos com exceção do gene que codifica para a subunidade 5 S que, dependendo do organismo, pode ou não estar localizado dentro desta unidade repetitiva. As regiões gênicas de rDNA são altamente conservadas; já os espaçadores, particularmente o espaçador intergênico (IGS), pode variar de forma significativa até mesmo a nível intra-específico (BRUNS et al., 1991).

O DNA ribossômico nuclear 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 a nível molecular. Uma delas, é que nos fungos, esta região, que compreende entre 600 a 800 pares de bases, é facilmente amplificada, utilizando os *primers* universais, os quais são complementares às seqüências altamente conservadas dos genes 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).

Nos fungos micorrízicos arbusculares foram realizadas poucas análises de restrição da região ITS a partir de isolados de espécies definidas; portanto, a diversidade genética a nível de família, gênero e espécies ainda não foi convenientemente esclarecida (REDECKER et al., 1997). Uma das dificuldades em utilizar esta região para fins de identificação nos FMA reside no fato de que a região ITS apresenta um alto polimorfismo mesmo dentro de um único esporo. Este polimorfismo pode ser o

resultado da presença de diferentes genótipos em diferentes núcleos do mesmo esporo (esporos heterocarióticos) (SANDERS et al., 1995; HOSNY et al., 1996).

2.5 - AS DUNAS COMO ECOSSISTEMA MODELO PARA ESTUDOS DE BIODIVERSIDADE.

As dunas formam um ecossistema sujeito a alta salinidade, fortes ventos, seca, baixas concentrações de nutrientes e altas temperaturas, entre outros, constituindo, assim, um ambiente restritivo para a grande maioria dos organismos vivos. No que se refere às dunas, então, a densidade e a diversidade da microbiota do solo, assim como a dos FMA, são relativamente baixas e, conseqüentemente, as interações bióticas simplificadas. Além desta característica, as dunas apresentam todos os estágios sucessionais, ocorrendo simultaneamente, resultante do processo contínuo de formação deste sistema (WATKINSON et al., 1979). Por todas estas razões, as dunas constituem um ecossistema modelo para a realização de diversas pesquisas ecológicas, inerentes aos estudos sucessionais e de estabilização.

Existem três tipos de dunas, quanto à mobilidade do substrato e à cobertura vegetal: as ante-dunas que possuem uma cobertura vegetal esparsa ou ausente, deixando o substrato sujeito aos ventos e, geralmente, encontram-se mais próximas da orla marítima; as dunas semi-fixas, por outro lado, que se caracterizam pela presença de várias espécies vegetais, especialmente plantas de hábitos rasteiros, que dificultam o deslocamento de areia e, por último, as dunas fixas onde o solo se encontra totalmente recoberto de plantas (RIZZINI, 1979).

Extensas áreas da costa marítima brasileira são ocupadas por dunas. No estado de Santa Catarina, este sistema compreende cerca de 258km² o que corresponde a 0,3% da área total do Estado (RIZZINI, 1979). Um dos problemas que vem ocorrendo nas regiões de dunas não estabilizadas é a incursão de areia nas rodovias, construções e terras agrícolas ao ponto de serem necessárias a restauração e a estabilização deste sistema. A estabilização das dunas de Cape Cod, Massachussets, nos Estados Unidos, tem sido uma preocupação constante para seus habitantes. Estas dunas antes da chegada dos colonizadores apresentavam uma vegetação florestal. A destruição desta vegetação,

provocada pela ação do homem e prejudicada pela entrada de animais nas pastagens, resultou na transformação da região em área de dunas móveis. Estas dunas vêm sendo estabilizadas através da revegetação com plantas com micorrizas (KOSKE & GEMMA, 1997). Outro problema que ameaça as costas marítimas em diversas regiões, inclusive no Brasil, é a erosão causada pelo movimento das ondas e pelas modificações do nível do mar. Em ambos os casos, a vegetação rasteira das ante-dunas desempenha um papel fundamental na integridade geomorfológica da costa e funciona como uma barreira dinâmica contra a ação das ressacas e dos ventos (DUPONT & ADDAD, 1997).

Programas de estabilização de dunas vêm sendo empreendidos em diferentes partes do mundo, utilizando-se a revegetação como estratégia de estabilização. SALMERON (1967) publicou um resumo das técnicas de fixação de dunas, utilizadas em diversos países do mundo, além de definir as características das plantas a serem utilizadas na revegetação. A grande maioria destes programas, no entanto, não considera o papel dos FMA no estabelecimento de plantas pioneiras, na composição vegetal e no progresso da sucessão (KOSKE & POLSON, 1984).

Os FMA tem um papel indireto na estabilização das dunas através da melhoria na nutrição das plantas e, diretamente, pela retenção das partículas do solo pelo emaranhado de hifas do micélio extra-radicular, ocorrendo, assim, uma modificação da estrutura do solo benéfica ao estabelecimento de diversas plantas. Os agregados são também mais resistentes à ação dos ventos, proporcionando uma maior estabilidade às dunas (KOSKE et al., 1975; SUTTON et al., 1976).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - CARACTERÍSTICAS DO LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi conduzido no mês de Fevereiro de 1997, na praia da Joaquina, situada na Ilha de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil ($27^{\circ} 50'S$ e $48^{\circ} 34'W$). A região litoral da Ilha de Santa Catarina, assim como todo o litoral catarinense, é coberto 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 $20^{\circ}C$. As chuvas estão distribuídas uniformemente durante o ano. Os ventos predominantes são dos quadrantes NE e N, com vento sul, geralmente, determinando mudanças de temperaturas.

Para realizar a coleta das amostras de solo, foram escolhidos três lotes em dunas, com aproximadamente 700 m^2 , com níveis crescentes de estabilização, e que foram denominados ante-duna, duna semi-fixa e duna fixa. Estes lotes, representando os três estágios de estabilização, encontravam-se em uma única direção no sentido da costa para o interior da ilha. O primeiro, na ante-duna ($27^{\circ}37'54,3''S$ e $48^{\circ}27'07,7''W$), foi considerado o ponto de referência 0. A duna semi-fixa ($27^{\circ}37'52,6''S$ e $48^{\circ}27'07,5''W$) e a duna fixa ($27^{\circ}37'45,0''S$ e $48^{\circ}27'29,6''W$) encontravam-se, respectivamente, a uma distância de 40 e 650 metros, 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 metros. Para as medições nas dunas da Joaquina, por se tratar de uma área livre, portanto, suscetível de capturar o sinal de vários satélites, o erro de medição poderá ser inferior a 30 metros.

A partir das amostras dos três lotes foram efetuadas a análise química, a granulométrica e a classificação textural dos solos dos três tipos de dunas. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Solos Viçosa Ltda, Viçosa, MG. Os resultados estão apresentados na tabela 1.

TABELA 1 - Características químicas e físicas de amostras de solo dos três lotes de coleta nas dunas.

Características	Ante-Duna	Duna Sem-Fixa	Duna Fixa
Na (mg/dm ³)	2,0	4,0	9,0 ^l
PH	6,1	6,0	5,9 ^l
P (mg/dm ³)	5,0	8,0	11,0 ^l
K (mg/dm ³)	4,0	14,0	20,0 ^l
Ca (m mol _e /dm ³)	0,0	0,0	0,0
Mg (m mol _e /dm ³)	0,0	1,0	4,0 ^l
Al (m mol _e /dm ³)	0,0	0,0	0,0
H+Al (m mol _e /dm ³)	7,6	8,5	7,6 ^l
CTC (m mol _e /dm ³)	7,7	10,1	12,1 ^l
V (%)	1	15	37 ^l
m (%)	0	0	0
M.O. (g/Kg)	4,0	8,1	10,7 ^l
Argila (g/Kg)	20	10	30 ^l
Siite (g/Kg)	40	20	60 ^l
Areia Grossa (g/Kg)	890	910	720 ^l
Areia Fina (g/Kg)	50	60	190
Classificação Textural	Areia	areia	areia

Al³⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ extraídos com KCl 1 N; P e K extraídos com extrator biácido (HCl e H₂SO₄);

m = valor da saturação de alumínio; pH em H₂O 1:2,5; M.O. método de Walkley e Black.

v = volume de saturação de bases

3.2 - AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE A NÍVEL DE FAMÍLIAS E ESPÉCIES DOS FMA APÓS COLETA DE ESPOROS - MÉTODOS DIRETOS

3.2.1 - COLETA, IDENTIFICAÇÃO DAS FAMÍLIAS E ESPÉCIES

Em cada duna foram coletadas, em fevereiro de 1997, dez amostras de aproximadamente 1,5L de solo junto à raiz de diversas plantas nativas em dez pontos definidos aleatoriamente no lote. As amostras de solo de cada lote foram homogeneizadas e destas, seis subamostras de 100g foram retiradas para a recuperação, tipagem, identificação taxonômica e contagem dos esporos dos FMA. Os esporos foram recuperados, utilizando-se a técnica modificada de decantamento e peneiramento úmido de GEDERMANN & NICOLSON (1963). Cada amostra de 100g de solo de cada lote, foi colocada dentro de um balde com aproximadamente 5L de água. A mistura de areia e água foi agitada vigorosamente com a mão por 10 segundos, deixando-se decantar pelo mesmo período de tempo. Imediatamente após a decantação, a suspensão foi vertida sobre duas peneiras sobrepostas com poros de 0.297 mm e de 0.053 mm. Os materiais retidos nas peneiras foram recolhidos em bequeres. Para a separação dos esporos da matéria orgânica utilizou-se a técnica de centrifugação em gradiente de sacarose conforme procedimento de JENKINS (1964), citado por SCHENK (1982), com algumas modificações. A primeira etapa da centrifugação foi realizada a 2000g durante 14 minutos, tendo sido subsequente descartados os sobrenadantes e os sedimentos ressuspensos em uma solução de sacarose 50%. A segunda centrifugação foi feita na mesma velocidade durante 5 minutos. O sobrenadante foi vertido em peneira com porosidade de 0.053 mm e os esporos lavados com pisseta com água destilada de forma a eliminar a sacarose. 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. Para a identificação dos esporos foram preparadas lâminas diagnósticas. Estas lâminas foram montadas em PVLG (1.66g de álcool polivinil, 10 ml de água, 10ml de ácido láctico, 1ml de glicerina) e reagente de Melzer

(100g de cloro hidratado, 1.5g de iodo, 5g de iodeto de potássio, 100ml de água destilada). Para o preparo das lâminas diagnóstico foi colocada uma gota de cada meio de montagem, junto com aproximadamente vinte esporos da espécie a ser identificada. A lâminula foi colocada após cinco minutos. Este período de tempo foi suficiente para aumentar a viscosidade do meio de montagem em contato com o ar e para posicionar os esporos no centro de cada gota de modo a evidenciar os caracteres desejáveis. Após a colocação da lâminula, as paredes dos esporos foram quebradas suavemente pela compressão da lâminula. A preparação foi, em seguida, colocada por algumas horas em uma superfície plana e as extremidades da lâminula foram seladas. A identificação das espécies foi efetuada de acordo com a classificação proposta por MORTON & BENNY (1990). As espécies não identificadas foram enviadas em *Vouchers* para o INVAM (International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi) na West Virginia University, Estados Unidos.

3.2.2 - ABUNDÂNCIA E RIQUEZA

Após a identificação taxonômica e a contagem das diferentes espécies de FMA associadas às plantas nativas de dunas nos três estágios de estabilização, foi calculada a média do número de esporos de cada espécie presente nas seis subamostras, para cada estágio de estabilização das dunas. Utilizando-se estes resultados, foram calculadas as médias de abundância para cada duna e feitas várias análises referentes às distribuições das diversas espécies e famílias de FMA em cada um dos estágios de estabilização das dunas.

Após a abundância, foi calculada a riqueza, isto é, o número de espécies presentes em cada amostra de cada tipo de duna. Outro parâmetro foi o da abundância relativa, que se calculou utilizando a média de ocorrência das espécies, que é o percentual do número de indivíduos de cada espécie em relação ao total de indivíduos. Entre os índices de riqueza, além da riqueza específica, foi utilizado o índice de Margalef. Este índice foi calculado através da seguinte fórmula:

$$D_{Mg} = \frac{S - 1}{\ln N}$$

onde S - é a riqueza ou número total de espécies;

N - número total de indivíduos presentes na amostra;

\ln - logaritmo natural.

3.2.3 - MODELOS DE ABUNDÂNCIA

Uma vez conhecidas a riqueza e a abundância relativa foram obtidas as curvas do Componente Dominância da Diversidade. Para tal, a abundância relativa das espécies de FMA de cada duna foi plotada em ordem decrescente em escala logarítmica. As curvas obtidas nestas plotagens foram ajustadas matematicamente a três modelos de distribuição da abundância de acordo com MAGURRAN (1988). Os ajustes foram em relação à série geométrica, à série log e ao modelo *broken stick*. As distribuições da abundância das espécies de FMA nas três dunas não foram ajustados à distribuição log normal, já que, de acordo com MAGURRAN (1998), esta distribuição se aplica a conjuntos com grande número de espécies, o que não acontece com os FMA nas dunas.

3.2.3 - ÍNDICES

Com o objetivo de avaliar a diversidade nos três estágios de estabilização, foram utilizados os diversos índices de diversidade, dominância e equitatividade.

No que se refere aos índices de heterogeneidade, foram utilizados os índices de Shannon e de Simpson e, a partir destes índices de diversidade, calcularam-se os respectivos índices de uniformidade ou equitatividade.

O índice de Shannon (H) foi calculado através da seguinte fórmula:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i)$$

onde S - é a riqueza ou número total de espécies;

n_i - número de indivíduos na i -ésima espécie;

$p_i = \frac{n_i}{N}$ - abundância relativa da i -ésima espécie;

\ln - logaritmo natural .

O índice de diversidade de Simpson foi calculado pelas seguintes fórmulas:

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S (p_i)^2 \quad \text{ou} \quad D' = \frac{1}{\sum_{i=1}^S (p_i)^2}$$

Para expressar o índice de Simpson foram utilizadas as duas formas D e D' . A diferença é fundamentalmente em nível de escala, já que D e D' são funções que dependem da soma dos quadrados dos P_i 's cujos valores variam respectivamente nos intervalos de 0 a 1 e de 1 a ∞ .

onde S - é a riqueza ou número total de espécies;

N - número total de indivíduos;

n_i - número de indivíduos na i -ésima espécie;

$p_i = \frac{n_i}{N}$ - abundância relativa da i -ésima espécie;

\ln - logaritmo natural .

O índice de equitatividade de Simpson E ou E' e o índice de equitatividade de Shannon J foram calculados pelas seguintes fórmulas:

$$E = \frac{D}{(1-1/S)}, \quad E' = \frac{D'}{S} \quad \text{e} \quad J = \frac{H}{\ln S}.$$

3.3 - AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE ESPECÍFICA POR MÉTODOS INDIRETOS

3.3.1 – RIQUEZA APÓS CULTURA ARMADILHA

Com o objetivo de avaliar a diversidade específica nos três estágios de dunas por métodos indiretos, foram estabelecidos dois ciclos de culturas armadilhas. Parte do solo coletado a campo foi utilizado para o estabelecimento destas culturas, de acordo com o procedimento de MORTON et al. (1993). O solo de cada tipo de duna foi misturado com areia grossa, previamente lavada e esterilizada em autoclave durante uma hora, a 121^oC e 1 atmosfera de pressão, numa proporção de 1:1 (v/v), colocado em vasos de 1000 ml e semeado com 40-50 sementes de sorgo (*Sorghum bicolor*). As sementes utilizadas foram previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio 20% durante 30 minutos. Para cada tipo de duna foram estabelecidas três culturas armadilhas que permaneceram na casa-de-vegetação por 4 meses (primeiro ciclo de cultura-armadilha) com regas periódicas. Após este período, 2 amostras de solo foram retiradas de cada vaso para recuperação, contagem e identificação taxonômica de FMA a partir dos esporos. O solo restante foi seco *in situ* por 2-3 semanas e reutilizado para o estabelecimento do segundo ciclo de culturas-armadilhas, após o qual novas contagens de esporos e identificação de espécies foram realizadas.

Os resultados da identificação e das contagens dos esporos de FMA de cada espécie em cada ciclo de cultura-armadilha foram somados aos dados obtidos por coleta direta de esporos. Com estes valores foi obtida a riqueza específica MORTON (1995).

3.3.2 - ABUNDÂNCIA AVALIADA POR MEIO DE BIOENSAIO

Antes de estabelecer o bioensaio, sementes de milho previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio 20% durante 60 minutos foram germinadas em substrato de areia grossa esterilizada. Estas plantas foram, então, cultivadas dentro de um vaso de 500 ml, contendo areia autoclavada e solo de duna 1:1 (v/v). Para cada tipo de duna, foram estabelecidas quinze repetições. Após vinte, trinta e quarenta dias do plantio, em casa de vegetação, foram coletadas cinco plantas de cada tipo de duna, em cada período. No laboratório, as raízes foram cuidadosamente lavadas e submetidas à descoloração e à subsequente coloração pelo método de KOSKE & GEMMA (1989). De acordo com este método, as raízes foram colocadas para descoloração dentro de tubos de vidros, contendo uma solução de KOH 10% (p/v) e aquecidas em banho-maria a 90°C, por quarenta minutos. Em seguida, o material foi lavado em água corrente e imerso em solução alcalina (H₂O₂ 3% : NH₄OH 20%) por 10-30 minutos. Decorrido este tempo, as amostras foram novamente lavadas em água corrente e colocadas em solução HCl 1% por 5 minutos e coloridas em azul de tripan 0.05%, em solução de glicerol, sob aquecimento a 90°C. Após a coloração, as raízes foram armazenadas em vidros contendo solução de glicerol e HCl 0,1%, na relação de 1:1 (v/v).

A percentagem de colonização do sistema radicular foi determinada pelo método proposto por GIOVANNETTI & MOSSE (1980), denominado Método de Interseção de Linhas (*Gridline Intersect Method*). A presença ou ausência de estruturas fúngicas (hifas, vesículas, arbúsculos e esporos) no córtex da raiz foi anotada, sob estereomicroscópio (Nikon, modelo CELM), com aumento de 40 vezes. Foram avaliados 200 pontos de interseção em cada amostra de raiz para a obtenção dos valores médios de colonização. Para cada interseção, o número de pontos com a presença de

qualquer uma das estruturas fúngicas mencionadas foi contado como positivo e o número de pontos sem estas estruturas contado como negativo.

Foram comparadas as médias do número de pontos com raízes colonizadas de cada tipo de duna, para os diferentes períodos de tempos de coleta, isto é, 20, 30, 40 dias após plantio. Também foram comparadas as médias dos três tipos de dunas para cada plantio. Os dados obtidos foram analisados pela Análise da Variância utilizando-se o teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa estatístico STATGRAPHICS (Statistical Graphics Corp).

3.4 - DIVERSIDADE GENÉTICA

3.4.1 - EXTRAÇÃO DE DNA

Para a obtenção de esporos e a subsequente extração de DNA, foram utilizadas amostras de 100g de solo provenientes da duna semi fixa e da duna fixa e de 500g da ante-duna. Esta diferença foi devida à necessidade de se aproximar o número de esporos entre as amostras (aproximadamente 100). Os esporos para este objetivo foram recuperados pela técnica de peneiragem e decantamento úmido e posterior centrifugação em gradiente de sacarose, de acordo com GEDERMANN & NICOLSON (1963).

A extração de DNA dos esporos de FMA foi feita, seguindo-se o protocolo de extração de ZÉZÉ (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 (50 mM Tris/ HCl pH 7.5; 3mM EDTA; 50mM MgCl₂; 50mM Na Cl; 10 mM β- mercapto etanol) e centrifugados a 12000g por 20 segundos. O sedimento resultante foi ressuspensionado em 200µl da mesma solução tampão A. Dentro de um Eppendorf de 1.5 ml, os esporos foram quebrados com um micropistilo e centrifugados

a 12000g durante 20 segundos. O sobrenadante e o sedimento foram separados e o último ressuspendido em 200µl de solução tampão B (50 mM Tris/ Cl; 25mM EDTA; 2% SDS; 1% N-Lauryl-sarcocinato; 1mg/ml proteinase K; 10mM β- mercapto etanol; 10µg/ml Rnase). Ambos, sedimento e sobrenadante (para alguns fungos micorrízicos o sobrenadante pode ser utilizado), foram incubados a 65° C por 30 minutos. Após a incubação, foram centrifugados durante 5 minutos a 12000g. Os sedimentos resultantes foram ressuspendidos em 200µl de solução tampão B (os 2 sobrenadantes foram conservados) e a eles acrescentado 0.4 vol.5M de acetato de potássio. Após este último procedimento, os 4 Eppendorfs foram incubados no gelo durante 15 minutos e logo depois centrifugados a 12000g por 15 minutos. As proteínas foram desnaturadas e removidas, extraíndo subsequêntemente os sobrenadantes com 200µl fenol/clorofórmio /Álcool isoanílico (IAA) (49/49/2) cada vez. Aos sobrenadantes resultantes foram acrescentados 1/10 vol. de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol frio e, então, armazenados no freezer a -20° C ,pelo menos, por duas horas (ou mais). Após este tempo, foram centrifugados a 12000g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o sedimento secado numa estufa a vácuo durante alguns minutos. Nos casos em que não ficaram totalmente secos, foi dado um pulso na centrífuga e extraído cuidadosamente o líquido com ajuda de uma micropipeta e levado novamente à estufa a vácuo. Uma vez seco, o sedimento foi ressuspendido em 20µl de solução tampão TE (Tris-HCL, pH 8.0 10mM; EDTA, pH 8.0 1mM).

3.4.2 - PREPARAÇÃO GEL DE ELETROFORESE DE DNA

Antes de proceder com o PCR, foi estimada a quantidade do DNA total, pela comparação com um padrão de DNA de quantidade conhecida, o que foi realizado por meio de eletroforese em gel de agarose 0.8%. Na preparação do gel, 0.8 gramas de agarose foram dissolvidos em 100ml de solução tampão TEB (Trizma base 0.89 M, ácido bórico 0.89M e EDTA 20 mM) 0.5X. A mistura foi levada em forno de microondas por 2 minutos para dissolver a agarose até ser obtida uma solução clara, transparente. Após esfriamento, foi adicionado à mistura 2µl de brometo de etídeo

(concentração: 10mg/ml) depois vertida numa placa de acrílico de 12.5 x 12.5 cm, na qual foi posicionada previamente com o auxílio de garras um pente de 15 dentes. A posição do pente ficou a 3.0 mm acima da base da placa. Após o gel solidificar à temperatura ambiente, o pente foi cuidadosamente removido. Em seguida, transferiu-se o gel para uma cuba horizontal, na qual foi submerso em solução tampão TEB 0.5X. Três microlitros da preparação de DNA foram misturados a 3µl de solução tampão, contendo 0,25% de azul de bromofenol e 60 % de glicerol. em TEB 1X. Esta mistura foi aplicada no gel. A corrida eletroforética foi de aproximadamente duas horas a 60 volts (SAMBROOK, FRITSCCH & MANIATIS, 1989). O DNA do fago λ, clivado com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Hind* III, foi utilizado como padrão de tamanho de bandas. Terminada a eletroforese, o gel foi visualizado em transluminador de luz UV e fotografado com câmara polaroid MP-4, utilizando-se filme polaroid 667.

3.4.3 - PURIFICAÇÃO DO DNA

Devido às dificuldades na amplificação do DNA (PCR), foi necessário proceder à purificação do DNA, obtido dos esporos de FMA. Para este procedimento, foi utilizado um produto da GIBCO BRL, "Glass MAX". Este sistema consta de uma matriz de sílica, uma solução tampão de ligação e uma solução tampão de lavagem. A purificação é realizada em três passos: ligação, lavagem e eluição. O princípio de ação deste produto baseia-se na formação de um complexo DNA-sílica, o que acontece na presença do Iodeto de sódio. Este complexo é sedimentado por meio da centrifugação, deixando as impurezas na solução, as quais são removidas com o sobrenadante. As impurezas residuais e o Iodeto de sódio são removidos pela lavagem do complexo DNA-sílica com a solução tampão de lavagem. O DNA purificado, é então, eluído com solução tampão TE. O DNA recuperado pode, então, ser utilizado para seqüenciamento, PCR, ou clonagem.

3.4.4 - METODOLOGIA UTILIZADA PARA A AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE rDNA POR PCR-FRLP

A região do DNA, que foi amplificada, corresponde à região espaçadora ITS do RNA ribossômico. Os pares de *primers*, utilizados para a amplificação desta região, foram o ITS1 e ITS4. (FIG. 1).

Para as reações de amplificação, foi preparada uma mistura de reagentes suficientes para 6 reações de PCR de acordo com WHITE (1990) e GOOSEN (1993). Esta mistura contém 30 μ l (= 300 pmol) do *primer* ITS1, 30 μ l (= 300 pmol) do *primer* ITS4, 63 μ l 0.1 mM dNTP *mix* (contendo 0.1 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 63 μ l MgCl₂ (contendo 15.0 mM), 380 μ l água milli Q, 2 μ l de DNA e 2 μ l de *Taq* DNA polimerase (10 unidades).

Desta mistura, foram transferidos 90 μ l para cada tubo e colocados num termociclador *Programmable Thermal Controller-100*, programado para 27 ciclos, sendo que cada ciclo consistiu de uma etapa de desnaturação de 30 segundos a 95^o C, uma etapa de pareamento de 30 segundos a 52^o C e uma de alongamento a 72^o C por 1.5 minutos. No primeiro ciclo, a etapa de desnaturação a 95^o C foi realizada por 3 minutos. Após o último ciclo, uma etapa de 10 minutos a 72^o C promoveu a elongação final, e a temperatura foi, então, reduzida para 4^o C e ai foi mantida até a retirada das amostras. Após concluir o PCR, amostras de DNA foram analisadas em gel de agarose 1.5%.

A precipitação do DNA foi realizada com 50 μ l da reação do PCR à qual foi acrescentada 100mM de cloreto de sódio (NaCl) e 2.5 volumes de etanol gelado (125 μ l). A amostra foi conservada a -20^o C por 48 horas, após esse tempo foi centrifugada a 12000 g durante 30 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado, e o sedimento secado em estufa e ressuspendido em 10 μ l de água. Destes 10 μ l, 3 μ l foram utilizados para testar o DNA no gel de agarose 1.5% e aos 7 μ l restantes foi adicionado 1 μ l de tampão de clivagem, 5 unidades da enzima de restrição *Hinf* I e 1 μ l de água. Os fragmentos de DNA foram, então, analisados em gel de agarose 2.0%. O tamanho dos fragmentos foram comparados com o marcador de tamanho pUC 18, clivado pelas enzimas de restrição *Rsa* I e *Hinf* I.

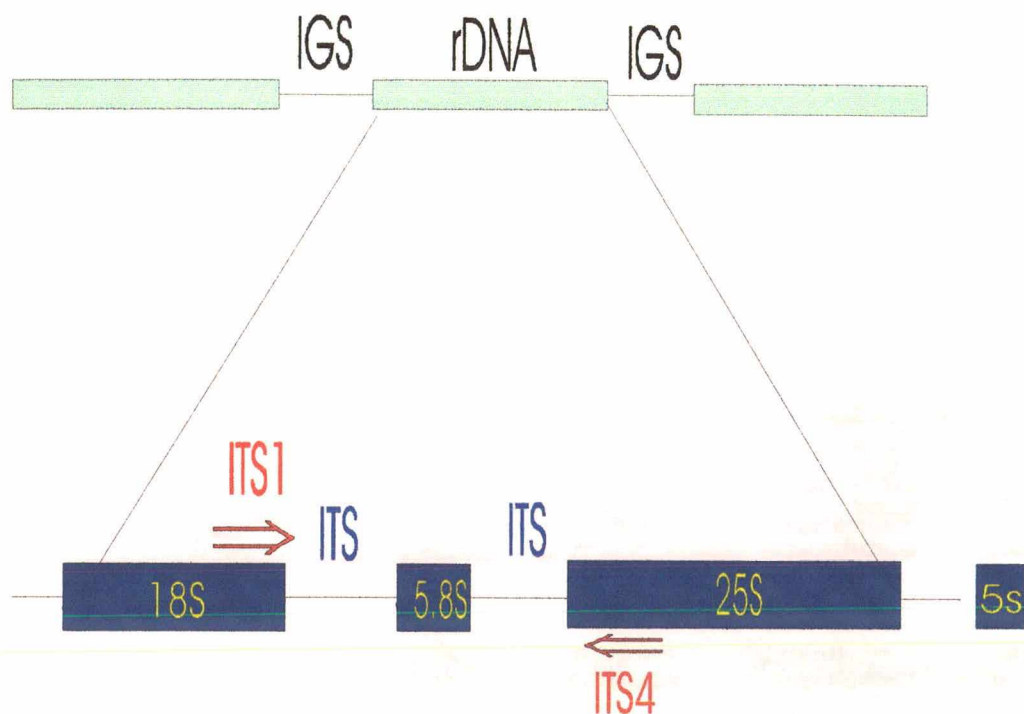


Figura 1 - Esquema do DNA ribossômico. Os retângulos representam as seqüências que codificam para as subunidades 18S, 25S, 5.8S e 5S do RNA ribossômico. As linhas na parte superior do esquema representam as seqüências intergênicas não transcritas IGS e, na parte inferior, as seqüências internas espaçadoras transcritas ITS. Os sítios de anelamento dos *primers* ITS1 e ITS4 são delineados com setas ao lado das seqüências codificadoras.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE A NÍVEL DE FAMÍLIAS E DE ESPÉCIES APÓS COLETA DIRETA DE ESPOROS

4.1.1 - COLETA, IDENTIFICAÇÃO DAS FAMÍLIAS E DAS ESPÉCIES

As famílias e espécies de FMA identificadas nos três estágios de estabilização das dunas são apresentadas na TABELA 2. De um total de treze espécies, apenas *Gigaspora albida*, *Scutellospora pellucida* e *Acaulospora sp. 2* foram observadas em todos os estágios das dunas.

Algumas espécies de FMA foram observadas em um único estágio de estabilização. *A. gerdermanii* e *S. weresubiae* ocorreram unicamente na ante-duna, enquanto que *A. scrobiculata* só ocorreu na duna semi-fixa. Já *Glomus aggregatum*, *G. occultum*, *Glomus sp (1)* e *Glomus sp (2)* foram recuperados apenas da duna fixa.

Dentre os fungos recuperados, três espécies não foram identificadas. *Acaulospora sp.2* poderá corresponder a uma nova espécie e foi anteriormente recuperada da duna semi-fixa por STÜRMER & BELLEI (1994). As espécies de *Glomus 1* e *2* não foram ainda identificadas.

Espécies de todas as famílias de FMA foram recuperadas das dunas, porém nem todos os representantes ocorreram nos três estágios de estabilização. Membros da família Glomaceae não foram recuperados da ante-duna.

TABELA 2 - Famílias e espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), recuperados nos três estágios de estabilização das dunas.

Famílias e espécies de FMA	AD	SF	DF
Acaulosporaceae			
<i>Acaulospora appendicula</i> Schenck, Spain & Sieverding		x	x
<i>Acaulospora gerdemanni</i> Schenck & Nicolson	x		
<i>Acaulospora</i> sp2 (*)	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> sp1 (**)			x
<i>Glomus</i> sp2 (**)			x

AD – Ante-Duna; SF – Duna Semi-Fixa; DF – Duna Fixa

(*) – possível espécie nova

(**) – espécies não identificadas

Na família Glomaceae, foram identificadas cinco espécies, o que correspondeu ao maior número de espécies, quando comparado com Gigasporaceae e Acaulosporaceae, que perfizeram apenas quatro espécies em cada família.

A comunidade de FMA na Praia da Joaquina, quando comparada com aquela das dunas da Costa Atlântica, na América do Norte, principalmente na ante-duna e na duna semi-fixa, apresentaram semelhanças, como indicado por STÜRMER & BELLEI (1994). Na costa Atlântica, *Gigaspora* spp. e *Scutellospora* spp predominaram, assim como *Acaulospora scrobiculata* (KOSKE, 1987). Por outro lado, a comunidade da Praia da Joaquina, quando comparada com outras dunas insulares, como as das ilhas do Hawai (KOSKE, 1988) e as das ilhas Kaua'i (KOSKE & GEMMA, 1996), apresentou diferenças marcantes. Nestas ilhas, os FMA, recuperados das dunas, foram predominantemente *Scutellospora hawaiiensis* e diversas espécies de *Glomus* não identificados.

4.1.2 – ABUNDÂNCIA E RIQUEZA

A abundância média de esporos de cada espécie de FMA nas amostras coletadas nos três estágios de estabilização é apresentada na TABELA 3. Nesta tabela é apresentada também a abundância média total (N) de esporos de cada espécie. Comparando as abundâncias médias, foi verificado que ocorreu um aumento com o estágio, sendo o valor médio de 20,5, 169,5 e 215,2 esporos em cada 100g de solo da ante-duna, da duna semi-fixa e da fixa respectivamente.

No que se refere à riqueza específica dos FMA, foi observado que este valor também aumentou com o nível de estabilização, sendo, entretanto, pequena a variação entre cada nível. Os resultados de abundância e de riqueza específica são consistentes com aqueles obtidos por KOSKE (1975) nas dunas na Austrália, onde foi observado que a abundância de esporos de FMA e a riqueza específica aumentavam com a idade e a estabilização das dunas. Paralelamente sobre as dunas de Rhode Island, nos Estados Unidos, KOSKE & HALVARSON (1981) concluíram que a abundância e a riqueza de esporos aumentou com a cobertura vegetal, característica que está relacionada com o grau de estabilidade das dunas.

O índice de Margalef, que também avalia a riqueza, evidenciou a ocorrência de uma maior diversidade na ante-duna. Este índice combina conjuntamente a riqueza e a abundância, tendo, portanto, detectado um número proporcionalmente elevado de espécies na comunidade da ante-duna, quando comparado aos outros estágios. A duna semi-fixa apresentou, de acordo com este índice, a menor diversidade.

A abundância relativa das diferentes famílias de FMA se modificou à medida que aumentou a estabilização (FIGURA 2). Na ante-duna, as espécies de Gigasporaceae representaram 78% do total das espécies identificadas. Dentro desta família, 47% dos esporos pertenceram a espécies de *Scutellospora*. Já na duna semi-fixa foram observados membros das três famílias, sendo que Acaulosporaceae foi dominante com 54% do total dos esporos recuperados. A família Gigasporaceae foi representada com 38%, e, finalmente, as Glomaceae com 8 % do total de esporos. *Acaulospora scrobiculata* dominou em relação a outras espécies com 48% de esporos recuperados. Na duna fixa, a família das Glomaceae predominou com 83% do total de

esporos. Dentre as restantes, Acaulosporaceae e Gigasporaceae contribuíram com 11% e 6% das espécies, respectivamente. Em consequência destas predominâncias, verificou-se que as espécies com esporos de maior volume predominaram na ante-duna e que espécies com esporos cada vez menores foram detectados à medida em que aumentou a estabilização.

TABELA 3 - Abundância e riqueza das espécies em cada família de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), associados às plantas nos três estágios de estabilização das dunas.

Famílias e espécies de FMA	Abundância média (***)		
	AD	SF	DF
Acaulosporaceae			
<i>Acaulospora appendicula</i> Schenck, Spain & Sieverding		8,2	6,8
<i>Acaulospora gerdemannii</i> Schenck & Nicolson	3,0		
<i>Acaulospora</i> sp2 (*)	1,5	2,2	16,3
<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe		81,2	
Gigasporaceae			
<i>Gigaspora albida</i> Schenck & Smith	6,3	50,7	10,5
<i>Scutellospora coralloidea</i> Walker & Sanders	2,8	4,7	
<i>Scutellospora pellucida</i> Nicolson & Schenck	3,3	8,5	1,8
<i>Scutellospora weresubiae</i> Koske & Walker	3,5		
Glomaceae			
<i>Glomus aggregatum</i> Schenck & Smith			8,5
<i>Glomus constrictum</i> Trappe		14,2	10,2
<i>Glomus occultum</i> Walker & Koske			14,5
<i>Glomus</i> sp1 (**)			49,0
<i>Glomus</i> sp2 (**)			97,5
Abundância média total (N)	20,4	169,7	215,1
Riqueza específica (S)	6	7	9
Índice de Margalef (D_{Mg})	1,64	1,16	1,48

AD - Ante-Duna; SF - Duna Semi-Fixa; DF - Duna Fixa

(*) - possível espécie nova

(**) - espécies não identificadas

(***) - número médio de esporos de cada espécie de FMA (média de seis subamostras)

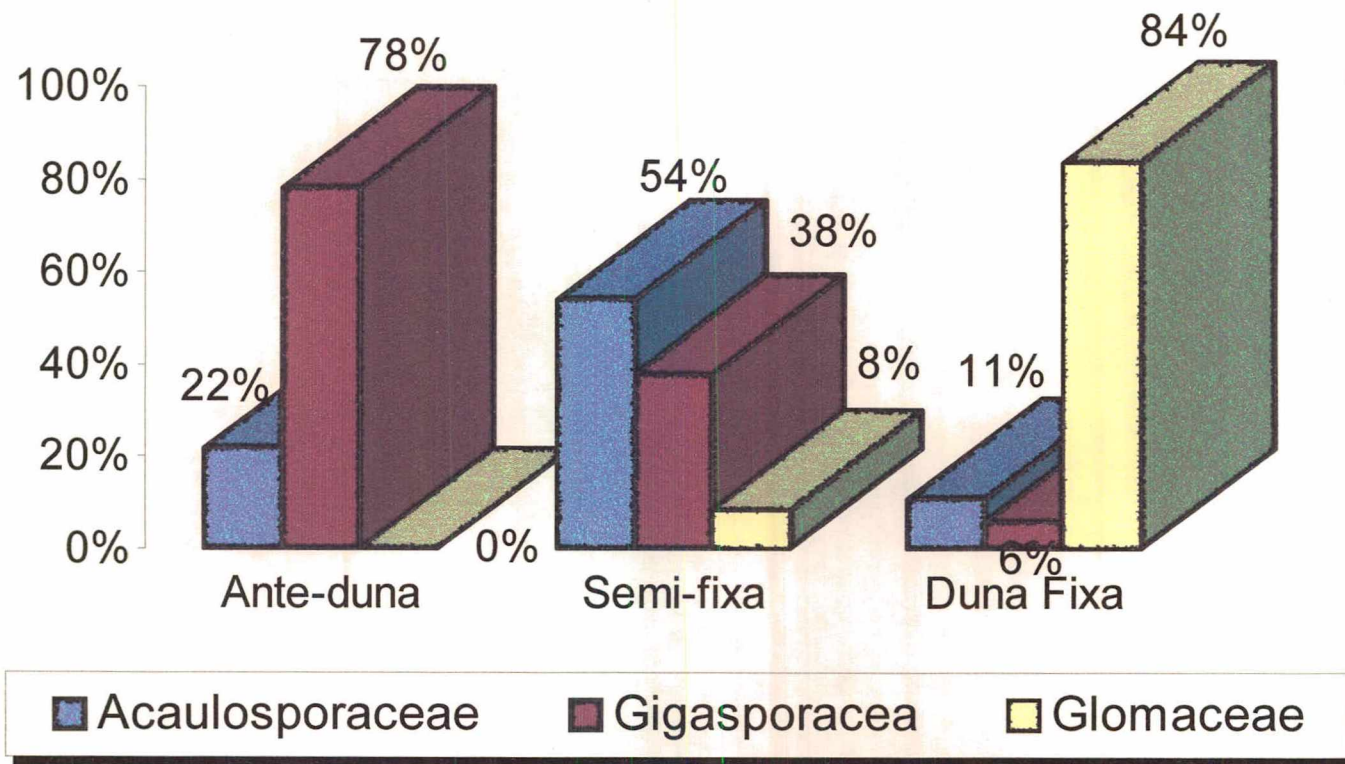


FIGURA 2 - Abundância relativa das famílias de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) nos três estágios de estabilização das dunas.

4.1.3 - MODELOS DE ABUNDÂNCIA

Os valores da abundância média e da abundância relativa para as espécies recuperadas nos diferentes estágios de estabilização das dunas são apresentados na TABELA 4. Estes valores foram ordenados em seqüência decrescente para facilitar a plotagem para a obtenção das Curvas Componentes Dominância da Diversidade. Estes valores plotados para cada espécie, por ordem decrescente, permitiram a obtenção de uma curva para cada estágio de estabilização (FIGURA 3). As probabilidades das diferentes curvas se ajustarem a três dos quatro modelos de distribuição de abundância estão apresentadas na TABELA 5, e os cálculos dos ajustes matemáticos para os diferentes modelos apresentam-se no ANEXO 3.

Na ante-duna, a distribuição da abundância das espécies se ajustou a dois modelos, *broken stick* e série geométrica. Estas distribuições foram confirmadas pelo teste χ^2 , obtendo-se uma probabilidade entre 95% a 98% para que as curvas se ajustassem ao modelo *broken stick* e 50% para a série geométrica. A curva correspondente à duna semi-fixa foi ajustada ao modelo log, dentro de uma probabilidade entre 80% a 90%, e também ao modelo *broken stick*, numa probabilidade entre 50% e 70%. Por último, a curva correspondente à duna fixa se ajustou ao modelo *broken stick* e a série log com probabilidades entre 50% a 70% e 20% a 30%, respectivamente.

Embora dentro de níveis diferentes o modelo *broken stick* foi aquele que mais se ajustou aos três estágios. De acordo com ODUM (1985), este modelo é exibido por comunidades controladas por intensa competição interespecífica. Neste caso, a estrutura das comunidades, tanto na ante-duna quanto na duna fixa, onde o modelo se ajustou preferencialmente, estariam provavelmente controladas por interações competitivas a nível de espécie. Embora a ante-duna seja o estágio que apresenta as condições mais restritivas para a maioria dos seres vivos no que se refere a salinidade, seca, ventos, baixas concentrações de nutrientes e altas temperaturas, entre outros, a estrutura da comunidade presente se ajustou à curva com pente mais suave e com a maior probabilidade de ajuste ao modelo, refletindo uma distribuição mais uniforme das espécies e uma divisão mais equitativa dos recursos. Estes resultados contradizem WHITTAKER (1965, 1970, 1972), citado por MAGURRAN (1988), que sugeriu, após

estudos a campo com comunidades vegetais, que os ecossistemas com baixo número de espécies ou, então, nos primeiros estágios de sucessão, se ajustam preferencialmente ao modelo da série geométrica. Quando a sucessão evolui, ou as condições melhoram, os estágios mais avançados tendem a se ajustar a modelos das séries log.

Dentre as três dunas, a semi-fixa apresentou a curva com pendente mais íngreme e com a maior probabilidade de ajuste ao modelo da série log. Estes resultados sugerem uma menor adaptação da comunidade de FMA às condições restritivas presentes na duna semi-fixa do que as outras comunidades, mostrando assim a predominância de uma ou duas espécies que, neste caso, foram *Acaulospora scrobiculata* e *Gigaspora albida*. Anteriormente, esta área de duna semi-fixa foi estudada por STÜRMER & BELLEI (1994), que concluíram que a distribuição das espécies foi adaptada ao modelo *broken stick*. Cabe ressaltar, porém, que este resultado se baseou na observação da curva da abundância relativa das espécies durante as quatro estações do ano, e que não foram efetuados os ajustes matemáticos aos diferentes modelos. É provável que, neste caso, uma tentativa de ajuste matemático a outros modelos tivesse identificado a série log como o modelo mais adequado devido à predominância de *Acaulospora scrobiculata*. Esta espécie representou 50.9% do total de esporos recuperados.

Nas dunas da costa Atlântica, KOSKE (1987) verificou que as comunidades de diversas regiões submetidas a um gradiente latitudinal de temperatura estavam distribuídas em curvas com pendentes mais íngremes, quando submetidas às temperaturas mais baixas. Nestas regiões uma ou poucas espécies dominavam consumindo a maioria dos recursos disponíveis. Sugeriu também que estas comunidades, submetidas a baixas temperaturas, se comportavam de forma idêntica àquelas de ambientes sujeitos a estresses intensos e contínuos tal como na duna semi-fixa.

TABELA 4 - Abundância média¹ e abundância relativa² em ordem decrescente de ocorrência, das espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) nos três estágios de estabilização das dunas.

I ANTE-DUNA		
Espécies de FMA	Abundância média	Abundância relativa (%)
1 <i>Gigaspora albida</i>	6,3	31
2 <i>Scutellospora weresubiae</i>	3,5	17
3 <i>Scutellospora pellucida</i>	3,3	16
4 <i>Acaulospora gerdemannii</i>	3,0	15
5 <i>Scutellospora coralloidea</i>	2,8	14
6 <i>Acaulospora sp2</i>	1,5	7
Total da abundância média	20,5	
II DUNA SEMI-FIXA		
Espécies de FMA	Abundância média	Abundância relativa (%)
1 <i>Acaulospora scrobiculata</i>	81,2	48
2 <i>Gigaspora albida</i>	50,7	30
3 <i>Glomus constrictum</i>	14,2	8
4 <i>Scutellospora pellucida</i>	8,5	5
5 <i>Acaulospora ap</i>	8,2	5
6 <i>Scutellospora coralloidea</i>	4,7	3
7 <i>Acaulospora sp2</i>	2,2	1
Total da abundância média	169,5	
III DUNA FIXA		
Espécies de FMA	Abundância média	Abundância relativa (%)
1 <i>Glomus sp2</i>	97,5	45
2 <i>Glomus sp1</i>	49,0	23
3 <i>Acaulospora sp2</i>	16,3	8
4 <i>Glomus ocultum</i>	14,5	7
5 <i>Gigaspora albida</i>	10,5	5
6 <i>Glomus constrictum</i>	10,2	5
7 <i>Glomus agregatum</i>	8,5	4
8 <i>Acaulospora appendicula</i>	6,8	3
9 <i>Scutellospora pellucida</i>	1,8	1
Total da abundância média	215,2	

¹) Número médio de esporos das diferentes espécies de FMA (média de seis subamostras).

²) Percentual de esporos da espécie dentro da amostra.

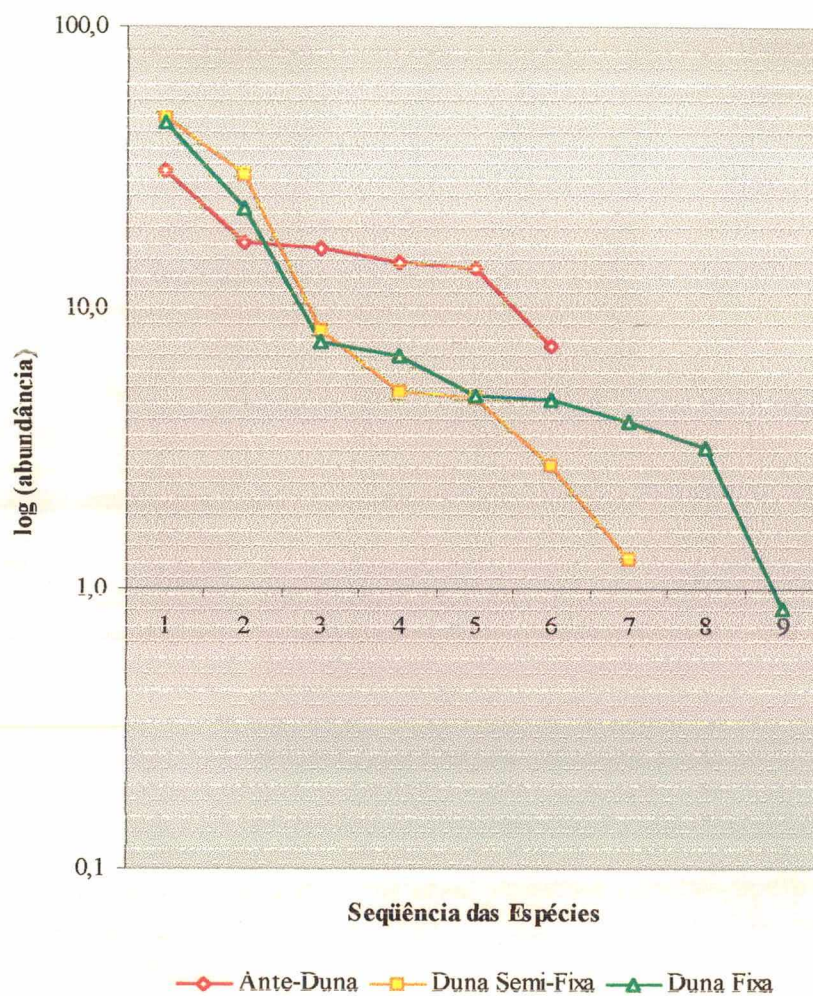


FIGURA 3 - Curva do Componente Dominância da Diversidade das espécies de fungos micorrizicos arbusculares (FMA) nos três estágios de estabilização das dunas.

TABELA 5 - Probabilidade de ajuste das Curvas do Componente Dominância da Diversidade obtidas para os três estágios de estabilização das dunas (Figura 3) aos modelos clássicos de distribuição da abundância.

	Ante-Duna	Semi-Fixa	Duna Fixa
Série Geométrica	P = 0,50	0,05 < P < 0,10	0,001 < P < 0,01
Série log	0,05 < P < 0,1	0,80 < P < 0,90	0,20 < P < 0,30
<i>Broken stick</i>	0,95 < P < 0,98	0,50 < P < 0,70	0,50 < P < 0,70

4.1.4 - ÍNDICES

A última etapa na avaliação da diversidade das espécies e das famílias de FMA, por métodos diretos, consistiu nos cálculos dos índices de heterogeneidade, relativos aos três estágios de estabilização de dunas. Os valores destes índices são apresentados na TABELA 6. Os índices de Simpson e de Shannon, assim como seus respectivos índices de uniformidade ou equitatividade e o índice de dominância de Simpson corroboraram os resultados apresentados anteriormente, os quais apontaram a maior diversidade para a comunidade de FMA na ante-duna.

A respeito das dunas da costa Atlântica, KOSKE (1987) observou que tanto as regiões, quanto as plantas, submetidas às condições mais restritivas, apresentavam o maior índice de dominância Berger-Parker, e também as curvas de distribuição apresentaram pendentes mais íngremes, de forma similar ao obtido para a duna semi-fixa.

Os valores dos diferentes índices calculados foram consistentes na identificação da ante-duna como o estágio de maior diversidade. Os resultados obtidos evidenciam a importância de se avaliar a diversidade, através de métodos que envolvam estatísticas de riqueza, curvas de abundância e índices de diversidade.

Tabela 6 - A diversidade dos três estágios de estabilização calculada através dos diversos índices de heterogeneidade .

		Ante-Duna	Semi-Fixa	Duna Fixa
Índices de heterogeneidade				
Índice de dominância de Simpson	<i>C</i>	0,20	0,33	0,27
Índice de diversidade de Simpson	<i>D</i>	0,80	0,67	0,73
	<i>D'</i>	5,08	3,02	3,64
Índice de equitatividade de Simpson	<i>E</i>	0,96	0,78	0,82
	<i>E'</i>	0,85	0,43	0,40
Índice de diversidade de Shannon	<i>H</i>	1,71	1,37	1,64
Índice de equitatividade de Shannon	<i>J</i>	0,95	0,70	0,75

4.2 - AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE ESPECÍFICA POR MEIO DE MÉTODOS INDIRETOS

4.2.1 – DIVERSIDADE APÓS CULTURAS ARMADILHAS

A diversidade específica avaliada, após estabelecimento e avaliação de esporos, recuperados em culturas armadilhas correspondentes aos três estágios, é apresentada nas TABELAS 7, 8 e 9.

Na ante-duna (TABELA 7), ocorreu um aumento da riqueza, após o segundo ciclo de cultura armadilha. *A. appendiculata* e *G. occultum* não foram detectados na coleta direta de esporos a campo, tendo, portanto, a riqueza total aumentado de 6 para 8 espécies. Já na duna semi-fixa (TABELA 8), três novas espécies, *S. scutata*, *S. hawaiiensis* e *G. etunicatum* foram recuperadas no primeiro ciclo da cultura armadilha. Neste estágio, a riqueza teve o maior aumento, com 7 e 10 espécies recuperadas entre a coleta direta e a cultura armadilha, respectivamente. No caso da duna fixa (TABELA 9), não houve aumento, quando se combinaram os dois ciclos de cultura armadilha com a coleta direta. No entanto, devido à predominância, neste estágio, de Glomaceae, que frequentemente produzem esporos de pequenas dimensões, de complexa caracterização taxonômica e intensamente hiperparasitados, pode ter ocorrido uma subestimativa das espécies de *Glomus* recuperadas.

A avaliação da diversidade dos FMA por métodos indiretos - culturas armadilhas - propiciou um acréscimo de três espécies às treze identificadas por meio da coleta direta de esporos. Foram identificadas, assim, dezesseis espécies nos diferentes estágios após combinação dos resultados das avaliações direta e indireta.

Os resultados da variação da riqueza acumulada nos três estágios, com a utilização dos diversos métodos combinados, estão apresentados na FIGURA 4. A variação da riqueza acumulada na duna semi-fixa correspondeu àquela obtida em dunas por MORTON (1995) no experimento em que combinou quatro ecossistemas e métodos combinados de avaliação. Este pesquisador, no entanto, não indicou o estágio da duna onde a avaliação foi efetuada, sendo, portanto, impossível o estabelecimento de qualquer comparação com os resultados obtidos em ambos os trabalhos.

TABELA 7 - Famílias e espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), identificadas na ante-duna por meio da coleta direta de esporos e de dois ciclos de cultura armadilha.

Famílias e espécies de FMA	Coleta Direta	Cultura Armadilha 1º Ciclo	Cultura Armadilha 2º Ciclo
Acaulosporaceae			
<i>Acaulospora appendicula</i> Schenck, Spain & Sieverding			x
<i>Acaulospora gerdemannii</i> Schenck & Nicolson	x		
<i>Acaulospora</i> sp 2 (*)	x		
<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe			
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	
<i>Scutellospora hawaiiensis</i> Koske & Gemma			
<i>Scutellospora scutata</i> Walker & Diederichs			
<i>Scutellospora weresubiae</i> Koske & Walker	x	x	x
Glomaceae			
<i>Glomus aggregatum</i> Schenck & Smith			
<i>Glomus constrictum</i> Trappe			
<i>Glomus etunicatum</i> Becker & Gerdemann			
<i>Glomus occultum</i> Walker & Koske			x
<i>Glomus</i> sp1 (**)			
<i>Glomus</i> sp2 (**)			
Total de espécies	6	4	4
Riqueza Acumulada	6	6	8

(*) – possível espécie nova

(**) – espécies não identificadas

TABELA 8 - Famílias e espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), identificadas na duna semi-fixa por meio da coleta direta de esporos e de dois ciclos de cultura armadilha.

Famílias e espécies de FMA	Coleta Direta	Cultura Armadilha 1º Ciclo	Cultura Armadilha 2º Ciclo
Acaulosporaceae			
<i>Acaulospora appendicula</i> Schenck, Spain & Sieverding	x		
<i>Acaulospora gerdemannii</i> Schenck & Nicolson			
<i>Acaulospora</i> sp 2 (*)	x		
<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe	x		
Gigasporaceae			
<i>Gigaspora albida</i> Schenck & Smith	x	x	x
<i>Scutellospora coralloidea</i> Walker & Sanders	x		
<i>Scutellospora pellucida</i> Nicolson & Schenck	x		
<i>Scutellospora hawaiiensis</i> +A18 Koske & Gemma		x	
<i>Scutellospora scutata</i> Walker & Diederichs		x	
<i>Scutellospora weresubiae</i> Koske & Walker			
Glomaceae			
<i>Glomus aggregatum</i> Schenck & Smith			
<i>Glomus constrictum</i> Trappe	x		
<i>Glomus etunicatum</i> Becker & Gerdemann		x	
<i>Glomus occultum</i> Walker & Koske			
<i>Glomus</i> sp1 (**)			
<i>Glomus</i> sp2 (**)			
Total de espécies	7	4	1
Riqueza Acumulada	7	10	10

(*) – possível espécie nova

(**) – espécies não identificadas

TABELA 9 - Famílias e espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), identificadas na duna fixa através da coleta direta de esporos e de dois ciclos de cultura armadilha.

Famílias e espécies de FMA	Coleta Direta	Cultura Armadilha 1º Ciclo	Cultura Armadilha 2º Ciclo
Acaulosporaceae			
<i>Acaulospora appendicula</i> Schenck, Spain & Sieverding	x		
<i>Acaulospora gerdemannii</i> Schenck & Nicolson			
<i>Acaulospora</i> sp 2 (*)	x		
<i>Acaulospora scrobiculata</i> Trappe			
Gigasporaceae			
<i>Gigaspora albida</i> Schenck & Smith	x	x	
<i>Scutellospora coralloidea</i> Walker & Sanders			
<i>Scutellospora pellucida</i> Nicolson & Schenck	x		
<i>Scutellospora hawaiiensis</i> Koske & Gemma			
<i>Scutellospora scutata</i> Walker & Diederichs			
<i>Scutellospora weresubiae</i> Koske & Walker			
Glomaceae			
<i>Glomus aggregatum</i> Schenck & Smith	x		
<i>Glomus constrictum</i> Trappe	x		
<i>Glomus etunicatum</i> Becker & Gerdemann			
<i>Glomus occultum</i> Walker & Koske	x		
<i>Glomus</i> sp1 (**)	x	x	x
<i>Glomus</i> sp2 (**)	x	x	x
Total de espécies	9	3	3
Riqueza Acumulada	9	9	9

(*) – possível espécie nova

(**) – espécies não identificadas

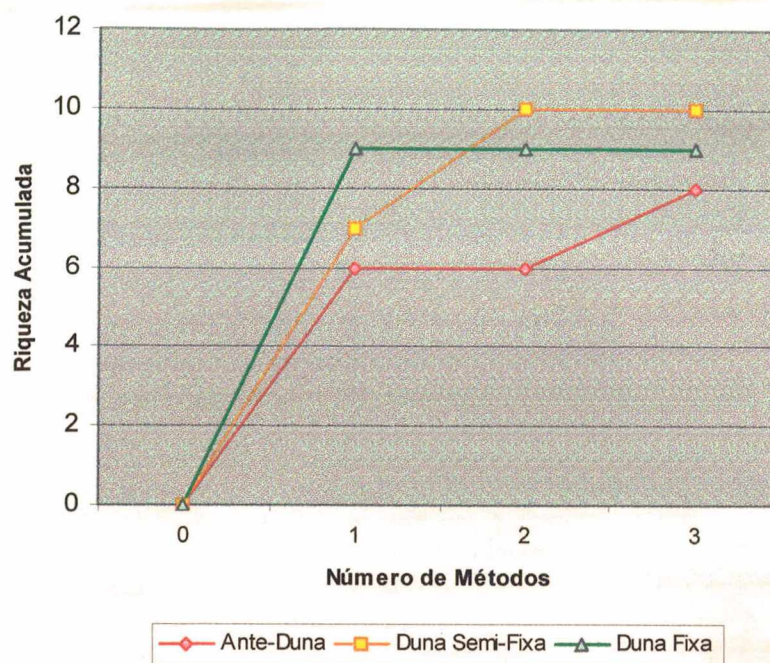


FIGURA 4 - Riqueza específica nos três estágios de estabilização, ante-duna, duna semi-fixa e duna fixa, calculada após utilização de métodos combinados. 1 - Coleta direta, 2 - Coleta direta e primeiro ciclo de cultura armadilha, 3 - Coleta direta, primeiro ciclo de cultura armadilha e segundo ciclo de cultura armadilha.

4.2.2 - ABUNDÂNCIA AVALIADA POR MEIO DE BIOENSAIO

Os resultados dos bioensaios nos diferentes estágios, obtidos ao final de 20, 30 e 40 dias após plantio, são apresentados na FIGURA 5. Os valores da porcentagem de colonização correspondem à média percentual das raízes colonizadas por FMA, nos diferentes períodos e nos diferentes estágios. Foi observado que, tanto aos 20, quanto aos 30 dias, os propágulos de FMA presentes no solo da ante-duna produziram a maior porcentagem de raízes colonizadas. Estes valores correspondem ao potencial de inóculo de uma população de esporos na ante-duna dez vezes menor do que na duna fixa. No entanto, aos 40 dias, a maior porcentagem de colonização radicular foi observada na duna fixa.

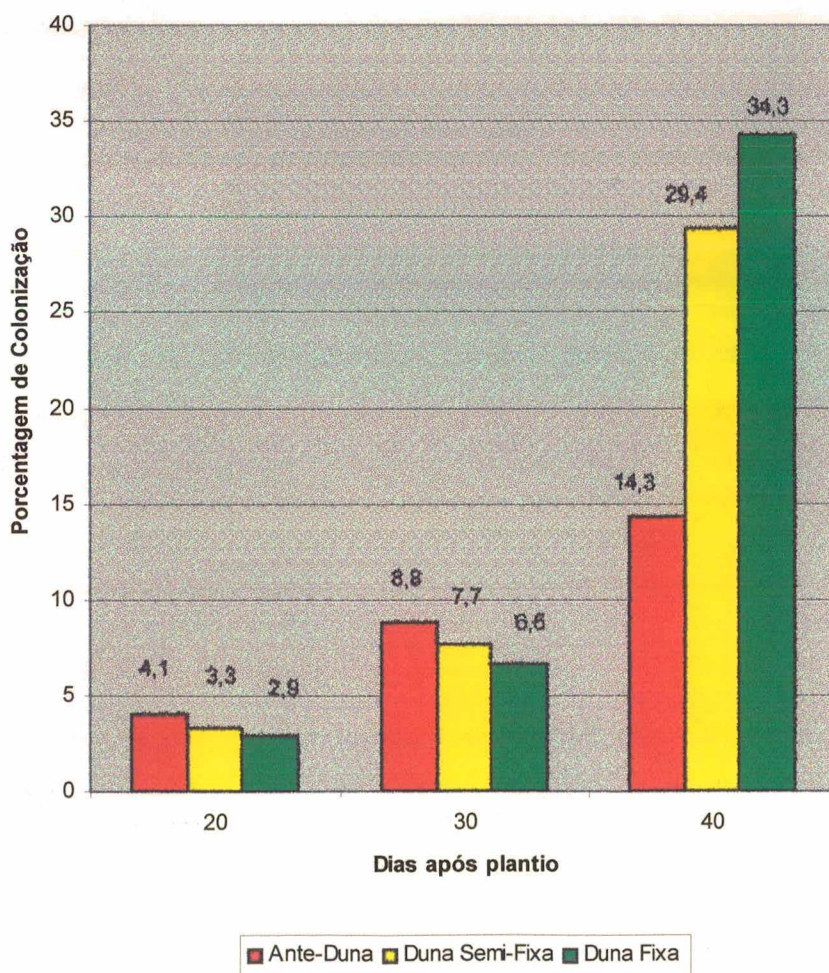


FIGURA 5 - Porcentagem de colonização radicular em raízes de milho aos 20, 30 e 40 dias após plantio.

TABELA 10 - Análise da Variância por meio do teste Tukey para as médias de colonização radicular em cada estágio de estabilização, considerando os 20, 30 e 40 dias após plantio.

Ante-Duna

Dias	Contagens	Média	HG	Contrastes	Diferença	(+/-) Limites
20	15	8,13	X	20D - 30D	*	-9,53 4,04
30	15	17,67	X	20D - 40D	*	-20,53 4,04
40	15	28,67	X	30D - 40D	*	-11,00 4,04

Duna Semi-Fixa

Dias	Contagens	Média	HG	Contrastes	Diferença	(+/-) Limites
20	15	6,53	X	20D - 30D		-8,53 9,74
30	15	15,07	X	20D - 40D	*	-52,33 9,74
40	15	58,87	X	30D - 40D	*	-43,80 9,74

Duna Fixa

Dias	Contagens	Média	HG	Contrastes	Diferença	(+/-) Limites
20	15	5,87	X	20D - 30D	*	-7,40 6,12
30	15	13,27	X	20D - 40D	*	-62,67 6,12
40	15	68,53	X	30D - 40D	*	-55,27 6,12

* - Assinala diferenças estatisticamente significativas

HG - Homogeneidade entre os grupos

Para se avaliarem diferenças significativas entre as médias de colonização radicular, foi feita a análise de variância e utilizado o Teste de Tukey. Quando foram analisadas as médias de colonização radicular para a ante-duna aos 20, 30 e 40 dias, foram observadas diferenças significativas a um nível de confiança de 95% entre as médias correspondentes aos diferentes dias após plantio. Já na duna semi-fixa, não houve diferenças significativas a um nível de confiança de 95% entre as médias de colonização radicular aos 20 e aos 30 dias. No entanto, foram detectadas diferenças significativas entre as médias correspondentes aos 30 e 40 dias. A duna fixa apresentou diferenças significativas entre as médias de colonização radicular nos três períodos de avaliação (TABELA 10).

TABELA 11 - Análise da Variância por meio do teste Tukey para as médias de colonização radicular ao final de 20, de 30 e de 40 dias em cada estágio de estabilização.

20 Dias						
Dias	Contagens	Média	HG	Contrastes	Diferença (+/-)	Limites
Ante-Duna	15	8,13	X	Ante-Duna - Duna-Fixa *	1,60	3,33
Semi-Fixa	15	6,53	X	Ante-Duna - Semi-Fixa *	2,27	3,33
Duna Fixa	15	5,87	X	Duna Fixa - Semi-Fixa *	-0,67	3,33

30 Dias						
Dias	Contagens	Média	HG	Contrastes	Diferença (+/-)	Limites
Ante-Duna	15	17,67	X	Ante-Duna - Duna-Fixa	2,60	3,41
Semi-Fixa	15	15,07	X X	Ante-Duna - Semi-Fixa *	4,40	3,41
Duna Fixa	15	13,27	X	Duna Fixa - Semi-Fixa	-1,80	3,41

40 Dias						
Dias	Contagens	Média	HG	Contrastes	Diferença (+/-)	Limites
Ante-Duna	15	28,67	X	Ante-Duna - Duna-Fixa *	-30,20	11,23
Semi-Fixa	15	58,87	X	Ante-Duna - Semi-Fixa *	-39,87	11,23
Duna Fixa	15	68,53	X	Duna Fixa - Semi-Fixa	-9,67	11,23

* - Denota diferenças estatisticamente significativas

HG – Homogeneidade entre os grupos

A análise de variância das médias de colonização radicular, correspondente a cada período entre as diferentes dunas, evidenciou que aos 20 dias não houve diferenças significativas a um nível de confiança de 95%, entre as médias de colonização radicular das dunas. Aos 30 dias, foi observada diferença significativa entre as médias de colonização radicular entre a ante-duna e a duna fixa. Por último, aos 40 dias ocorreram diferenças significativas entre a média de colonização radicular da ante-duna e as médias da duna semi-fixa e duna fixa (TABELA 11).

Em dunas no México, CORKIDI et al. (1997a) analisaram, por meio de bioensaio, o potencial de inóculo de solos proveniente dos diferentes estágios de estabilização. Concluíram que a colonização aumentou com o estágio e que, durante os primeiros dias de avaliação, não ocorreram diferenças significativas na colonização entre

os estágios. Estes pesquisadores também utilizaram milho como planta armadilha no bioensaio.

A maior taxa de colonização dos FMA foi detectada nos solos da ante-duna aos 20 dias após plantio. A predominância neste estágio de *Gigasporaceae*, que inclui espécies caracterizadas pela produção de esporos de grandes dimensões (*Giga-gigante*), com germinação rápida e por mecanismos de germinação múltipla, pode ser responsável pelos resultados. Esporos destas espécies dispõem de alto vigor e de maior capacidade de sobrevivência na ausência de raízes suscetíveis (KOSKE, 1987; SANDERS, 1997). A produção de tubos germinativos múltiplos aumenta também a probabilidade do contato entre o fungo e a raiz no solo e conseqüentemente pode conduzir a maior rapidez na colonização inicial.

Por outro lado, nas dunas fixas, a taxa de colonização ocorreu de forma progressiva, provavelmente devido à predominância de espécies da família das *Glomaceae*. A diferença na taxa de colonização entre as *Gigasporaceae* e as *Glomaceae* foi discutida por alguns pesquisadores. DANIELS (1981) realizou estudos de infectividade com culturas monoespecíficas de *Gigaspora rosea* e verificou que esse fungo produziu 250 pontos de entrada em raízes de alho-porro, após duas semanas de plantio, a partir de cultivos com 50 esporos de *G. rosea*. Já no que se refere às *Glomaceae*, STÜRMER (comunicação pessoal) observou que *Glomus etunicatum* produziu uma média de 97 pontos de entrada nas raízes das plantas armadilhas em cultura com 100 esporos. Estes exemplos mostraram uma diferença 5 vezes maior no número de pontos de colonização em cultura do mesmo gênero da espécie predominante da ante-duna na Joaquina, ou seja, *G. albida*.

A duna semi-fixa apresentou valores intermediários no que se refere a porcentagens de colonização radicular. *Acaulosporaceae*, que representam aproximadamente 54% do total de espécies, dispõem de mecanismos de dormência. Não existe, entretanto, informação se esta dormência é uma característica do gênero ou se é espécie-específica (GAZEY et al., 1993).

4.3 - AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA

Antes de proceder à avaliação da diversidade genética, foi estimada a quantidade de DNA total pela comparação com um padrão de DNA de quantidade conhecida. O DNA íntegro, não degradado, correspondente às populações de esporos de FMA da ante-duna, da duna semi-fixa e da duna fixa são mostrados na FIGURA 6. O DNA amplificado, correspondente à região ITS do rDNA das populações de FMA, nos três estágios de estabilização das dunas, é apresentado na FIGURA 7. Estes resultados mostraram a presença de diferentes regiões 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 duna semi-fixa, também foi observada a banda de aproximadamente 676 pb e foi observada, ainda, uma Segunda, de aproximadamente 500 pb. Na ante-duna, as duas bandas que foram observadas são semelhantes às da semi-fixa. No caso das espécies utilizadas como padrões, a *Gigaspora albida*, espécie comum nas três dunas, mostrou uma única banda de aproximadamente 500 pb. Este valor está de acordo com os observados por Redecker et al. (1997), para a mesma espécie. *Acaulospora scrobiculata*, espécie de FMA predominante na duna semi-fixa, apresentou uma banda de aproximadamente 600pb.

Os tamanhos aproximados dos fragmentos de restrição, gerados pela endonuclease *Hinf I*, na clivagem da região ITS do rDNA das populações de esporos nas diferentes dunas, observa-se na FIGURA 8. Estes fragmentos mostraram um perfil de banda característico para as populações de cada duna. Na ante-duna e na duna semi-fixa, observaram-se perfis de bandas semelhantes. Na ante-duna, observaram-se aproximadamente 5 fragmentos de diferentes tamanhos; já na duna semi-fixa, observaram-se aproximadamente 7. 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: foram observados 3 fragmentos, sendo que o maior deles tinha aproximadamente 241 pb.

Recentemente, Redecker et al. (1997) determinaram padrões de restrição para várias espécies de FMA, utilizando três enzimas diferentes, *Mbo I - Hinf I e TaqI*. Foram

obtidos padrões de bandas praticamente idênticos com as três enzimas para todos as espécies de *Gigaspora* testadas (*G.albida*, *G.rosea*, *G. candida*). No mesmo trabalho, foi observado que há uma estreita relação filogenética entre as espécies de *Gigaspora* e *Scutellospora* ao analisar os fragmentos de DNA de restrição, gerados por cada uma das enzimas utilizadas. Estes padrões de restrição não foram observadas com nenhuma das três enzimas, uma diferenciação clara entre os fragmentos de DNA, gerados nas espécies de *Gigaspora* e *Scutellospora* analisadas. A única espécie que mostrou um padrão de bandas diferente, quando tratada com *Hinf* I é a *Scutellospora pellucida*, espécie presente nas três dunas. Estes autores sugerem, através dos seus resultados, que as divergências dentro da seqüência ITS nos *Glomus* é maior que nas *Gigasporaceas*. No entanto, isto não foi observado na duna fixa, a qual apresentou o menor polimorfismo, embora a composição da comunidade de FMA se caracterize pela predominância de *Glomus*. É importante ressaltar, porém, que Redeckcer et al. (1997) fizeram estas observações com espécies de *Glomus* diferentes das encontradas na duna fixa.

De acordo com a técnica de PCR-FRLP do rDNA, o maior polimorfismo foi observado nas comunidades de FMA na duna semi-fixa, onde as avaliações por método direto por meio dos diferentes índices e dos modelos de abundância, mostraram a menor diversidade. Provavelmente, o caráter intermediário da composição das comunidades de FMA e da vegetação, da posição da duna e da suas características edáficas, assim como a intensidade nos fatores bióticos e abióticos, sinalizaram a necessidade de uma maior diversidade genética para a manutenção das espécies de FMA às condições desta duna.

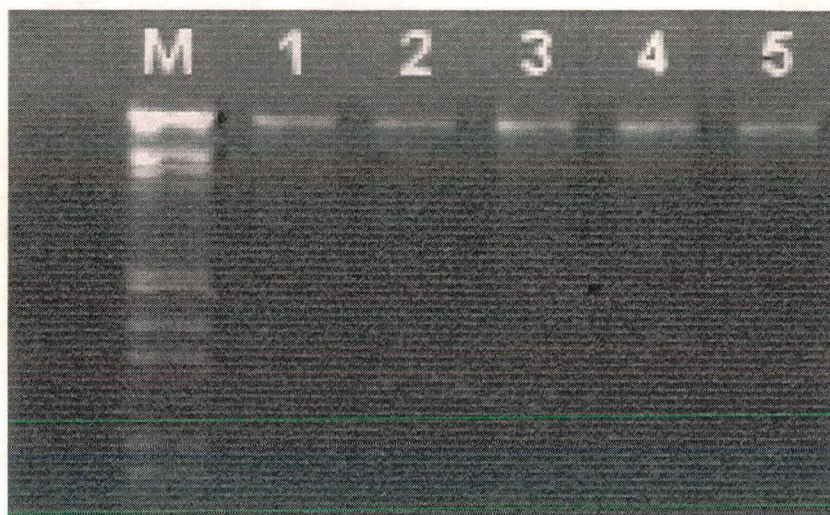


FIGURA 6 - Eletroforese em gel de agarose 0.8% do DNA total. 1-DNA total extraído de esporos de duna fixa. 2-DNA total extraído de esporos de duna semi-fixa. 3-DNA total extraído de esporos de ante-duna. 4-DNA total extraído de esporos *Gigaspora albida*. 5-DNA total extraído de esporos de *Acaulospora scrobiculata*. M, marcador de tamanho: DNA fago lambda clivado com *Hind* III / *Eco* R I.



FIGURA 7 - Eletroforese em gel de agarose 1.5% de DNA amplificado. 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 duna semi-fixa; 3 - esporos de ante-duna; 4 - *Gigaspora albida*; 5 - *Acaulospora scrobiculata*; 6 - duna fixa; 7 - semi-fixa; 8 - ante-duna; de esporos obtidos em outra época de coleta (Maio 97). 9 - *Pisolithus tinctorius* (testemunha).



FIGURA 8 - Eletroforese em gel de agarose 2% da região ITS do rDNA de populações de fungos endomicorrízicos nos três estágios de estabilização de dunas. A clivagem foi realizada com a enzima de restrição *Hinf* I. M, corresponde ao marcador pUC 18/ *RSA-Hinf* I. 1- esporos de duna fixa; 2-esporos de duna semi-fixa; 3-esporos de ante-duna; 4-*Gigaspora albida*; 5- *Acaulospora scrobiculata*; Esporos de 6-duna fixa; 7-semi-fixa; 8-ante-duna em outra época de coleta. 9-*Pisolithus tinctorius*.

5 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas avaliações da diversidade de FMA nos três estágios de estabilização de dunas permitem as seguintes conclusões:

1 - Foram identificadas 13 espécies de FMA, nos três estágios de estabilização das dunas, após coleta direta de esporos. Apenas *G. albida*, *S. pellucida*, e *Acaulospora* sp 2 estiveram presentes em todos os estágios.

2 - Espécies de todas as famílias de FMA foram recuperadas das dunas, porém nem todos os representantes das diversas famílias ocorreram nos três estágios de estabilização. Membros da família Glomaceae não foram recuperados da ante-duna.

3 - A abundância média das espécies de FMA aumentou com o estágio de estabilização, sendo o valor médio de 20,5, 169,5 e 215,2 esporos em cada 100g de solo da ante-duna, da duna semi-fixa e da fixa, respectivamente.

4 - A riqueza específica também aumentou com o nível de estabilização, sendo, entretanto, pequena a variação entre cada nível. O índice de Margalef, que avalia também a riqueza, evidenciou a ocorrência de uma maior diversidade na ante-duna. Este índice combina conjuntamente riqueza e abundância, tendo, portanto, detectado um número proporcionalmente elevado de espécies na comunidade da ante-duna.

5 - A abundância relativa das diferentes famílias de FMA se modificou à medida que aumentou a estabilização. Na ante-duna, as espécies da família Gigasporaceae representaram 78% do total das espécies identificadas. Já na duna semi-fixa, 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.

6 - Os modelos clássicos de distribuição da abundância para os três estágios de estabilização evidenciaram que a ante-duna se ajustou com maior probabilidade ao modelo *broken stick*, da mesma forma que a duna fixa. Já a duna semi-fixa se ajustou preferencialmente ao modelo da série log.

7 - Ao combinar a riqueza e a abundância relativa nas diferentes expressões matemáticas, que resultam nos diversos índices, obtiveram-se resultados que confirmaram maior diversidade para a ante-duna, resultado também obtido após análise do índice de Margalef e dos modelos de distribuição da abundância. Todos os índices de heterogeneidade calculados mostraram que a ante-duna foi o estágio de maior diversidade em contraposição à menor diversidade na duna semi-fixa.

8 - A riqueza específica nos três estágios, calculada após a utilização de métodos combinados, coleta direta de esporos e dois ciclos de culturas armadilhas, teve um acréscimo de 3 espécies. Sendo assim, foram identificadas 16 espécies de FMA, nos três estágios, quando métodos diretos e indiretos foram combinados.

9 - O bioensaio avaliado no final de 40 dias permitiu concluir que ocorreu um aumento no potencial de inoculo dos FMA com o estágio de estabilização.

10 - A avaliação da diversidade genética, por meio da técnica de PCR-FRLP do rDNA nos três estágios, indicou maior polimorfismo para a comunidade recuperada na duna semi-fixa, em contraposição com a menor diversidade específica observada, quando avaliada com os diferentes índices e modelos de distribuição da abundância.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, M.F.: Community Ecology. *In: The Ecology of Mycorrhizae*. Ed. Cambridge University Press. Cambridge. UK, 1991
- ATKINSON, T.: Exploring and exploiting biodiversity - The Conundrum. **Trends in Biotechnology** 14, p. 181-182, 1996.
- BAREA, J.M.; AZCON-AGUILAR, C.; ROLDAN-FAJARDO, B.: Avances recientes en el estudio de las micorrizas V-A. I. Formación, funcionamentos y efectos en la nutrición vegetal. **Anales de Edafología y Agrobiología**, 43, p. 659-677, 1984.
- BEGON, M.; HARPER, J.L.; TOWNSEND, C.R.: **Ecology: Individuals, populations and communities**. Sinauer Associates Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, 1986.
- BOUSSIENGUET, J.: Problems of assessment of biodiversity. *In: The biodiversity of microorganisms and invertebrates : Its roles in sustainable agriculture* . Edited by D.L. Hawksworth. Wallingford, UK: CAB International. p. 31-35, 1991.
- BRESOLIN, A.: Flora da restinga da Ilha de Santa Catarina. **Insula** 10, p. 1-54, 1979
- BRUNS, T.D.; WHITE, T.J.; TAYLOR, J.W.: Fungal molecular systematic. **Annual Review of Ecology and Systematic** 22, p. 525-564, 1991.
- BULL, A.T.: Biotechnology and Biodiversity. *In: The biodiversity of microorganisms and invertebrates: Its roles in sustainable agriculture* . Edited by D.L. Hawksworth. Wallingford. UK: CAB International, p. 203-219, 1991.
- BURTON, P.J.; BALISKY, A.C.; COWARD, L.P.; CUMMING, S.G.; KNEESHAW, D.D.: The value of managing for biodiversity. **The Forestry Chronicle** 68, p. 225-237, 1992.

- CANNON, P.F.: Strategies for rapid assessment of fungal diversity. **Biodiversity and Conservation** 6, p. 669-680, 1997.
- CORKIDI, L.; RINCÓN, E.: Arbuscular mycorrhizae in a tropical sand dune ecosystem on the Gulf of Mexico. II. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of species distributed in different early successional stages. **Mycorrhizae** 7, p. 17-23, 1997.
- DANIELS, B.A.; McCOOL, P.M.; MENGE, J.A.: Comparative inoculum potential of spores of six vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**. 81 p 385-391. 1981.
- DUPONT, H.; ADDAD, J.: Erosão costeira: a 'dança' das praias. **Ciência Hoje** 22, p. 42-51, 1997.
- DYTHAM, C.: O brave new words.... . **Nature** 379, p. 14, 1996.
- EHRlich, P.R.: Introdução. *In*: **O mecanismo da natureza. O mundo vivo a nossa volta e como funciona**. Ed. Campus. Rio de Janeiro, 1993.
- ERWIN, D.H.: The geologic history of diversity. *In*: **Biodiversity in managed landscapes: Theory and practice**. Chapter I. Ed. R.C Szaro & D.W Jhonston. Oxford University Press. New York & Oxford, p. 3-16, 1996.
- FRANCIS, R.; READ, D.J.: Direct transfer of carbon between plants connected by vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium. **Nature** 307, p. 53-56, 1984.
- GARDES, M.; BRUNS, T.D.: ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – Application to the identification of mycorrhizae and rust. **Molecular Ecology** 2, p. 113-118, 1993.
- GAZEY, C.; ABBOT, L.K. & ROBSON A.D.: VA mycorrhizal spores from three species of Acaulospora: germination, longevity and hyphal growth. **Mycological Research** 97 p. 785-790, 1993.
- GEDERMANN, J.W.; NICOLSON, T.H.: Spores of mycorrhizal *endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transaction of British Mycological Society** 80, p. 552-557, 1963.

- GIOVANETTI, M.; MOSSE, B.: An Evaluation of Techniques for Measuring Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Infection in Roots. **New Phytologist** **84**, p. 489-500, 1980.
- GOOSEN, T.: DNA Cloning. *In: Molecular biology of arbuscular mycorrhizas international workshop* - INRA-CNRS - INRA Dijon-France, 1993.
- GRIFFIN, D.H.: Chemistry of the fungal cell. *In: Fungal Physiology*. Ed. John Wiley & Sons, INC., Publication. New York. 2nd ed. p. 39-41, 1994.
- GRIME, J.P.: Biodiversity and ecosystem function: The debate deepens. **Science** **277**, p. 1260 – 1261, 1997.
- GRIME, J.P.; HILLIER, J.M.; READ, D.J.: Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. **Nature** **338**, p. 420-422, 1987.
- HARLEY, J.L.; SMITH, S.E.: **Mycorrhizal symbiosis**. Academic Press, London, UK, 1983.
- HAWKSWORTH, D.L.: The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research** **95**, p. 641-655, 1991.
- HAWKSWORTH, D.L.: Fungi and international biodiversity initiatives. **Biodiversity and Conservation** **6**, p. 661-668, 1997.
- HAWKSWORTH, D.L.; KIRK, P.M.; SUTTON, B.C.; PEGLER, D.N.: **Ainsworth & Bibby's Dictionary of the Fungi**. 8th edn. C.A.B. International Wallingford, 1995.
- HOGARTH, P.J.: Overbiodiverse ? **Nature** **364**, p. 664, 1993.
- HOOPER, D.U.; VITOUSEK, P.M.: The effect of plant composition and diversity on ecosystem processes. **Science** **277**, 1302-1305, 1997.
- HOSNY, M.; HIJRI, M.; DULIEU, H.: Molecular genetics as a unique tool for identification of biodiversity and evaluating genetics exchange within endomycorrhizal species. *In: Abstracts of the First International Conference on Mycorrhizae*, p. 63, 1996.

- HUGENHOLTZ, P.; PACE, N.R.: Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology** 14, p. 190-197, 1996.
- HUNTER, M.L.: Species diversity. *In: Fundamental of Conservation Biology*. Ed. Blackwell Science, USA, p. 32-61, 1996.
- HUSTON, M.A.: Hidden treatments in ecological experiments: re-evaluating the ecosystem function of biodiversity. **Ecologia** 110, p. 449-460, 1997.
- IWU, M.M.: Implementing the biodiversity treaty: how to make international co-operative agreement work. **Trends in Biotechnology** 14, p. 78-82, 1996.
- JANOS, D.P.: Mycorrhizae influence tropical succession. **Biotropica** 12, p. 56-64, 1980.
- KAMALJIT, B.; SCHAAL, B.; SOLBRIG, O.T.; STERNS, S.; TEMPLETON, A.; VIDA, G.: A biodiversity from the gene to the species. *In: From genes to ecosystems: A Research Agenda for Biodiversity*. Ed. O.Solbrig, USA, p. 15, 1991.
- KOSKE, R.E.: Endogone spores in Australian sand dunes. **Canadian Journal of Botany** 53, p 668-672, 1975.
- KOSKE, R.E.: Distribution of VA Mycorrhizal fungi along a latitudinal temperature gradient. **Mycologia** 79, p. 55-68, 1987.
- KOSKE, R.E.: Vesicular-arbuscular mycorrhizae of some Hawaiian dune plants. **Pacific Science** 42, p. 217-229, 1988.
- KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N.: A modified procedure for staining roots to detect VA Mycorrhizas. **Mycological Research** 92, p. 486-505, 1989.
- KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N.: Arbuscular mycorrhizal fungi in Hawaiian sand dunes: island of Kaua'i. **Pacific Science** 50, p. 30-45, 1996.
- KOSKE, R.E ; J.N. GEMMA.: Mycorrhizae and succession in planting of beachgrass in sand dunes. **American Journal of Botany** 84, p 118-130, 1997.

- KOSKE, R.E.; HALVORSON, W. L.: Ecological studies of vesicular-arbuscular mycorrhizae a in barrier sand dune. **Canadian. Journal of Botany** 59, p. 1413-1422, 1981.
- KOSKE, R. E.; POLSON, W. R.: Are VA mycorrhizae required for sand dune stabilization? **BioScience** 34, p. 420-424, 1984.
- KOSKE, R.E.; SUTTON, J.C.; SHEPPARD, B.R.: Ecology of *Endogone* in lake Huron sand dunes. **Canadian. Journal of Botany** 53(2), p. 87-93, 1975.
- LEE, S.B.; TAYLOR, J.W.: Phylogeny of five fungos- like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology of Evolution** 9, p. 636-653, 1992.
- LODGE, J.D.: Factors related to diversity of decomposer fungi in tropical forests. **Biodiversity and Conservation** 6, p. 681-688, 1997.
- MARGALEF, R.: La diversidad. In: **Ecologia**. Ediciones Omega S.A, Barcelona, España, p. 359-381, 1991.
- MAGURRAN, A.E.: **Ecological diversity and its measurement**. Ed. Princeton University Press. Princeton, New Jersey, 1988.
- MARMEESE, R.: DNA Characterization molecular biology of arbuscular mycorrhizas. International workshop - INRA-CNRS - INRA Dijon-France, p. 39, 1993.
- MITTERMEIER, R.A.; TIMOTHY, W.; AYRES, J..M.; DA FONCECA, G.: O país da megadiversidade. **Ciência Hoje** 14, p. 21-27, 1992.
- MOORMAN, T.; REEVES, B.: The role of endomycorrhizae in revegetation practices in the semi-arid west. II. A bioassay to determine the effect of land disturbance on endomycorrhizae populations. **American Journal of Botany** 66, p. 14-18, 1979.
- MORTON, J.B.; BENNY, G.L.: Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order Glomales, two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with and emendation of Glomaceae. **Mycotaxon** 37, p 471-491, 1990
- MORTON, J.B.; BENTIVENGA, S. P.: Germoplasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures

- for culture and development documentation, and storage. **Mycotaxon** **48**, p. 491-528, 1994.
- MORTON, B.J.; BENTIVENGA, S.P.; BEVER, J.D.: Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zigomycetes). **Canadian Journal of Botany** **73**, p. S25-S32, 1995.
- NAEEM, S.; THOMPSON, L. J.; LAWLER, S.P.; LAWTON, J.H.; WOODFIN, R.M.: Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. **Nature** **368**, p. 734 –737, 1994.
- NAEEM, S.; LI, S.: Biodiversity enhances ecosystem reliability. **Nature** **390**, p. 507-509, 1997.
- NATIONS, J.D.: A Ecologia profunda encontra o mundo em desenvolvimento In: **Biodiversidade**. Capítulo 8 .Ed. E.O.Wilson. Editora Nova Fronteira. Rio de Janeiro, p.101-106, 1988.
- NICOLSON, T.H.: Mycorrhiza in the gramineae. II. Development in different habitats, particularly sand dunes. **Transaction of British Mycology Society** **43**, p. 132-145, 1960.
- NIESBET, L.J.; FOX, F.M.: The importance of microbial biodiversity in biotechnology. *In: The Biodiversity of Microorganisms and Invertebrates: Its roles in sustainable agriculture*. Ed. Hawksworth. Wallingford, UK: CAB International, p. 229-244, 1991.
- ODUM, E.P.: Populações em comunidades. *In: Ecologia* . Ed. Interamericana, Rio de Janeiro Brasil, p. 233-266, 1985.
- PETERSON, R.L.; PICHE, Y.; PLENCHETTE, C.: Mycorrhizae and their potential use in the agricultural and forestry industries. **Biotechnology Advances** **2**, p. 101-102, 1984.
- PIROZYNSKI, A.K.; DALPÉ, Y.: Geological history of the Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis. **Symbiosis** **7**, p. 1-36, 1989.
- RAUPP, D.M.: Diversity crises in the geologic past. In: **Biodiversity**. Chapter 5. Ed. E.O.Wilson. National Academic Press, Washington D.C., p. 51- 57, 1988.

- REITZ, P.R.: Vegetação da zona marítima de Santa Catarina. *Sellowia* **13**, p. 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. *Applied and Environmental Microbiology* **63** p 1756- 1761, 1997.
- RIZZINI, C.T.: **Tratado de fitogeografia do Brasil- Aspectos sociológicos e florísticos**. Editora de humanismo, Ciência e Tecnologia (HUCITEC) Limitada, São Paulo, Brasil, 1979.
- SAIKI, R.K.; SHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N.: Enzymatic amplification of β -globin, genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, p. 1350-1354, 1985.
- SALMEIRON, J. G.: Erosión eólica. Ministério de Agricultura. Dirección General de Montes, Caza y Pesca Fluvial. Instituto Florestal de Investigaciones y Experiencias. Madrid. p.561- 576, 1967.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, F.E.; MANIATIS, T.: **Molecular cloning: A laboratory manual** , Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York, 1989.
- 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**, p. 123-134, 1996.
- SANDERS, F.E.: Biodiversity of the Glomales. *In: Progress in Microbial Ecology*. Ed. Sociedade Brasileira de Microbiologia, Brasil, 1997.
- SHENCK, N.C.: **Methods and principles of mycorrhizal research**. Ed. Schenk, N.C. Published by The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, 1982.
- SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T.D. Specific amplification of 18S fungal Ribosomal Genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing Roots. *Applied and Environmental Microbiology* **58** p 291-295 1992 b

- SIMON, L.; BOUSQUET, J.; LÉVESQUE, R.; LALONDE, M.: Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. **Nature** **363**, p. 67-69, 1993.
- SIMON, L.: Phylogeny of the Glomales: Deciphering the past to understand the present. **New Phytologist** **133**, p. 95-101, 1996.
- SOLBRIG, O.T.: Why study biodiversity? *In: From genes to ecosystems: A research agenda for biodiversity.* Ed. O.Solbrig, USA, p. 7, 1991.
- 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. **Canadian Journal of Botany** **72**, p. 359-363, 1994.
- SUTTON, J.C.; SHEPPARD, B.R.: Aggregation of sand dune soil by endomycorrhizal Fungi. **Canadian Journal of Botany** **54**, p. 326–333, 1976.
- SYLVIA, D.M. : Micorrhizal Symbioses. *In: Principles and applications of soil microbiology.* Ed. David M. Sylvia; Jeffrey J. Fuhrmann; Peter G. Hartel; David A. Zuberer. Prentice Hall. New Jersey. USA, p. 408-426. 1998.
- SZARO, R.C.: Introduction. *In: biodiversity and managed landscapes: Theory and practice.* Ed. R.C. Szaro and D.W. Jhonston. Oxford University Press, New York & Oxford, p. XXV – XXX, 1996.
- TILMAN, D.; DOWNING, J. A.: Biodiversity and stability in grasslands. **Nature** **367**, p. 363 – 365, 1994.
- TILMAN, D.: Biodiversity: population versus ecosystem stability. **Ecology** **77**, p. 350-363, 1996.
- TILMAN, D.; WEDIN, D.; KNOPS, J.: Productivity and sustentability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. **Nature** **379**, p. 718-720, 1996.
- TILMAN, D.; KNOPS, J.; WEDIN, D.; REICH, P.; RITCHIE, M.; SIEMANN, E.: The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. **Science** **277**, p. 1300–1305, 1997.

- TORSVIK, V.; GORSØYR, J.; DAAE, F.L.: High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology** 56, p. 782-787, 1990.
- TORSVIK, V.; SALTE, V.; SØRHEIM, R.; GOKSØYR, J.: Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria **Applied and Environmental Microbiology** 56, p. 776 – 781, 1990.
- TORSVIK, V.; SØRHEIM, R.; GORSØYR, J.: total bacterial diversity in soil and sediment communities - A Review. **Journal of Industrial Microbiology** 17, p. 170-178, 1996.
- UNEP The convention of biological diversity. Nairobi: UNEP environmental law and Institutions Activity Center, 1992.
- WATKINSON, A.R.; HUISKES, A.H.L.; NOBLE, J.C.: The demography of sand dune species with contrasting life cycles. *In: Ecological Processes in Coastal Environments*. Ed. R.L. Jefferies & A.J. Davy.. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 95-112, 1979.
- WARDLE, D. A.; ZACKRISSON, O.; HÖRNBERG, G.; CHRISTIANE, G.: The influence of island area on ecosystem properties. **Science**. 277, p. 1296- 1299, 1997.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. *In: PCR Protocols*. A guide to methods and applications. Ed. M.A. Innis , D.H.Gelfald, J.J. Sninsky & T.J. White. Academic Press, San Diego, p 315-322, 1990.
- WILSON, E. O.: The current state of biological diversity *In: Biodiversity*. Ed. E.O. Wilson. National Academic Press, Washington D.C., p. 3-20, 1988.
- ZÉZÉ, A.; DULIEU, H.; GIANINAZZI-PEARSON, V.: DNA Cloning and screening of a partial genomic library from arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora castanea*. **Mycorrhizae** 4, p. 251 –254, 1994.

ANEXO - 1

FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

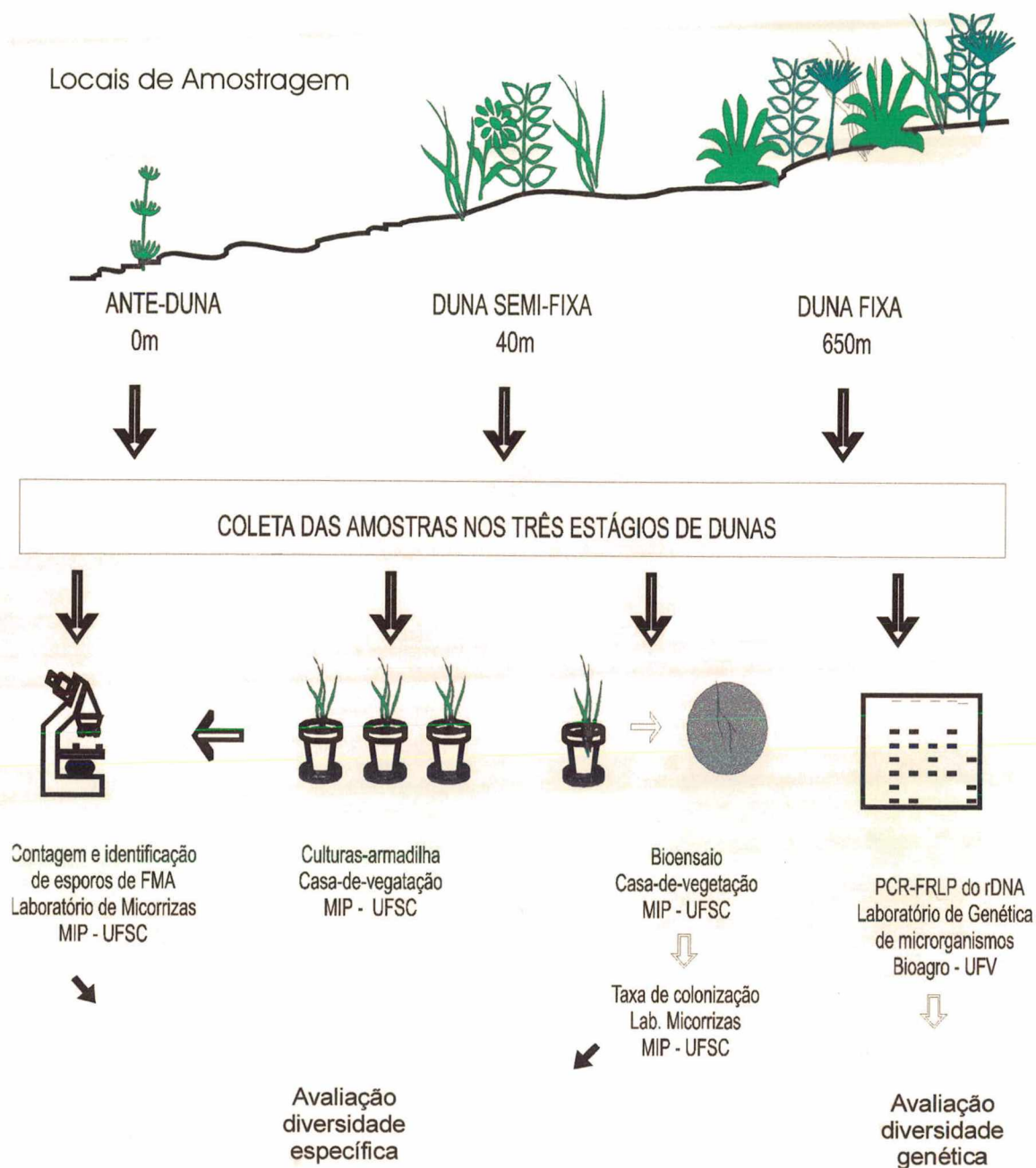


FIGURA A1 - Fluxograma apresentando os procedimentos realizados para a avaliação da diversidade específica e genética dos fungos micorrízicos arbusculares e os locais onde ocorreram os procedimentos (MIP - Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina, UFV – Universidade Federal de Viçosa).

ANEXO - 2

NÚMERO DE ESPOROS DE FMA NOS TRÊS ESTÁGIOS DE
ESTABILIZAÇÃO DAS DUNAS

TABELA A1 - Número de esporos na subamostra, abundância média e frequência das espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) associadas às plantas nos três estágios de estabilização das dunas. Valores obtidos a partir de seis subamostras de cada lote de coleta.

Espécie	A1	A2	A3	A4	A5	A6	média	F(%)
Ante-Duna								
1 <i>Gigaspora albida</i>	2	2	2	12	10	10	6,33	100
2 <i>Scutellospora weresubiae</i>	0	1	2	7	5	6	3,50	83
3 <i>Scutellospora pellucida</i>	0	2	0	0	9	9	3,33	50
4 <i>Acaulospora gerdemanni</i>	0	2	4	8	2	2	3,00	83
5 <i>Scutellospora coralloidea</i>	0	1	2	3	5	6	2,83	83
6 <i>Acaulospora n°2 (*)</i>	0	3	2	0	1	3	1,50	67
Total de esporos	2	11	12	30	32	36	20,50	
Duna Semi-Fixa								
1 <i>Acaulospora scrobiculata</i>	73	89	68	79	87	91	81,17	100
2 <i>Gigaspora albida</i>	57	44	53	60	46	44	50,67	100
3 <i>Glomus constrictum</i>	14	21	17	14	10	9	14,17	100
4 <i>Scutellospora pellucida</i>	10	12	9	7	5	8	8,50	100
5 <i>Acaulospora appendiculata</i>	9	12	4	7	11	6	8,17	100
6 <i>Scutellospora coralloidea</i>	4	6	4	7	3	4	4,67	100
7 <i>Acaulospora n°2 (*)</i>	5	4	0	0	2	2	2,17	67
Total de esporos	172	188	155	174	164	164	169,50	
Duna Fixa								
1 <i>Glomus sp1 (**)</i>	93	105	98	96	101	92	97,50	100
2 <i>Glomus sp2 (**)</i>	43	47	55	44	57	48	49,00	100
3 <i>Acaulospora n°2 (*)</i>	16	24	16	13	15	14	16,33	100
4 <i>Glomus occultum</i>	15	13	12	19	17	11	14,50	100
5 <i>Gigaspora albida</i>	15	6	5	10	12	15	10,50	100
6 <i>Glomus constrictum</i>	12	13	9	7	11	9	10,17	100
7 <i>Glomus aggregatum</i>	13	0	20	0	0	18	8,50	50
8 <i>Acaulospora appendicula</i>	5	4	9	10	7	6	6,83	100
9 <i>Scutellospora pellucida</i>	2	5	3	0	0	1	1,83	67
Total de esporos	214	217	227	199	220	214	215,17	

(*) – possível espécie nova

(**) – espécies não identificadas

A1, A2, A3, A4, A5 e A6 – subamostras de 100g retiradas das amostras de solo de cada lote.

média – abundância média de cada espécie (média das seis subamostras).

F (%) – Percentual de frequência de ocorrência de cada espécie nas subamostras.

ANEXO - 3

CÁLCULO DOS ÍNDICES

TABELA A2 - Valores necessários para os cálculos dos diversos índices de dominância, diversidade e equitatividade para a ante-duna.

Espécie	n_i	$n_i(n_i-1)$	p_i	$(p_i)^2$	$\ln(p_i)$	$p_i \ln(p_i)$
1 <i>Gigaspora albida</i>	6,33	33,78	0,31	0,0954	-1,17	-0,36
2 <i>Scutellospora weresubiae</i>	3,50	8,75	0,17	0,0291	-1,77	-0,30
3 <i>Scutellospora pellucida</i>	3,33	7,78	0,16	0,0264	-1,82	-0,30
4 <i>Acaulospora gerdemannii</i>	3,00	6,00	0,15	0,0214	-1,92	-0,28
5 <i>Scutellospora coralloidea</i>	2,83	5,19	0,14	0,0191	-1,98	-0,27
6 <i>Acaulospora n°2</i>	1,50	0,75	0,07	0,0054	-2,61	-0,19

S - Número de espécies ou Riqueza = 6;

n_i - Número de indivíduos por espécie ou Valor de Importância de cada espécie $\equiv n_i$;

N - Número total de indivíduos na amostra ou Total dos Valores de Importância = 21;

p_i - Probabilidade de importância de cada espécie definida por $\frac{n_i}{N}$;

\ln - logaritmo natural.

Cálculos dos Índices para a ante-duna

Índice de dominância de Simpson $c = \sum_{i=1}^6 (p_i)^2 = 0,20,$

Índices de diversidade de Simpson $D = 1 - c = 0,84$ $D' = \frac{1}{c} = 5,08,$

Índice de equitatividade de Simpson $E = \frac{D}{(1-1/S)} = 1,01$ $E' = \frac{D'}{S} = 0,85.$

Índice de diversidade de Shannon $H = -\sum_{i=1}^6 p_i \ln(p_i) = 1,71.$

Índice de equitatividade de Shannon ou de Uniformidade de Pielou

$$J = \frac{H}{\ln S} = 0,95.$$

TABELA A3 - Valores necessários para os cálculos dos diversos índices de dominância, diversidade e equitatividade para a duna semi-fixa.

	Espécie	n_i	$n_i(n_i-1)$	p_i	$(p_i)^2$	$\ln(p_i)$	$p_i \ln(p_i)$
1	<i>Acaulospora scrobiculata</i>	81,17	6506,86	0,48	0,2293	-0,74	-0,35
2	<i>Gigaspora albida</i>	50,67	2516,44	0,30	0,0894	-1,21	-0,36
3	<i>Glomus constrictum</i>	14,17	186,53	0,08	0,0070	-2,48	-0,21
4	<i>Scutellospora pellucida</i>	8,50	63,75	0,05	0,0025	-2,99	-0,15
5	<i>Acaulospora ap</i>	8,17	58,53	0,05	0,0023	-3,03	-0,15
6	<i>Scutellospora coralloidea</i>	4,67	17,11	0,03	0,0008	-3,59	-0,10
7	<i>Acaulospora n°2</i>	2,17	2,53	0,01	0,0002	-4,36	-0,06

S - Número de espécies ou Riqueza = 7;

n_i - Número de indivíduos por espécie ou Valor de Importância de cada espécie $\equiv n_i$;

N - Número total de indivíduos na amostra ou Total dos Valores de Importância = 170;

p_i - Probabilidade de importância de cada espécie definida por $\frac{n_i}{N}$;

\ln - logaritmo natural

Cálculos dos Índices para a duna semi-fixa

Índice de dominância de Simpson $c = \sum_{i=1}^7 (p_i)^2 = 0,33,$

Índice de diversidade de Simpson $D = 1 - c = 0,67$ $D' = \frac{1}{c} = 3,02.$

Índice de equitatividade de Simpson $E = \frac{D}{(1-1/S)} = 0,78$ $E' = \frac{D'}{S} = 0,43.$

Índice de diversidade de Shannon $H = -\sum_{i=1}^7 p_i \ln(p_i) = 1,37.$

Índice de equitatividade de Shannon ou de Uniformidade de Pielou

$$J = \frac{H}{\ln S} = 0,70$$

TABELA A4 - Valores necessários para os cálculos dos diversos índices de dominância, diversidade e equitatividade para a duna fixa.

	Espécie	ni	ni (ni-1)	pi	(pi) ²	ln (pi)	pi ln (pi)
1	<i>Glomus sp2</i>	97,50	9408,75	0,45	0,2053	-0,79	-0,36
2	<i>Glomus sp1</i>	49,00	2352,00	0,23	0,0519	-1,48	-0,34
3	<i>Acaulospora sp</i>	16,33	250,44	0,08	0,0058	-2,58	-0,20
4	<i>Glomus ocultum</i>	14,50	195,75	0,07	0,0045	-2,70	-0,18
5	<i>Gigaspora albida</i>	10,50	99,75	0,05	0,0024	-3,02	-0,15
6	<i>Glomus constrictum</i>	10,17	93,19	0,05	0,0022	-3,05	-0,14
7	<i>Glomus agregatum</i>	8,50	63,75	0,04	0,0016	-3,23	-0,13
8	<i>Acaulospora appendicula</i>	6,83	39,86	0,03	0,0010	-3,45	-0,11
9	<i>Scutellospora pellucida</i>	1,83	1,53	0,01	0,0001	-4,77	-0,04

S - Número de espécies ou Riqueza = 9;

ni - Número de indivíduos por espécie ou Valor de Importância de cada espécie $\equiv n_i$;

N - Número total de indivíduos na amostra ou Total dos Valores de Importância = 215;

pi - Probabilidade de importância de cada espécie definida por $\frac{n_i}{N}$;

ln - logaritmo natural

Cálculos dos índices de diversidade para a duna fixa

Índice de dominância de Simpson $c = \sum_{i=1}^9 (p_i)^2 = 0,27,$

Índice de diversidade de Simpson $D = 1 - c = 0,73$ $D' = \frac{1}{c} = 3,64.$

Índice de equitatividade de Simpson $E = \frac{D}{(1-1/S)} = 0,82$ $E' = \frac{D'}{S} = 0,40.$

Índice de diversidade de Shannon $H = -\sum_{i=1}^9 p_i \ln(p_i) = 1,64.$

Índice de equitatividade de Shannon ou de Uniformidade de Pielou

$$J = \frac{H}{\ln S} = 0,75.$$

TABELA A5 - Recálculo dos diversos índices de diversidade, dominância e equitatividade para a Ante-Duna.

Índices		A1 a A6	A2 a A6	A3 a A6	A4 a A6	Varição Máx
Riqueza	<i>S</i>	6	6	6	6	0%
Abundância (média)	<i>N</i>	21	24	28	33	37%
Dominância de Simpson	<i>c</i>	0,20	0,20	0,22	0,23	16%
Diversidade de Simpson	<i>D</i>	0,80	0,80	0,78	0,77	5%
	<i>D'</i>	5,08	4,95	4,60	4,27	16%
Equitatividade de Simpson	<i>E</i>	0,96	0,96	0,94	0,92	5%
	<i>E'</i>	0,85	0,82	0,77	0,71	16%
Diversidade de Shannon	<i>H</i>	1,71	1,74	1,73	1,72	1%
Equitatividade de Shannon	<i>J</i>	0,95	0,97	0,96	0,96	1%

A1 a A6 – Valores dos índices considerando as seis subamostras

A2 a A6 – Valores dos índices eliminando a primeira subamostra

A3 a A6 – Valores dos índices eliminando as duas primeiras subamostras

A4 a A6 – Valores dos índices eliminando as três primeiras subamostras

Na ante-duna foi observado um comportamento distinto quanto à frequência de ocorrência das espécies de FMA (ANEXO 2 ; TABELA A1). As três primeiras subamostras nesta duna, apresentaram uma variação acentuada na frequência quando comparadas às três últimas. Esta variação foi de aproximadamente 300%, indicando a possibilidade de interferência metodológica tal como, a inadequada homogeneização do solo coletado previamente à extração das seis subamostras para a contagem dos esporos de FMA, e também algum erro no processamento das amostras.

Para verificar se as oscilação nas contagens de esporos nas diferentes repetições na ante-duna (TABELA A.1) poderiam ter influenciado os resultados obtidos nos índices, os cálculos foram refeitos suprimindo-se os dados suspeitos. Para tal, foram descartados sucessivamente a primeira, as duas primeiras e as três primeiras repetições. Os resultados obtidos foram resumidos na TABELA A5, evidenciando-se que não resultou em mudança expressiva nos índices.

ANEXO – 4

AJUSTE AOS MODELOS DE DISTRIBUIÇÃO DA ABUNDÂNCIA

TABELA A6 - Ajuste dos dados ao modelo de distribuição de abundância das espécies, Série geométrica, para os três estágios de estabilização das dunas.

Ante Duna		observado	esperado	X2
1	<i>Gigaspora albida</i> Ga	10,7	12,7	0,33
2	<i>Scutellospora weresubiae</i> Sw	6,0	8,1	0,54
3	<i>Scutellospora pellucida</i> Sp	6,0	5,2	0,14
4	<i>Acaulospora gerdemannii</i> Ag	4,0	3,3	0,16
5	<i>Scutellospora coralloidea</i> Sc	4,7	2,1	3,16
6	<i>Acaulospora n°2</i> Ac2	1,3	1,3	0,00
Total de esporos		32,7	32,7	$\Sigma X2 = 4,33$
Probabilidade - P 50,00%				

Duna Semi-Fixa		observado	esperado	X2
1	<i>Acaulospora scrobiculata</i> As	81,2	90,1	0,88
2	<i>Gigaspora albida</i> Ga	50,7	42,8	1,46
3	<i>Glomus constrictum</i> Glc	14,2	20,3	1,85
4	<i>Scutellospora pellucida</i> Sp	8,5	9,6	0,13
5	<i>Acaulospora appendiculata</i> Aa	8,2	4,6	2,82
6	<i>Scutellospora coralloidea</i> Sc	4,7	2,2	2,87
7	<i>Acaulospora n°2</i> Ac2	2,2	1,0	1,25
Total de esporos		169,5	170,5	$\Sigma X2 = 11,27$
Probabilidade - P 5% < P < 10%				

Duna Fixa		observado	esperado	X2
1	<i>Glomus sp2</i> Ac2	97,5	86,5	1,40
2	<i>Glomus sp1</i> Gl1	49,0	53,7	0,41
3	<i>Acaulospora n°2</i> Asp	16,3	33,4	8,69
4	<i>Glomus occultum</i> Glo	14,5	20,7	1,87
5	<i>Gigaspora albida</i> Ga	10,5	12,9	0,44
6	<i>Glomus constrictum</i> Glc	10,2	8,0	0,59
7	<i>Glomus aggregatum</i> Gla	8,5	5,0	2,52
8	<i>Acaulospora appendicula</i> Aa	6,8	3,1	4,56
9	<i>Scutellospora pellucida</i> Sp	1,8	1,9	0,00
Total de esporos		215,2	225,1	$\Sigma X2 = 20,49$
Probabilidade - P 0,1% < P < 1%				

Para a distribuição da série geométrica foram utilizados:

$$n_i = N C_k k (1-k)^{i-1}$$

onde k = proporção do espaço do nicho ou recursos disponíveis que cada espécie ocupa

S = ao número total de espécies

n_i = ao número de indivíduos da i -ésima espécie

N = ao número total de indivíduos

N_{\min} = ao número de indivíduos da espécie menos abundante

$C_k = [1 - (1-k)^S]^{-1}$, constante que garante que $\sum_{i=1}^S n_i = N$.

O valor de k é estimado resolvendo-se a seguinte equação

$$(*) \quad \frac{N_{\min}}{N} = \frac{[k/(1-k)](1-k)^S}{1 - (1-k)^S}$$

Para a ante duna temos os dados

$$S = 6$$

$$N_{\min} = 1,333333333$$

$$N = 32,66731771$$

$$N_{\min}/N = 0,040815513$$

Para a estimativa de k resolvemos a equação

$$0,040815513 = \frac{[k/(1-k)](1-k)^S}{1 - (1-k)^S}$$

usando o método iterativo

k	erro
0,25	0,031355559
0,5	-0,024942497
0,375	-0,00278599
0,3125	0,012847922
0,34375	0,004656365
0,359375	0,000840244
0,3671875	-0,000996844
0,36328125	-8,41343E-05
0,36132813	0,000376569
0,36230469	0,000145728
0,36279297	3,07039E-05
0,36303711	-2,67384E-05
0,36291504	1,9769E-06

Com o valor de k estimado em 0,363 calculamos o valor de C_k usando a fórmula

$$C_k = [1 - (1 - 0,363)^6]^{-1} = 1,072$$

e com isto podemos calcular o número de indivíduos n_i para cada uma das 6 espécies usando a fórmula

$$n_i = 32,66 \times 1,072 \times 0,363 \times (1 - 0,363)^{i-1}$$

Obtendo a seqüência dos valores esperados da tabela da ante duna.

Os valores do teste χ^2 foram calculados usando-se

$$\sum (Valor observado - Valor esperado)^2 / Valores esperado.$$

TABELA A7 - Ajuste dos dados ao modelo de distribuição de abundância das espécies, série log, para os três estágios de estabilização das dunas.

Ante-Duna				
Número de indivíduos Limite superior	Número de indivíduos	Espécies Observadas	Espécies Esperadas	X ²
2,5	2	1	3,61	1,88
4,5	4	4	1,07	8,06
8,5	8	1	0,80	0,05
16,5	16	0	0,41	0,41
32,5	32	0	0,11	0,11
		0	0,01	0,01
Total de indivíduos	62			
Total de espécies		6	6,00	
				ΣX^2 10,51
Probabilidade - P	5% < P < 10%			

Duna Semi-Fixa				
Número de indivíduos Limite superior	Número de indivíduos	Espécies Observadas	Espécies Esperadas	X ²
2,5	2	1	2,18	0,64
4,5	4	1	0,83	0,03
8,5	8	2	0,88	1,41
16,5	16	1	0,88	0,02
32,5	32	0	0,81	0,81
64,5	64	1	0,68	0,15
128,5	128	1	0,46	0,63
		0	0,27	0,27
Total de indivíduos	254			
Total de espécies		7	7,00	
				ΣX^2 3,70
Probabilidade - P	80% < P < 90%			

Duna Fixa				
Número de indivíduos Limite superior	Número de indivíduos	Espécies Observadas	Espécies Esperadas	X ²
2,5	2	1	2,80	1,16
4,5	4	0	1,07	1,07
8,5	8	2	1,14	0,65
16,5	16	4	1,32	5,44
32,5	32	0	1,05	1,05
64,5	64	1	0,87	0,02
128,5	128	1	0,59	0,28
		0	0,16	0,16
Total de indivíduos	254			
Total de espécies		9	9,00	
				ΣX^2 9,67
Probabilidade - P	20% < P < 30%			

Para a distribuição da série log temos que calcular o número de espécies com i indivíduos dados por

$$EN_i = \frac{\alpha x^i}{i}$$

e para isto temos que estimar os dois parâmetros α e x .

Para estimar o parâmetro x temos que resolver a seguinte equação

$$\frac{S}{N} = [(1-x)/x] [-\ln(1-x)]$$

onde

S = ao número total de espécies

N = ao número total de indivíduos.

Com isto pode se calcular o valor de α usando a fórmula

$$\alpha = \frac{N(1-x)}{x}$$

Para a ante duna temos os dados

$$S = 6$$

$$N = 20,5$$

$$S/N = 0,292682927$$

Para a estimativa de x resolvemos a equação

$$0,292682 = [(1-x)/x] [-\ln(1-x)]$$

usando o método iterativo da bissecção

x	erro
0,8	0,109676551
0,9	-0,036840139
0,85	0,042102953
0,875	0,004380151
0,8875	-0,015736187
0,88125	-0,00556263
0,878125	-0,000563302
0,8765625	0,001925108
0,87734375	0,000677335
0,877734375	5,82455E-05
0,877929688	-0,000253214
0,877832031	-9,74568E-05
0,877783203	-1,95988E-05

Com o valor de x estimado em 0,8777 calculamos o valor de α usando a fórmula

$$\alpha = \frac{N(1-x)}{x} = 2,85429$$

e com isto podemos calcular NE_i , o número de espécies esperadas contendo i indivíduos. Obtivemos a seqüência dos valores esperados da tabela da ante duna.

Os valores do teste χ^2 foram calculados usando-se

$$\sum (\text{Valor observado} - \text{Valor esperado})^2 / \text{Valores esperado}.$$

Os cálculos para as dunas semi-fixa e fixa foram feitos de forma análoga.

TABELA A8 - Ajuste dos dados ao modelo de distribuição de abundância das espécies, *broken stick*, para os três estágios de estabilização das dunas.

Ante-Duna						
Classe	Número de indivíduos Limite superior	Número de indivíduos	Espécies Observadas	Espécies Esperadas		X ²
1	2,5	2	1	1,52		0,18
2	4,5	4	2	1,17		0,59
3	8,5	8	2	1,53		0,15
4	16,5	16	1	1,15		0,02
5	32,5	32	0	0,18		0,18
6			0	0,45		0,45
	Total de indivíduos	62				
	Total de espécies		6	6,00		
					Σ X ²	1,11
	Probabilidade - P	95% < P < 98%				
Duna Semi-Fixa						
Classe	Número de indivíduos Limite superior	Número de indivíduos	Espécies Observadas	Espécies Esperadas		X ²
1	2,5	2	1	0,47		0,59
2	4,5	4	1	0,45		0,69
3	8,5	8	2	0,81		1,73
4	16,5	16	1	1,35		0,09
5	32,5	32	0	1,83		1,83
6	64,5	64	1	1,56		0,20
7	128,5	128	1	0,40		0,91
8			0	0,12		0,12
	Total de indivíduos	254				
	Total de espécies		7	7,00		
					Σ X ²	4,77
	Probabilidade - P	50% < P < 70%				
Duna Fixa						
Classe	Número de indivíduos Limite superior	Número de indivíduos	Espécies Observadas	Espécies Esperadas		X ²
1	2,5	2	1	0,64		0,21
2	4,5	4	0	0,60		0,60
3	8,5	8	2	1,08		0,78
4	16,5	16	4	1,77		2,83
5	32,5	32	0	2,33		2,33
6	64,5	64	1	1,91		0,43
7	128,5	128	1	0,51		0,46
8			0	0,17		0,17
	Total de indivíduos	254				
	Total de espécies		9	9,00		
					Σ X ²	6,22
	Probabilidade - P	50% < P < 70%				

ANEXO – 5

RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS DA
AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE A NÍVEL DE ESPÉCIE
APÓS COLETA DIRETA DE ESPOROS

TABELA A9 - (A) A diversidade dos três estágios de estabilização calculada através dos diversos índices de riqueza (I) e dos índices de heterogeneidade (II).
 (B) Adaptação das distribuições da abundância das espécies, encontradas nos três estágios de estabilização das duna, a três dos modelos clássicos de distribuição de abundância das espécies, série geométrica, série log, *broken stick*.

		Ante-Duna	Semi-Fixa	Duna Fixa
(A) DIVERSIDADE				
I - Índices de Riqueza				
Riqueza	<i>S</i>	6	7	9
Abundância	<i>N</i>	21	170	215
Índice de Margalef	<i>D_{Mg}</i>	1,64	1,16	1,48
II - Índices de Heterogeneidade				
Índice de dominância de Simpson	<i>c</i>	0,20	0,33	0,27
Índice de diversidade de Simpson	<i>D</i>	0,80	0,67	0,73
	<i>D'</i>	5,08	3,02	3,64
Índice de equitatividade de Simpson	<i>E</i>	0,96	0,78	0,82
	<i>E'</i>	0,85	0,43	0,40
Índice de diversidade de Shannon	<i>H</i>	1,71	1,37	1,64
Índice de equitatividade de Shannon	<i>J</i>	0,95	0,70	0,75
(B) AJUSTE AOS MODELOS				
Série geométrica		sim	não	não
Série log		não	sim	sim
<i>Broken stick</i>		sim	sim	sim