

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

DEGRADAÇÃO DE TOCOS DE *Eucalyptus grandis* POR FUNGOS

FREDERICO AGUIRRE DE ANDRADE

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU - SP

Fevereiro - 2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

DEGRADAÇÃO DE TOCOS DE *Eucalyptus grandis* POR FUNGOS

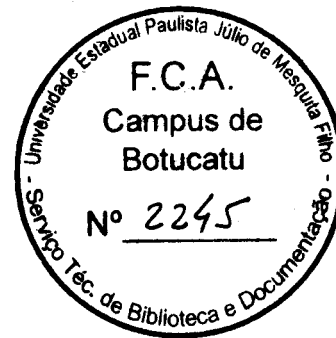
FREDERICO AGUIRRE DE ANDRADE

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Proteção de Plantas.



BOTUCATU - SP
Fevereiro - 2003



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - FCA
UNESP - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

A553d Andrade, Frederico Aguirre de, 1969-
Degradação de tocos de *Eucalyptus grandis* por fungos
/ Frederico Aguirre de Andrade. -- Botucatu, [s.n.],
2003.
ix, 58f. : il. color., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) -- Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrônômicas.
Orientador: Edson Luiz Furtado.
Inclui bibliografia.

1. Biodegradação. 2. Fungos - Biotecnologia. 3.
Eucalipto. 4. Madeira - Deterioração. I. Furtado,
Edson Luiz. II. Universidade Paulista "Júlio de Mesqui-
ta Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências
Agrônômicas. III. Título.

Palavras-chave: Biodegradação; Destoca; Basidiomicetos; Degradação por fungos

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

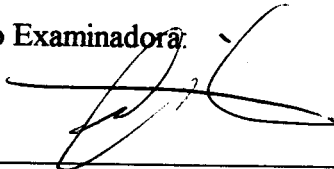
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DEGRADAÇÃO DE TOCOS DE *Eucalyptus grandis* POR FUNGOS.


ALUNO: FREDERICO AGUIRRE DE ANDRADE

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO

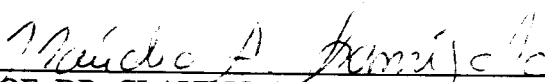
Aprovado pela Comissão Examinadora:



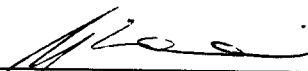
PROF. DR. EDSON LUIZ FURTADO



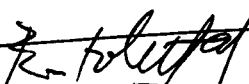
PROFA. DRA. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI



PROF. DR. CLAUDIO ANGELI SANSIGOLO



DRA. VERA LUCIA RAMOS BONONI



PROF. DR. GERALDO BORTOLETTO JUNIOR

Data da Realização: 24 de fevereiro de 2003

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de estudar, em especial por este trabalho científico.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Furtado, pelos ensinamentos, confiança, compreensão e orientação segura.

À Prof^a Dra. Marli Teixeira de Almeida Minhoni pelos ensinamentos e conselhos.

Ao Prof. Dr. Cláudio Angeli Sansígolo, do Departamento de Recursos Naturais, pela colaboração nas análises químicas da madeira.

Ao Prof. Dr. Adalberto José Crocci, do Departamento de Bioestatística, pelo apoio nas análises dos dados e colaboração.

A Pesquisadora Dr. Marina Capelari, do Instituto de Botânica de São Paulo, pela colaboração na identificação das espécies isoladas do campo.

Aos Técnicos Joaquim da Silva, Norberto e Paulo, do Departamento de Produção Vegetal, Sílvia e Ricardo, do Departamento de Recursos Naturais, pelo apoio que deram no decorrer de meu trabalho.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço ao Grupo Votorantim pelo apoio e incentivo, a Dra. Celina e aos técnicos Walmir, Osmar e Dimas, que muito contribuíram no desenvolvimento dos experimentos de campo.

A Sra. Ana Maria e Noreen, pela colaboração e amizade.

Aos amigos sempre presentes Renato, Antonio Carlos (Abobarão), José Arnaldo (Beliche), Nélão, Giuliano, Xandão e Daniel (Paper) e a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Agradeço a Rita, pela paciência, compreensão, carinho e principalmente por estar sempre ao meu lado, me incentivando em todos os momentos.

E, principalmente, aos meus pais José Moysés e Rosa Maria, e aos meus irmãos, pelo incentivo e apoio.

“Dedico este trabalho aos meus pais José Moisés e Rosa Maria pelo apoio e incentivo, a minha avó Nair exemplo de força, a minha filha Mariana razão de meus esforços e a Rita pela dedicação”.

SUMÁRIO

	Página
\ 1. INTRODUÇÃO.....	1
\ 2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. O <i>Eucalyptus</i>	2
2.2. Manejo do sistema.....	6
2.2.1. Preparo do solo e plantio.....	6
2.2.2. Reforma do povoamento.....	8
2.2.3. Métodos de destoca convencional.....	8
2.2.4. Métodos de destoca não convencional.....	11
2.3. Degradação biológica da madeira.....	13
\ 3. OBJETIVOS.....	18
\ 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1. Obtenção de matrizes e inoculantes.....	19
4.1.1. Matriz primária.....	19
4.1.2. Matriz secundária.....	20
4.2. Determinação do crescimento micelial.....	21
4.2.1. Em placa de petri.....	21
4.2.2. Em tubos.....	21
4.2.3. Análise estatística dos dados.....	22
4.3. Avaliação da capacidade de degradação dos fungos <i>in vitro</i>	23
4.3.1. Procedimento para o ensaio acelerado de degradação.....	23
4.3.2. Análise estatística dos dados.....	24

4.4. Degradação de tocos no campo.....	24
4.4.1. Análise estatística dos dados.....	26
4.5. Verificação da patogenicidade dos isolados.....	26
4.5.1 Verificação da patogenicidade em plantas adultas.....	26
4.5.2. Análise estatística dos dados.....	27
4.5.3. Verificação da patogenicidade em plantas jovens.....	27
4.6. Análise da composição química da madeira.....	27
4.6.1. Preparo da madeira para análise.....	29
4.6.2. Determinação por cento absolutamente seco da serragem (% a.s.).....	29
4.6.3. Determinação do teor de lignina.....	30
4.6.4. Determinação do teor de holocelulose.....	31
4.6.5. Determinação do teor de celulose pelo método do ácido peroxiacético, descrito por Wright & Wallis (1998).....	32
4.7. Análise da composição química do corpo frutificação do fungo <i>Ganoderma applanatum</i>	32
5. RESULTADOS	33
5.1. Determinação do crescimento micelial em placa de petri.....	33
5.2. Determinação do crescimento micelial em tubos.....	35
5.3. Avaliação da capacidade de degradação dos fungos <i>in vitro</i>	36
5.4. Degradação de tocos no campo.....	38
5.5. Verificação da patogenicidade em plantas adultas.....	42
5.6. Verificação da patogenicidade em plantas jovens.....	44
5.7. Análise da composição química da madeira.....	44

5.8. Análise da composição química do corpo de frutificação do fungo *Ganoderma applanatum*.

6. DISCUSSÃO	47
6.1. Considerações finais	51
7. CONCLUSÕES	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

DEGRADAÇÃO BIOLÓGICA DE TOCOS DE *Eucalyptus* spp. POR FUNGOS**Autor: Frederico Aguirre de Andrade****Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado****Resumo:**

Neste trabalho foi realizado um estudo de biodegradação de tocos de *Eucalyptus grandis* por fungos, com o intuito de se desenvolver uma metodologia alternativa para o processo de destoca em povoamentos de *Eucalyptus* spp.. Para tal, foram utilizadas cinco espécies de fungos, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, *Pleurotus sajor caju* (Fr.) Singer, *Polyporus guiannensis* Mont., *Pycnoporus sangüineus* e *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat., testados em laboratório e em campo. Para a avaliação da eficiência destas espécies quanto à degradação, verificou-se a velocidade de crescimento em placas de petri e em tubos contendo serragem, perdas de massa de corpos de prova de madeira e os teores de lignina, celulose e holocelulose, antes e após a ação dos fungos. As maiores médias de crescimento diário foram alcançadas por *Polyporus guiannensi*. Nos testes de degradação com corpos de prova, foi observada maior eficiência pelo do fungo *Ganoderma applanatum*. Nos testes de campo, realizados para a avaliação da degradação de tocos, os fungos anteriormente descritos foram inoculados seguindo a metodologia adaptada de inoculação utilizada no cultivo do cogumelo comestível *Lentinula edodes* (shiitake), em tocos do último corte, em 3 regiões distintas: Luiz Antonio, Capão Bonito e Jacareí (todas no estado de São Paulo), na presença e ausência de câmara úmida. Após 5 meses da inoculação, verificou-se que para as regiões Luiz Antonio e Capão Bonito os tratamentos com câmara úmida apresentaram melhores resultados quanto à degradação dos tocos. As espécies *Ganoderma aplanatum* e *Pycnoporus sangüineus* apresentaram maior eficiência quanto à degradação dos tocos no campo. Nas condições em que se realizaram os testes de patogenicidade em plantas jovens e adultas, os fungos aqui testados não indicaram ser patogênico.

BIOLOGIC DEGRADATION OF *Eucalyptus* sp. TREE STUMPS BY FUNGI.**Author: Frederico Aguirre de Andrade****Adviser: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado**

SUMMARY

This study involves the biodegradation of *Eucalyptus* spp. stumps by fungi, with the purpose of developing an alternative methodology for the stump elimination process in stands of *Eucalyptus* spp. For this, five species of fungus were used: *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, *Pleorotus sajor caju* (Fr.) Singer, *Polyporus guiannensis* Mont, *Pycnoporus sanguineus*, and *Ganoderma applanatum* (Pres.); and tested in the laboratory and in the field. Using an accelerated method to evaluate the natural resistance of wood against the attack of fungi that provoke rot, the loss of mass caused by the mentioned fungi was evaluated; the most efficient for degradation were the following fungi: *Ganoderma applanatum*, *Pycnoporus sanguineus* and *Lentinula edodes*. In the field tests for the evaluation of degradation of stumps, the above mentioned fungi were inoculated, according to the methodology adapted from that used in the culture of the edible mushroom *Lentinula edodes* (shiitake), in stumps in three different locations: Luiz Antonio, Capão Bonito and Jacareí, with and without the damp or moist chamber. Five months after inoculation, an evaluation showed that for the Luiz Antonio and Capão Bonito areas the treatments in which a damp ou moist chamber was used achieved better results in relation to stump degradation. In the Jacareí area, for the *Lentinula edodes* and *Polyporus guiannensis* species, there was no significant difference between the treatments with and without damp or moist chamber. In the Luiz Antonio area, the *Pycnoporus sanguineus* and *Gonoderma applanatum* species showed more efficiency for the degradation of stumps in the treatments in which the damp or moist chamber was used. In the Capão Bonito and Jacareí areas, there was no significant difference from one species to the other in relation to stump degradation in treatments with damp or moist chamber. Pathogenicity tests in young and adult trees showed that the fungi tested in this study are not pathogenic.

Keywords: Biodegradation, stumps, *Eucalyptus*, degradation of stumps, basidiomycetes.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos têm um papel relevante em ecossistemas diversos. Por possuírem um complexo de enzimas, eles participam ativamente no processo de decomposição e ciclagem de resíduos orgânicos, principalmente vegetais (folhas, ramos, troncos e raízes), agindo tanto na fração solúvel como nos componentes estruturais, compostos de açúcares complexos, entre eles a celulose e a lignina.

A maioria dos trabalhos de biodegradação envolvendo microrganismos na indústria de papel e celulose são aplicações tecnológicas tais como: tratamento de efluentes da indústria papelreira, pré-tratamento de cavacos de madeira e bagaço de cana-de-açúcar para posterior produção de polpas celulósicas e branqueamento biológico destas polpas (Ferraz, 1991). A biodegradação de materiais lignocelulósicos vem sendo utilizada pela indústria papelreira como alternativa aos processos químicos utilizados na produção de polpa celulósica.

Estudos relacionados à biodegradação natural da madeira indicam a ocorrência de muitos tipos de microrganismos atuando simultaneamente, numa sucessão de populações microbianas, sendo que cada população exerce um tipo específico de degradação, normalmente indispensável à continuidade do processo de degradação (Levy, 1987).

Zadrazil et al. (1982) e Agosin et al. (1990) citados por Ferraz (1991), observaram, em algumas ilhas do Chile, que madeiras com podridão natural apresentavam colonização exclusiva por espécies fúngicas do gênero *Ganoderma*, o que sugere que tais fungos inibem a colonização por outras espécies, promovendo uma degradação extremamente seletiva da lignina (madeira residual com 98 % de celulose).

Kirt, citado por Oliveira (1986), observou que, em tecidos de madeira com alto teor de lignina (maior ou igual a 20%), os decompositores de maior importância são da divisão Basidiomycota que possuem a capacidade de decompor a lignina. Estima-se em 1.800 o número de espécies desta divisão para o Hemisfério Norte; já nas regiões tropicais e Hemisfério Sul este número total é bem maior.

O tempo estimado para a degradação biológica natural de tocos de *Eucalyptus* spp. no campo é de aproximadamente 25 anos (Onofre & Furtado, 2001). Considerando que as áreas de plantio de eucalipto são intensivamente cultivadas e este plantio é renovado a cada 7 anos, com 1800 a 2500 pl/ha, com o passar do tempo, estas áreas tornar-se-ão impróprias para o plantio, uma vez que estarão totalmente ocupadas, em sua maior parte, por tocos e raízes em diferentes estádios de decomposição. Como consequência, tem-se a utilização de maquinaria pesada para se promover a destoca e um revolvimento excessivo do solo, contrário às práticas de conservação e sustentabilidade do sistema.

Portanto, o objetivo do presente trabalho é desenvolver uma metodologia alternativa para o processo de destoca de povoamentos de *Eucalyptus* spp., possibilitando um aproveitamento maior e uma conservação da área de plantio, utilizando-se para tal fungos decompositores. As etapas foram: a) seleção de espécies de fungos mais ativas quanto à degradação; b) testes de degradação de tocos no campo, promovendo a destoca biológica, através de processo natural alternativo ao uso de maquinários e possibilitando o maior aproveitamento e conservação da área de plantio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* também conhecido como “Eucalipto” é originário da Austrália, onde podem ser encontradas 500 ou mais espécies. Normalmente são encontrados disseminados nas mais variadas situações de clima e solo, desde áreas onde as taxas pluviométricas não ultrapassam 250 milímetros até áreas ao nível do mar, em solos extremamente pobres ou ricos, secos ou alagados, etc, (Galetti, 1973).

O *Eucalyptus* foi introduzido no Brasil em 1909 por Navarro de Andrade, quando então iniciaram-se as primeiras pesquisas com esta essência, contando para isso com 125 espécies deste gênero. Desta data até 1966, estima-se que a área total plantada era de aproximadamente 400.000 hectares. Após, devido ao programa de incentivos fiscais estabelecido pelo governo federal para atender à crescente demanda de madeira como matéria-prima, principalmente nas regiões Sul e Sudeste (que na referida data se encontravam comprometidas de cobertura florestal natural), a área plantada com Eucalipto aumentou consideravelmente (Lima, 1996).

Um estudo realizado pela Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo, em parceria com o Instituto Florestal, com base em fotos, imagens de satélite dos anos de 1999 e 2000, e levantamentos nas propriedades, resultou em um inventário sobre as áreas reflorestadas do Estado de São Paulo. Os dados revelaram que 3,1 % (769 mil hectares) do território do estadual são áreas reflorestadas, sendo 611 mil hectares plantados com *Eucalyptus* spp. e 158 mil hectares de *Pinus* (Charão & Girard, 2002). Para o ano de 2003, a estimativa é de que a produção anual de celulose no Estado chegue a mais de 5 milhões de toneladas por ano, o que exigirá um aumento significativo da área total plantada com *Eucalyptus* spp. (Hasse & Piccolo, 1999).

Atualmente o país possui 4,8 milhões de hectares plantados com *Eucalyptus* spp. e *Pinus*, para fornecimento de lenha, carvão, madeira e celulose. É um mercado que movimenta US\$ 21 bilhões por ano, o que representa 4 % do Produto Interno Bruto nacional (Scharf, 2002).

A cultura do *Eucalyptus* spp pode ter varias finalidades (industrial, recreação, de proteção do solo, água, fauna, etc.). Dentre as várias utilidades da madeira do eucalipto tem-se: lenha, carvão, madeira para serraria, celulose, óleos essenciais, dormentes, estacaria para edificações, resina, postes, moirões, esticadores, cortiça, chapas de fibra, tanino, etc.

Quase todo o carvão consumido provém de florestas de *Eucalyptus* spp. plantadas para este fim. Os cultivos destinados à produção de celulose e papel correspondem a 1,47 milhões de hectares plantados. Destes, 980 mil correspondem às plantações de *Eucalyptus* spp.. O *Eucalyptus* vem substituir o uso de madeiras de florestas nativas, em função de suas características tais como: poder calórico elevado, rendimento elevado no processo industrial. Quanto ao mercado de chapas duras, o Brasil é o líder mundial, utilizando-se o *Eucalyptus* spp. como matéria prima, sendo que, em 1999, a produção foi de 536 mil m³ (Charão & Girard, 2002).

Graças à alta qualidade da celulose brasileira, ela é exportada para mais de 50 países, e o papel, para mais de 70. Entre seus consumidores estão: Estados Unidos, Alemanha, Reino Unido, França, Itália, Espanha, Japão e outros, além de toda a América Latina. No ano de 1998, o Brasil produziu 6,68 milhões de toneladas de celulose e pasta, o que representou um crescimento de 5,6 % referente ao ano anterior e 6,58 milhões de toneladas de

papel, 1,1 % a mais que no ano de 1997. No primeiro semestre de 1999 também apresentou acréscimo na produção de celulose e pasta; se comparado ao mesmo período do ano anterior este aumento foi de 5,2 % (Hasse & Piccolo, 1999).

Galeti (1973) destaca a importância da escolha da espécie a ser implantada em função do objetivo ou finalidade a que se destina a cultura. No caso de se obter lenha para carvão, a preferência é para espécies que dêem grande quantidade de madeira em curto prazo; para celulose, espécies que apresentem cerne branco e macio; para postes, moirões, dormentes, esticadores e estacas, deve-se preferir espécies com cerne duro, a fim de se obter maior durabilidade; para serraria, dar preferência às espécies de madeira firme, que não rachem, sem veios ou nós.

A implantação florestal tem início com as operações de preparo do solo, e estende-se até o segundo ou quarto ano de manutenção, dependendo do local e da espécie implantada. Com a floresta estabelecida, entram os processos de manejo e proteção florestal. E no que se refere à implantação florestal, é pequena a ênfase dada ao planejamento florestal a longo prazo. Reflorestamentos em maturação e que vêm sendo cortados começam a apresentar os reflexos negativos da falta de planejamento das atividades de implantação (Simões *et al.*, 1981).

Em 1967, teve início um trabalho de melhoramento, que proporcionou aumentos significativos na produtividade do Eucalipto no Brasil. Utilizando-se de técnicas silviculturais intensivas (preparo do solo, fertilização mineral, proteção florestal, etc.), a produção que era de 15 m³/ha ano até 1967, passou para 21 m³/ha ano e, através da introdução de novos materiais mais adequados, obtiveram-se até 40 m³/ha ano. Outra estratégia de melhoramento florestal que resultou em ganhos consideráveis, foi a utilização da seleção clonal, onde se procura maximizar os ganhos em uma única geração (Ferreira, 1983, citado por Lima, 1996).

A utilização do Eucalipto em plantações florestais pode contribuir significativamente com programas de recuperação de áreas degradadas, além de fornecer proteção adequada a áreas críticas, tais como estabilização de dunas, controle de erosão, funcionamento hidrológico harmônico de microbacias hidrográficas, recuperação de áreas de mineração a céu aberto, como quebra-ventos, etc. Mas, acima de todos os benefícios diretos,

devemos ressaltar a importância indireta dessas plantações florestais, desempenhando papel vital ao aliviar a pressão sobre as florestas naturais remanescentes do país (Lima 1996).

2.2. Manejo do sistema

O manejo pode ser definido como a condução racional e organizada da floresta, para que se possa obter uma produção sustentada de madeira e outros produtos, ou benefícios da melhor qualidade e a custo baixo (Simões *et al.*, 1981).

2.2.1. Preparo do solo e plantio

Segundo Fonseca (1978), poderíamos dividir as operações de preparo do solo e desenvolvê-las da seguinte forma:

- Construção de estradas e aceiros;
- Desmatamento e destoca;
- Desdobramento e retirada da lenha;
- Enleiramento ou encoivramento;
- Queima das leiras e coivaras;
- Desenleiramento ou descoivramento;
- Combate à formiga;
- Revolvimento de solo;
- Sulcamento e / ou coveamento
- Drenagem;

Com o solo devidamente preparado iniciam-se as atividades de plantio, porém, deve-se definir dois fatores de suma importância: o espaçamento e a fertilização mineral.

A escolha do espaçamento tem uma série de implicações do ponto de vista silvicultural, tecnológico e econômico, influenciando diretamente as taxas de

crescimento das plantas, a qualidade da madeira, a idade do corte, o que reflete nas práticas de exploração e manejo florestal, e, conseqüentemente nos custos de produção (Simões *et al.*, 1981). Ainda segundo estes autores, esta operação pode ser realizada manualmente, utilizando-se correntes ou similar com até cinquenta (50) metros de comprimento, para o alinhamento e marcação do terreno. Em seguida, serão abertas covas com diâmetro de pelo menos 20 x 20 cm, para receber o adubo. A distribuição das mudas é feita por um operário, de forma manual, este seguido por outro que com uma pequena enxada mistura o adubo e executa o plantio propriamente dito. Já o plantio semimecanizado depende da topografia do terreno pois, a marcação do espaçamento é feita num mesmo sentido com a utilização de um sulcador. Tal marcação determina as linhas de plantio e, posteriormente, determiná-se a distância entre as mudas que, neste caso, é feita por uma distribuidora de mudas tracionada por um trator médio que, em seus rodados de ferro, possui saliências e que marca o solo. Normalmente, este método é utilizado em regiões onde a mão-de-obra é escassa.

Há outros equipamentos mais sofisticados. São plantadeiras que sulcam o terreno, aplicam os fertilizantes, e o Aldrin (cupinícida) e distribuem as mudas mecanicamente nos espaços determinados. Logo atrás deste equipamento, vêm operários que executam o plantio das mudas com pequenos enxades.

Eldridge & Cromer (1987) e Eldridge (1989), citados por Lima (1996), destacam que a produtividade das plantações de eucaliptos nos diversos países é elevada contudo, pode-se atingir índices maiores com a utilização do melhoramento genético para a renovação das populações-base, o que constitui uma necessidade imperiosa para a manutenção da produtividade das plantações de *Eucalyptus* a longo prazo. Outro fator importante é que algumas plantações podem ter sido formadas a partir de uma base genética estreita ou inadequada e, apesar de apresentarem alta produtividade, esta pode ser melhorada.

O desenvolvimento do melhoramento genético em muitos casos, aparece como alternativa para determinados tipos de solo, clima, altitude, etc., justificando desta forma a reforma da floresta através de nova implantação no mesmo terreno (Moraes *et al.*, 1982).

2.2.2. Reforma do povoamento

As florestas de *Eucalyptus* apresentam a capacidade de regeneração natural por brotação das touças, o que permite o manejo por corte simples regular e a sucessão de rotações curtas. Porém, o que parece uma vantagem pode não ser, pois essa seqüência pode induzir à redução gradual da capacidade produtiva da floresta e torná-la antieconômica (Moraes et al., 1982).

A atividade de preparo do solo na reforma de povoamentos florestais constitui-se em uma etapa operacional complexa e onerosa do ciclo de rotação comercial, e apresenta algumas dificuldades, principalmente no que se refere à remoção dos tocos (Ferreira, 1971; Silva & Wadt, 1996).

A escolha dos métodos a serem utilizados durante a operação de limpeza do terreno, desmatamento e/ou destoca, levam em conta o tipo de vegetação, topografia, condições do solo e uso final a que se destina a área em questão. Isto requer uma série de levantamentos e coleta de dados preliminares (Pittaluga, citado por Ferreira, 1967).

A remoção dos tocos durante as operações de preparo inicial do solo sempre foi considerada como problema para o cultivo. Devido à reduzida superfície de apoio para ser pressionado, não permitiu a possibilidade de se fazer alavanca. A parte subterrânea do toco que apresenta superfícies bem amplas, formadas por um emaranhado de raízes de grande força, que servem como ancoragem para a árvore dificulta o trabalho. Tal ancoragem garante a sobrevivência da árvore contra tempestades, erosão superficiais e subterrâneas (Testa, 1983; Silva & Wadt, 1996).

2.2.3. Métodos de destoca convencional

Normalmente, no Brasil, a operação de destoca é realizada por tratores de esteiras equipados com lâmina frontal, empurradora angulável ou lisa, lâminas cortadoras, destocador e com ancinho desenraizador. Esta operação consiste em remover a parte aérea do toco e de suas raízes, facilitando o trabalho das máquinas de preparo do solo e semeadura

(Testa, 1972, 1983 e Saad, 1984). Entretanto, tais operações não são tecnicamente as mais indicadas, primeiramente por danificar a estrutura do solo durante o deslocamento da manta orgânica que se acumulou na superfície e, posteriormente, por ser de operacionalização difícil, custosa e perigosa (Silva & Wadt, 1996).

Saad (1984) sugere o seguinte esquema de trabalho:

- Preparo do toco: desenterrar e cortar das raízes principais do toco, operação também conhecida como “descalçar o toco”;
- Arrancamento: Sucessivos impactos da lâmina contra o toco, que provocam o tombamento e remoção total do mesmo;
- Desenraizamento: consiste em retirar as raízes remanescentes, com o auxílio de um ancinho desenraizador ou outra ferramenta que permita esta operação;
- Enleiramento: arraste e empilhamento dos tocos e raízes soltas removidos;

Kito et al. (1959), citado por Testa (1972), relatam um ensaio individual sobre destocamento com lâmina tipo rastelo *Rakedozer*, em que encontraram muitas dificuldades para as operações de remoção dos tocos e raízes. Para obter dados sobre custos e ao tempo ocupado durante o arranque, pesquisou-se a relação entre o tamanho dos tocos, suas características, a maquinaria empregada e o tempo de trabalho. Para isso, foram necessários os seguintes dados do local de desmatamento e destoca: precipitação anual de chuva e taxa pluviosidade do período de operação, tipo e origem do solo, topografia da área, tipo de vegetação e de árvores, diâmetro das árvores.

Serão apresentados métodos e máquinas convencionais para a remoção dos tocos na reforma da floresta ou no preparo e limpeza do terreno.

❖ Destocador removível

O destocador removível é uma ferramenta muito eficiente na remoção de tocos. É uma peça de aço-carbono-manganês fundido, acoplada à armação frontal do trator,

movimentada por cabos ou hidráulicamente. Sua face curvada facilita a penetração em solos duros e ceifa o toco, ocorrendo a remoção do mesmo devido ao esforço durante o levantamento do comando hidráulico combinado com o empuxo do trator. Nos casos de tocos considerados grandes ou muito duros, pode-se adaptar à armação um fendidor (esporão) que pode ser fixo ou removível, situado no lado esquerdo do destocador. Este equipamento é indicado para tratores com um mínimo de 180 HP no motor (Saad, 1984; Testa, 1973; Testa, 1983).

❖ **Retrodestocador**

O retrodestocador é outra ferramenta especializada e eficiente na remoção de tocos. É formado por um dente de aço fundido, o qual é preso a uma armação reforçada de aço, soldada sem secções, o que garante resistência à tração máxima. É acoplado à parte traseira do trator de esteiras, de forma que não interfere com o equipamento dianteiro; possui uma unidade de controle com cabo que serve para levantar ou abaixar o equipamento. O dente de aço pode penetrar até 90 cm de profundidade, cortando as raízes laterais do toco e com isso, diminuir a resistência. Em seguida é engatado ao toco e, à medida que o trator se move para a frente, tende a arrancar o toco do solo. Dependendo do tamanho dos tocos e das condições de operação, é necessária uma potência do motor que pode variar de 180 a 385 HP (Saad, 1984).

❖ **Stumper, ou destocador**

O Stumper é uma lâmina com largura reduzida, ângulo de 45°, o que favorece o avanço do trator e a remoção do toco do solo. Utilizada em tratores de 120 a 140 HP, é acoplada à frente do trator. No canto direito da lâmina, fica presa uma haste de aço que tem a função de fracionar o toco, reduzindo a resistência à ancoragem do mesmo ao solo. A grande vantagem é a concentração da potência e peso do trator sobre uma superfície pequena (Testa, 1983).

❖ **Destocador-desintegrador (rala toco)**

O destocador-desintegrador tem como órgão ativo um cilindro rotativo de eixo horizontal, onde são fixados 113 blocos cortantes de aço (ABNT 1020), escalonados,

revestidos de placas intercambiáveis de carbureto de tungstênio. O equipamento é montado sobre trator de 90 a 140 HP, convencional de duas rodas e a rotação do cilindro é realizada através da tomada de força e do sistema hidráulico “três pontos” do mesmo. O cilindro rotativo dentado é posicionado sobre o toco e, girando em rotação de corte (40m/segundo), é lançado através do comando sobre o mesmo, efetuando a desintegração deste por impacto. Numa seqüência de varias descidas rápidas, o toco pode ser rebaixado a uma profundidade de até 0,40 m abaixo do nível do solo (Silva & Wadt, 1996).

2.2.4. Métodos de destoca não convencional

A seguir, serão apresentados métodos não convencionais utilizados na remoção de tocos.

❖ Tração animal

Swenehart (1922), citado por Testa (1972), relata o trabalho de destoca executado com tração animal, com o auxílio de um sistema de alavancas e cabos de 19,05 cm de diâmetro (3/4”), quando então foram arrancados tocos de 61,36 cm de diâmetro.

Ayres & Scoates (1928), citados por Testa (1972), descrevem outro meio de arranque de tocos onde se utiliza a tração animal combinada à máquina. Denominado “*Puxador tipo malho*”, utiliza um tronco de madeira leve (cedro, por exemplo), com diâmetro de 45,70 cm e comprimento de 76,25 cm, servindo este como a cabeça do malho. Encaixa-se à metade do tronco um cabo de madeira dura, com 15,25 cm de diâmetro e 1,82 m de comprimento. Na extremidade livre do cabo, prende-se uma corrente onde será aplicada a força. A cabeça do malho repousa sobre a base do toco e o cabo fica na posição vertical. Outra corrente pesada, provida de um gancho, prende o toco à parte mais baixa do cabo, na região de encaixe. Este método aumenta em seis vezes a força da parelha.

❖ Queima

A queima de tocos é considerada como um método extremamente econômico, que dispensa a operação de arranque, transporte, empilhamentos e permite a

destruição das raízes. Através de buracos feitos nos tocos, ou por canos de aparelhamento queimados, podem-se utilizar as correntes de ar nesta operação (Ayres & Scoates, 1928, citados por Testa, 1972).

No Japão, as experiências sobre remoção de tocos através da queima são relatadas por Yamamoto (1956), citado por Testa (1972). Com o auxílio de brocas, movidas por um gerador elétrico de $\frac{3}{4}$ H. P., abrem-se canais de 24 a 30 cm de diâmetro. Nos casos de tocos com pouca altura, os dois canais são perpendiculares entre si; já para tocos com maior altura, os canais são em “V”, sendo que o ponto de encontro é de 15 a 20 cm de profundidade do nível do solo. Esta operação normalmente é realizada no verão, removendo-se a terra com um mês de antecedência, para promover a seca da madeira e dos canais, em seguida parafinava-se a madeira ou aplicava-se resina de pinheiro. O ar era insuflado para os canais por meio de um fole, e quando a combustão era certa, colocava-se uma chaminé na parte final do canal. Porém, a pratica delimitava muito a eficiência desta operação.

❖ Explosivos

Yamasaki (1956), citado por Testa (1972), adotou a seguinte mistura para a remoção de tocos: pólvora preta (PA), fósforo amarelo (PN) e carlit (C). Os tocos arrancados foram das seguintes espécies arbóreas: *Quercus acutissima*, *Quercus glandulifera* e pinheiros. Para a introdução dos explosivos na madeira, foram abertos furos com brocas e cinzéis. Notou-se que não havia correlação entre aberturas em ângulo e aberturas retas, para os efeitos da explosão.

Prevendo o aumento demográfico nos E. U. A., Kline (1921), citado por Testa (1972), aconselha o uso de todos os recursos para a elevação da produção e, com isso, cita que a “dinamite” também deverá dar sua contribuição nas operações de desmatamento, ou seja, na remoção dos tocos. A Estação Experimental de *Wisconsin* utiliza o método de arranque de tocos utilizando-se explosivos de vários modos: explodindo-se os tocos para o rebentamento total, para rachá-los e removê-los e também, para rebentá-los e após extraí-los do solo, facilitando o manejo.

2.3. Degradação biológica da madeira

A madeira é considerada um dos materiais preferidos para a construção e utilizada em estruturas em geral, isto em função de alguns fatores: resistência mecânica elevada em relação à própria massa, matéria-prima renovável, baixo insumo energético e estética agradável. Porém, há algumas desvantagens tais como: biodegradação, flamabilidade, variações dimensionais devido à alteração da umidade, degradação por radiações ultravioletas, ácidos e bases.

Uma das etapas mais importantes do ciclo do carbono na natureza é representada pelos processos de biodegradação de materiais lignocelulósicos. A aplicação destes processos como tecnologia alternativa para a produção de polpa celulósica na indústria papelreira, aumentou consideravelmente as pesquisas nesta área (Ferraz, 1991).

Eriksson (1990) destacou que as aplicações tecnológicas dos processos de biodegradação de madeira e seus derivados necessitam de uma sólida base científica relacionada ao tema.

Na maioria das vezes os trabalhos relacionados a esta área utilizam poucos fungos, mas principalmente os pertencentes à divisão Basidiomycota. O conhecimento adquirido sobre a ação destes microrganismos sugere algumas aplicações tecnológicas tais como: tratamento de efluentes da indústria papelreira, pré-tratamento de cavacos de madeira e bagaço de cana-de-açúcar para posterior produção de polpas celulósicas e branqueamento biológico destas polpas (Ferraz, 1991).

Mendonça (1997) desenvolveu um processo alternativo para a deslignificação da madeira que combina um pré-tratamento biológico da madeira com fungos e um processo organosolve. Para tal, utilizou dois fungos, um de podridão branca, *Punctularia arthropurascens*, e outro de podridão parda, *Wolfiporia cocos*. Testes químicos com a espécie *P. arthropurascens* resultaram em perda de lignina na ordem de 4 a 20 % e uma perda mínima de celulose da ordem de 0 a 8%. Já o pré-tratamento por *W.cocos* apresentou perdas de lignina entre 5 e 14% e de celulose entre 0 e 23%. Os resultados mostraram que o pré-tratamento biológico aumentou as velocidades de deslignificação e de remoção de xilana durante o processo organosolve da madeira de *E.grandis*.

Ferraz (1990) propõe que o estudo da biodegradação da madeira pode ser dividido em duas modalidades: a primeira estuda a biodegradação natural que ocorre nos solos envolvendo vários microrganismos e a segunda estuda a biodegradação induzida ou aquela causada por um determinado microrganismo previamente inoculado sobre a madeira em condições controladas.

Estudos relacionados à biodegradação natural indicam a ocorrência de muitos tipos de microrganismos atuando simultaneamente sobre a madeira, numa sucessão de populações microbianas, sendo que cada população exerce um tipo específico de degradação, normalmente indispensável à continuidade da biodegradação (Levy, 1987).

Um aspecto interessante da biodegradação natural foi observado em madeiras podres de ilhas Chilenas; que apresentavam colonização exclusiva por algumas espécies do gênero *Ganoderma*. Zadrazil et al. (1982) e Agosin et al. (1990) sugerem que estes microrganismos inibem a colonização por outras espécies, promovendo uma degradação extremamente seletiva da lignina (madeira residual com 98 % de celulose).

A biodegradação induzida da madeira tem merecido atenção especial nos últimos anos, principalmente devido a aspectos tecnológicos ligados à indústria papelreira, onde os estudos visam à degradação seletiva da lignina durante a biodegradação (Eriksson, 1985; 1987; 1990; Jurasek & Paice, 1988; Durán et al., 1990).

Fernandez (1998) realizou um estudo sobre a atividade degradativa de fungos causadores de podridão branca em madeira de *Eucalyptus grandis*, constatando, através de testes químicos, que a espécie *Phanerochaete chrysosporium*, apresentou os menores índices de especificidade para a degradação da lignina (0,33). Já as espécies *Confertobasidium sp.*, *Phlebia sp* e *P. tigrinus*, apresentaram a maior especificidade na degradação da lignina da madeira de *E. grandis* (4,10; 3,50; 2,28 respectivamente). No caso de *Confertobasidium sp.* e *P. tigrinus* a alta seletividade foi acompanhada por consideráveis perdas de lignina (41% e 32%).

Leal (1999), através de um estudo sobre os aspectos químicos e bioquímicos da biodegradação do *Eucalyptus grandis* pelo fungo *Ceriporiopsis subvermispora*, observou que a perda de peso dos corpos de prova de madeira aumentava em função do tempo, atingindo o máximo de 11,7 % aos noventa dias. Testes químicos demonstraram que as perdas de glucana, hemiceluloses e lignina foram de 7,3, 21,6 e 27 %

respectivamente, demonstrando que o fungo é seletivo para a degradação da lignina. Os aumentos significativos nas perdas de hemiceluloses e lignina (60 e 90 dias respectivamente) ocorreram posteriormente ao aumento na produção das enzimas. O teor de holocelulose da madeira estudada permaneceu constante ao longo da biodegradação, mas a perda de viscosidade depois dos 30 dias (30%) indicou um certo grau de despolimerização. A enzima hidrolítica que apresentou maior atividade durante a biodegradação foi a xilanase (960 UI totais).

Os microrganismos se desenvolvem no interior das células da madeira e, através da produção de enzimas extracelulares, decompõem os diversos constituintes da parede celular ou substâncias químicas depositadas no lume. Dentre estas substâncias encontram-se proteínas, amido, lipídios, açúcares simples e alguns constituintes do protoplasma, de quando a célula estava viva. Também são encontrados produtos de secreção e extrativos, substâncias estas de fácil decomposição e que podem ser metabolizadas por uma enorme variedade de microrganismos, desde espécies aptas a degradar os constituintes da parede celular e outras incapazes de atuar sobre celulose, hemiceluloses ou lignina (Oliveira et al., 1986).

Käärrik (1975), citado por Oliveira et al. (1986), classifica os microrganismos com base em suas atividades enzimáticas nos seguintes grupos:

- Microrganismos que não degradam as paredes celulares enzimaticamente, mas utilizam as substâncias encontradas no lume: fungos emboloradores e fungos manchadores;
- Microrganismos capazes de promover degradação enzimática das paredes celulares: microrganismos com capacidade limitada de degradação: bactérias e fungos de podridão mole; microrganismos com elevada de degradação (fungos apodrecedores): fungos de podridão parda e fungos de podridão branca da madeira;

Tal classificação é bem ampla e não discrimina necessariamente grupos taxonômicos. Nesta classificação, diferentes espécies de um mesmo grupo taxonômico podem ocupar diferentes posições. Deve-se ressaltar que, dependendo da circunstância, uma determinada espécie de microrganismo pode atuar de forma diferente. Por exemplo, algumas

espécies de fungos emboloradores e manchadores podem, em determinada situação, provocar podridão mole, e também alguns basidiomicetos, que provocam podridão parda ou branca, podem colonizar a madeira bem antes que sejam observadas evidências de seu ataque à parede celular.

Fatores como temperatura, umidade e aeração da madeira podem determinar quais microrganismos estão aptos a colonizá-la e decompô-la, e também influenciam a velocidade da degradação (Oliveira et al., 1986).

Os microrganismos possuem diferentes faixas de tolerância e ponto ótimo de temperatura, fator que pode determinar as espécies que colonizarão o material nos diferentes estádios. A temperatura pode alterar o metabolismo dos microrganismos, sendo que a temperaturas mais baixas este tende a ser menor e a velocidade de degradação diminui.

A umidade é também um fator que condiciona a degradação da madeira por microrganismos. No interior das paredes celulares a umidade garante a máxima abertura dos capilares, facilitando a entrada das enzimas e posteriormente, a remoção dos produtos da decomposição. Teor acima de 30% de umidade é condição necessária para a degradação.

Outro fator influenciado pela umidade é a aeração da madeira. Nos casos de excesso de umidade, microrganismos anaeróbios ou microaeróbios são favorecidos (decomposição é lenta). Este fator explica a grande durabilidade de madeiras não preservadas, utilizadas como fundações submersas, e também justifica a validade da manutenção de toras submersas em água como medida preventiva contra o manchamento e apodrecimento.

A natureza e o teor dos extrativos da madeira podem influenciar na degradação. Substâncias fenólicas, que apresentam propriedades fungicidas e inseticidas, podem conferir elevada resistência à madeira. Em alguns casos apenas um composto químico confere a resistência, mas há casos em que vários são os compostos que atuam de modo sinérgico, conferindo à madeira sua resistência característica. Estes compostos não se distribuem homogeneamente pela árvore, sua maior concentração se localiza na parte externa do cerne e próxima à base da árvore, e diminuem em direção à medula e ao topo, sendo que no alburno praticamente não existem extrativos (Oliveira et al., 1986).

Kirt (1983), citado por Oliveira (1986), observou que, em tecidos de madeira com alto teor de lignina (maior ou igual a 20%), os decompositores de maior importância são da divisão Basidiomycota que possuem a capacidade de decompor a lignina.

Estima-se em 1.800 o número de espécies da Divisão Basidiomycota para o hemisfério norte, já nas regiões tropicais e hemisfério sul este número total dever ser bem maior.

Namise et al. (1959), citado por Testa (1972), realizou uma pesquisa sobre desmatamento, utilizando fungos apodrecedores, visando facilitar o arranque de tocos após o corte das árvores. Para isso foram selecionadas quatro espécies de árvores, comuns nas áreas de desbravamento: *Larix kaempferi*, *Pinus densiflora*, *Quercus spp.* e *Abies mayrina*. Os fungos selecionados para a inoculação não crescem em madeira viva. O grau de apodrecimento da madeira foi determinado pela medição em profundidade com uma agulha no interior do toco empurrada com a mão. E, através de observações a olho nú, e com um medidor de penetração do solo, verificaram-se as condições de apodrecimento. As combinações fungo x madeira mais promissoras foram:

- *Poria subacida* com *Larix Kaempferi*;
- *Poria vaporaria* e *Steccherium pulcherrimum* com *Pinus densiflora*;
- *Coriolus versicolor* e *Tyromyces sambuceus* com *Quercus spp.*;

O tempo de decomposição das madeiras citadas por ação dos fungos diminuiu para menos da metade do tempo requerido para a decomposição natural (ponto de decomposição que facilitava o desenraizamento). Os fungos *Poria vaporaria* e *Poria sudacida* reduziam em até 40 % o esforço da força-homem nos trabalhos de desenraizamento em relação aos tocos não inoculados.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo desenvolver uma metodologia alternativa para o processo de destoca de povoamentos de *Eucalyptus* spp., possibilitando o maior aproveitamento e conservação da área de plantio, utilizando-se para tal de fungos decompositores.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho isolaram-se cinco fungos, em meio de cultura para estudos laboratoriais e posterior inoculação em tocos em campo. Os fungos foram: *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, isolado 95/01 e *Pleurotus sajor caju* (Fr.) Singer, isolado 19/02, cedidos da Micoteca do Módulo de Cogumelo da Faculdade de Ciências Agronômicas “Julio de Mesquita Filho” situada no campus do Lageado, município de Botucatu SP; *Polyporus guianensis* Mont, *Pycnoporus sangüineus* e *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat, isolados de material em decomposição (tronco de *Eucalyptus spp.*) em um povoamento de *Eucalyptus spp.* nos limites da Fazenda Guatapar do grupo Votorantim (VCP Papel Celulose), no Município de Luiz Antnio, SP.

4.1. Obteno de matrizes e inoculantes

4.1.1. Matriz primária

Os trabalhos de isolamento e preservao das matrizes primárias foram realizados utilizando-se meio de cultura  base de extrato de serragem enriquecida com farelos-dextrose-gar. O meio de cultura SDA foi preparado a partir da infusão de 300g de serragem de *Eucalyptus spp.* mida, 30g de farelo de trigo, 30g de quirera de milho e 2g de

carbonato de cálcio por litro de água, que foi fervida por um período de 15 minutos. Ao término do período de fervura esta solução sofreu filtragem e foram adicionados 10g de dextrose e 15g de agar por litro de extrato. O meio foi autoclavado a uma atm por 30 minutos (Andrade, 1999).

As espécies isoladas no campo (*Pycnoporus sanguineus*, *Polyporus guianensis* e *Ganoderma applanatum*), foram identificadas taxonomicamente no Instituto de Botânica de São Paulo, pela pesquisadora Dra. Marina Capelari.

4.1.2. Matriz secundária

Como substrato para a produção da matriz secundária foram utilizadas serragem de *Eucalyptus* spp. enriquecida com farelo de trigo na proporção de 4:1 e carbonato de cálcio 2% do total da mistura para a correção do pH. A seguir, este substrato foi colocado em frascos de vidro (tipo conserva) de 800mL (ocupando dois terços do volume), sendo fechados. Para manutenção da aeração no interior dos frascos, as tampas foram perfuradas formando um orifício circular de um centímetro de diâmetro, sendo este preenchido com um tampão de algodão. A seguir, cobriu-se a tampa com papel comum para evitar o molhamento do algodão, no intuito de evitar possíveis contaminações. Os frascos foram autoclavados a 1 atm (120°C) durante 30 minutos. Este processo se repetiu após 24 horas. Após o resfriamento dos frascos, estes foram inoculados com a matriz primária, em condições assépticas (câmara de fluxo laminar), e incubados à temperatura de 24°C ± 1° C no, escuro, durante ± 20 dias, período necessário para a colonização de todo o volume do substrato (Montini et al., 2000).

4.2. Determinação do crescimento micelial

4.2.1. Em placa de Petri

Partindo-se de culturas puras (matriz primária) dos fungos anteriormente descritos, cultivados em meio de cultura à base de extrato de serragem enriquecida com farelos-dextrose-ágar, no momento em que o micélio atingiu a distância aproximada de cinco cm do final da placa, foi feita a transferência em condições assépticas, para novas placas contendo o mesmo meio de cultura de origem. Para tal operação, foram utilizados um cortador circular com 0,5 cm de diâmetro, que fez o corte do meio de cultura com micélio e depois, com o auxílio de uma alça, fez-se a transferência do disco de micélio para o centro de outra placa com o mesmo de meio de cultura.

As placas inoculadas foram incubadas a 25°C. Antes, porém, o fundo de cada placa foi demarcado com uma linha, passando pelo centro e, dessa forma, dividindo a placa em dois hemisférios. A primeira medida de crescimento linear da colônia foi realizada dois dias após a inoculação e as demais medidas foram realizadas diariamente, sempre próximas do horário em que foi realizada a inoculação, para o fechamento de ciclos de 24 horas, até a colonização total da primeira placa.

Após a análise estatística dos parâmetros relacionados ao crescimento, foram calculadas as taxas médias de crescimento micelial diário.

4.2.2. Em tubos

Para a determinação do crescimento micelial diário em tubos foram necessários alguns procedimentos estabelecidos da seguinte maneira: preparo do substrato, preparo dos tubos de ensaio, preenchimento dos tubos de ensaio, inoculação e coleta de dados.

O substrato foi preparado conforme descrito no item 4.1.2. e seguindo a ordem: pesagem dos materiais (peso seco), homogeneização, adição de água (para correção da umidade a 60%) e correção do pH.

Foram colocados 20g de substrato por tubo de ensaio com diâmetro de 2,5 cm e 20,0 cm de comprimento. Cada tubo de ensaio foi fechado com um chumaço de algodão e este, coberto com um papel. Depois de identificados, foram autoclavados à temperatura de 120°C a 1 atm, por 1 hora.

Os tubos de ensaio com substrato foram inoculados com o micélio da matriz secundária. O processo de inoculação foi realizado em câmara de fluxo laminar. Foi transferida com uma pinça, uma quantidade de inóculo suficiente para cobrir a superfície do substrato contido nos tubos de ensaio e, em todos os tubos, foi feita uma ligeira pressão para aproximar, adequadamente, o inóculo ao substrato. Após a inoculação, os tubos de ensaio foram identificados (por espécie de fungo) e, em seguida, foi marcado com 1 linha reta, no sentido longitudinal do tubo de ensaio, para a posterior coleta de dados. Ao término destes procedimentos, os tubos de ensaio foram colocados em uma incubadora, tipo BOD à 25°C (Regina, 2001).

A primeira medida foi realizada dois dias após a inoculação e as demais foram feitas sempre próximas do horário em que foi realizada a inoculação, para o fechamento de ciclos de 24 horas.

Após a análise estatística dos parâmetros relacionados ao crescimento, pôde-se calcular as taxas médias de crescimento micelial diário.

4.2.3. Análise estatística dos dados

A comparação do crescimento miceliano diário das espécies fúngicas, em cm por dia, em placa de Petri ou em tubos foi realizada pela análise de variância, com 10 repetições. Para a comparação das médias obtidas utilizou-se o teste de Tukey no nível de 5% de significância (Cochran & Cox, 1957). Análise de regressão linear também foi aplicada aos dados obtidos. Vale observar que os coeficientes de determinação das regressões estimadas foram todos superiores a 90%.

4.3. Avaliação da capacidade de degradação dos fungos *in vitro*

A capacidade dos isolados fúngicos em degradar foi observada através de um ensaio, realizado em laboratório, com corpos de prova de *Eucalyptus grandis*, retirados de uma tora do primeiro metro, próximo a base de árvore com aproximadamente 7 anos de idade. Este ensaio permitiu analisar a perda de massa (%) causada por esses fungos e verificar qual destes microrganismos tem maior vigor quanto ao processo de degradação.

4.3.1. Procedimento para o ensaio de degradação

Este ensaio foi adaptado a partir do método alternativo “Mini-agar-block” segundo Monteiro e Brazolin (1997), desenvolvido com o objetivo de buscar uma metodologia mais rápida e eficaz, usando a perda de massa com medida indireta da durabilidade natural de madeiras.

Para este ensaio foram utilizados corpos-de-prova 8 x 8 x 2 mm, confeccionados a partir de uma mesma peça de madeira, sendo a menor dimensão paralela à grã, e retirados da linha de intersecção alburno / cerne.

Os corpos-de-prova de madeira foram secos por 48 horas em estufa a uma temperatura de 105° C. Após este período, foram pesados para determinação de sua massa seca (Mi); em seguida foram numerados, colocados em imersão por 48 horas para que absorvessem umidade e esterilizados em autoclave por 30 minutos a uma temperatura de 120° C.

Paralelamente, foram preparadas placas de Petri contendo meio de cultura SDA segundo Eira et al. (1997), os quais foram inoculadas com os fungos. Preparou-se 10 placas para cada fungo. Seis dias após a inoculação das placas, os corpos de prova de madeira esterilizados foram transferidos para as placas de Petri, em número de quatro por placa, em contato direto com o micélio do fungo. As placas foram seladas com fita adesiva semipermeável, para evitar contaminações por ácaros, fungos oportunistas e bactérias, e incubadas em câmara climatizada a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e umidade relativa de $\pm 70\%$, durante oito semanas. Após este período, os corpos-de-prova foram removidos das placas

lavados com água corrente para a remoção de micélio fúngico e em seguida, foram secos em estufa por 48 horas a 105° C. Determinou-se a massa final (Mf) em balança de analítica.

A avaliação da degradação de cada corpo-de-prova foi feita por meio da perda de massa causada pelo fungo. Este valor, expresso em porcentagem, foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de perda de massa} = [(M_i - M_f) / M_i] \times 100$$

4.3.2. Análise estatística dos dados

Para a variável perda de massa em % , a comparação entre as espécies foi realizada pela aplicação de teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Zar, 1996), já que não se verificou normalidade ou homogeneidade de variâncias.

4.4. Degradação de tocos no campo

Este experimento foi realizado no campo, em povoamentos de *Eucalyptus grandis*, com aproximadamente um ano e meio de idade, utilizou-se tocos do corte anterior, sem sinais visuais de colonização fúngica, com aproximadamente 25 centímetros de diâmetro, de árvores cortadas com sete anos de idades. Para a inoculação dos tocos utilizou-se: um gerador de energia movido a gasolina, uma furadeira manual, brocas com diâmetro de meia polegada (1/2), um inoculador mecânico utilizado no cultivo do cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes*), matriz secundária dos fungos anteriormente descritos e graxa de silicone para vedação dos furos.

Cada toco foi perfurado dez vezes, no sentido axial (Figura 1). Introduziu-se a semente ou matriz secundária e, em seguida, vedou-se com graxa de silicone, para se evitar perda de umidade da semente e possíveis contaminações da mesma.

Para cada espécie fúngica, inocularam-se dez tocos, cinco dos quais foram cobertos com um filme de PVC transparente para simular uma câmara úmida e evitar perda de umidade (Figura 2).



Figura 1. Perfuração do toco.



Figura 2. Detalhe da câmara úmida.

A parcela testemunha não foi perfurada, destes somente 5 tocos foram cobertos com filme de PVC transparente.

Todos os materiais utilizados neste processo foram previamente desinfetados com álcool 70 %, a fim de se evitar possíveis contaminações.

Após 5 meses da inoculação a degradação dos tocos foi avaliada com o auxílio de um “Penetrômetro de Impacto”, utilizando-se como parâmetro, o número de impactos para se penetrar um cm de profundidade. Para isso, a superfície do toco foi dividida em 4 partes iguais a partir de duas retas que se cruzam no centro do toco e, anotado o número de impactos no centro de cada uma destas partes, a aproximadamente 10 cm de distância do ponto central do toco.

Este experimento foi realizado em três áreas distintas: Luiz Antônio, Capão Bonito e Jacaré, todas localizadas no Estado de São Paulo, para comparação do melhor aproveitamento da técnica em função do clima.

4.4.1. Análise estatística dos dados

Com relação à degradação avaliada pelo número de impactos em tocos com e sem câmara úmida, a comparação entre as espécies foi realizada pela análise de variância no esquema fatorial com transformação de raiz quadrada do número de impactos e aplicação do teste de Tukey no nível de 5 % de significância.

4.5. Verificação da patogenicidade dos isolados

Para verificação da patogenicidade, foram realizados dois experimentos distintos, um com plantas adultas e outro com plantas jovens. A finalidade destes experimentos foi verificar se algum dos fungos testados no presente trabalho tem potencial para causar lesões e posteriormente ser encarado como patógeno.

4.5.1. Verificação da patogenicidade em plantas adultas

Para este experimento foram inoculadas dez árvores de *Eucalyptus* com aproximadamente 2 anos de idade.

Cada árvore recebeu seis perfurações correspondendo ao inóculo dos cinco fungos mais a testemunha. A primeira perfuração foi feita a um metro da base e, as demais com dez centímetros de distância para baixo e dez centímetros para o lado direito. Para a inoculação dos fungos, utilizou-se um furador com diâmetro de 0,5 cm de diâmetro para furar e remover a casca da árvore. Em seguida, com o auxílio de uma alça, transferiu-se de uma placa de Petri com cultura pura um disco de meio e micélio com o igual diâmetro junto ao ferimento aberto, de forma que a face contendo micélio ficou voltada para o lenho da planta. Posteriormente recolocou-se o disco de casca removido quando da abertura do ferimento. Cada planta, cada perfuração (Siviero, 2001).

Foram realizadas avaliações aos quinze e aos trinta dias para verificação da área de desenvolvimento da lesão.

4.5.2. Análise estatística dos dados

Para a avaliação da patogenicidade dos fungos testados em plantas adultas, foi realizada a análise de variância a um fator aos 15 e 30 dias, para as variáveis comprimento e largura, externa e interna da lesão. Os dados referentes a largura e comprimento externo foram obtidos com o auxílio de uma régua comum, porém para se obter os dados referentes a parte interna foi necessário remover com o auxílio de uma lamina afiada a parte correspondente a casca, expondo o alborno e facilitando a obtenção dos dados.

4.5.3. Verificação da patogenicidade em plantas jovens

Este experimento foi realizado em casa de vegetação com mudas de um híbrido de *Eucalyptus* obtido através do cruzamento das espécies *E. grandis* e *E. urophylla*, com aproximadamente 100 dias, sendo estas foram inoculadas com os fungos anteriormente descritos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Utilizando-se dez mudas para cada fungo, mais dez testemunhas. Para inoculação utilizou-se um disco de 0,5 cm de diâmetro de cultura pura, que foi colocado em contato com a raiz da planta, aproximadamente dois centímetros abaixo do nível do substrato, com a face micelial voltada para a raiz, (Siviero, 2001).

Foi avaliada a presença de sinais característicos de lesão do sistema radicular.

4.6. Análise da composição química da madeira

Através de análises químicas dos corpos de prova de madeira, observou-se o comportamento dos fungos aqui testados, na intenção de se verificar em quais componentes da madeira cada um dos microrganismos atua, de forma a promover a degradação.

Para isso foram confeccionados corpos de prova de 5 x 5 x 1 cm (lado x lado x altura), provenientes da mesma peça de madeira de *E. grandis*, retirados da linha de intersecção entre cerne e alburno, sendo a menor dimensão paralela à grã, em número de cinco corpos de prova para cada espécie de fungo, mais cinco testemunhas.

Os corpos de prova foram inoculados da seguinte forma:

Inicialmente, inocularam-se placas de Petri contendo meio de cultura à base de extrato de serragem enriquecida de farelos, conforme descrito no item 4.1.1. Após a colonização, transferiu-se para sua superfície um corpo de prova devidamente esterilizado em autoclave. Em seguida, cobriu-se com meio de cultura colonizado por fungo de mesma espécie, oriundo de outra placa de Petri. Para isso, retirou-se o meio de cultura com o devido cuidado para que o mesmo não se espedaçasse nem tampouco se contaminasse.

Em seguida, transferiu-se a placa para um saco de polietileno de alta densidade, devidamente esterilizado em autoclave. Este foi fechado com o auxílio de um anel de PVC de ½ polegada de diâmetro, passando-se a extremidade da boca do saco pelo interior do anel de PVC e posteriormente enrolando-o ao mesmo. Por fim, completou-se o interior, o anel com algodão também esterilizado em autoclave, para trocas gasosa. Incubaram-se as placas em BOD à $\pm 25^\circ \text{C}$, com um recipiente contendo água para manutenção da umidade relativa na base. Todos os procedimentos foram realizados sob câmara de fluxo laminar na intenção de se evitarem possíveis contaminações, e a esterilização dos materiais corpos de prova, sacos de polietileno de alta densidade, anel de PVC e algodão, foi feita em autoclave a 1 atm por 30 minutos.

Após 4 meses de incubação, os corpos de prova foram retirados. Procedeu-se a uma limpeza dos mesmos a fim de removem-se os materiais propagativos dos fungos testados e deixou-se que os mesmos secassem sobre uma bandeja, à temperatura ambiente. Fracionaram-se os corpos de prova em palitos, manualmente, sempre divididos por espécies mais a testemunha. Tais palitos foram reduzidos à serragem com o auxílio de um macro-moinho Wiley e, posteriormente, a serragem obtida foi classificada na intenção de se obter a fração 40/60 mesh.

Foram efetuadas as seguintes análises químicas, para cada espécie de fungo, mais a testemunha:

- Preparação da madeira para análises químicas (TAPPI T 264 CM-97);
- Lignina Klason (TAPPI T om – 98);
- Holocelulose (deslignificação com clorito de sódio);
- Celulose (método do ácido peróxido);

4.6.1. Preparo da madeira para análise

1. Reduzir a madeira a cavacos;
2. Deixar secar ao ar e à sombra;
3. Moer no macrowiley com tela de 10 mesh. Chamar a amostra de “fração 10”, (F10);
4. Peneirar através das peneiras de 40 e 60 mesh. A serragem que atravessar a peneira de 40 e ficar retida na de 60, chamar de “fração 40/60”, (F 40/60);
5. A serragem que ficar retida na de 40 mesh moer no macro moinho Macrowiley e peneirar novamente nas peneiras de 40 e 60 mesh;
6. Misturar esta serragem com aquela obtida no item 4 e homogeneizar muito bem. Chamar o conjunto de “fração 40/60”, (F 40/60);
7. Guardar a serragem em saco plástico identificado (projeto, amostra e fração);

4.6.2. Determinação do por cento absolutamente seco da serragem (% a.s.)

1. Fazer 3 determinações em paralelo;
2. Determinar a tara da cápsula de Petri;
3. Pesar diretamente na cápsula 1,0000 g ou 2,0000 g;
4. Transferir para estufa a $105 \pm 3^\circ \text{C}$;
5. Após um tempo mínimo de 4h, retirar da estufa, esperar esfriar em dessecador e pesar;

6. Determinar a % a.s. através da expressão:

$$\% \text{ a.s.} = (\text{PS} / \text{PU}) \cdot 100$$

PS = peso da serragem após secagem na estufa;

PU = peso úmido inicial;

4.6.3. Determinação do teor de lignina

1. Pesar o equivalente a 1g a.s. de serragem e transferir para um saco de papel filtro;
2. Colocar o saco de papel filtro no corpo do extrator;
3. Fazer extração com diclorometano, etanol-tolueno (1: 2) e etanol 96° GL, durante 6 a 8 h em cada solvente, deixando secar ao ar após cada extração;
4. Fazer nova extração com água quente utilizando 3 porções de água fervendo durante 1 hora cada vez;
5. Deixar a amostra secar ao ar dentro do saco de papel filtro;
6. Transferir toda a serragem do saco de papel filtro para copo de 50ml ou 100 ml;
7. Resfriar H₂SO₄ 72% a 10 – 12° C;
8. Transferir o copo com a serragem para banho de água a 18 – 20° C;
9. Medir 15 ml de H₂SO₄ em uma proveta e transferir para o copo de vidro;
10. Agitar e manter no banho a 18 – 20° C durante duas horas. Homogeneizar periodicamente e manter o bastão de vidro dentro do copo;
11. Após 2 horas transferir a amostra para erlenmeyer de 1 litro usando 560 ml de água;
12. Ferver durante 4 horas mantendo constante o nível do erlenmeyer por adição periódica de água;
13. Após 4 horas de fervura deixar a lignina sedimentar totalmente (normalmente equivale a deixar de um dia para outro);

14. Filtrar através de cadinho de vidro sinterizado de porosidade fina passando inicialmente o sobrenadante;
15. Lavar o erlenmeyer e cadinho com água quente (quase fervendo) até que o filtrado não apresente mais reação com bromocresol verde 0,1 %;
16. Remover o cadinho, secar na estufa, esfriar em dessecador e pesar;
17. Calcular a porcentagem de lignina através da expressão:
$$\% \text{ de Lignina} = (\text{peso do resíduo} / 1,0000 \text{ g}) \times 100$$

4.6.4. Determinação do teor de holocelulose

1. Pesar o equivalente a 2,0000g a.s. de serragem e transferir para saco de papel filtro;
2. Colocar o saco de papel filtro no corpo do extrator;
3. Fazer extração com diclorometano, álcool-tolueno (1: 2) e álcool 96° GL, durante 6 a 8 h em cada solvente, deixando secar ao ar após cada extração;
4. Remover o saco do extrator e extrair em água – quente: usar 3 porções de água fervendo durante 1 hora cada vez;
5. Deixar a amostra secar ao ar dentro do saco de papel de filtro;
6. Ligar o banho-maria e mantê-lo a 70-80° C;
7. Transferir toda a serragem do saco de papel filtro para erlenmeyer de 125 ml;
8. Adicionar 55ml de água destilada;
9. Com o auxílio de uma bureta, adicionar 3 ml da solução de NaClO₂ 20 % e 2 ml de ácido acético (1:5);
10. Colocar no banho-maria, tapando a boca do erlenmeyer com copo invertido de 50 ml;
11. Após 45 minutos adicionar mais 3 ml de NaClO₂ e 2 ml de ácido acético (1:5), e retornar o erlenmeyer para o banho-maria;
12. A cada 45 minutos, repetir a operação anterior (inicial mais 4);

13. Após o último tratamento filtrar através de cadinho de vidro sinterizado tarado número 2 e lavar com 250 ml de água destilada;
14. Secar em estufa, esfriar em dessecador e pesar;
15. Calcular a percentagem de holocelulose através da expressão:
$$\% H = (\text{peso do resíduo} / 2,0000) \cdot 100$$

4.6.5. Determinação do teor de celulose pelo método do ácido peroxiacético, descrito por Wright & Wallis (1998)

1. Remover os extrativos totais de 1,0000 g de serragem. Transferir quantitativamente para um balão de fundo chato de 25 ml;
2. Adicionar ao balão 5,6 g de perborato de sódio trihidratado, 25 ml de peróxido de hidrogênio 30 % e 25 ml de ácido acético glacial;
3. Levar o balão para banho-maria em óleo (refluxo), temperatura de 120° C, por 4 horas;
4. Proceder à lavagem com 500 ml de água quente e, em seguida, com 25 ml de etanol;
5. Levar resíduo à estufa a 100 ± 5° C até peso constante. Esfriar em dessecador e pesar o cadinho;
6. Calcular o conteúdo em celulose como percentagem a partir do material de partida.

4.7. Análise da composição química do corpo de frutificação de *Ganoderma applanatum*.

As mesmas análises químicas realizados nos corpos de prova de madeira de *Eucalyptus grandes*, anteriormente descritas foram também realizadas no corpo de frutificação do fungo *Ganoderma applanatum*. Isto na tentativa de se elucidar os resultados obtidos no experimento anterior.


5. RESULTADOS

5.1. Determinação do crescimento em placa de Petri

A tabela 1 apresenta as médias do crescimento micelial diário em meio de cultura, medido em centímetros, e o desvio padrão. Nota-se que as espécies *Pleurotus sajor caju*, *Polyporus guianensis*, *Pycnoporus sangüineus* e *Ganoderma applanatum* não apresentaram diferença significativa quanto ao crescimento diário em meio de cultura SDA (serragem-dextrose-agar). Somente a espécie *Lentinula edodes* mostrou-se mais lenta quanto ao crescimento em tal meio de cultura. Porém, todas as espécies tiveram bom desenvolvimento.

Tabela 1. Médias de crescimento micelial diário (em cm) e d. p. desenvolvido em placas segundo espécies. Meio de cultura SDA, temperatura $\pm 25^{\circ}$ C.

|



Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$).

A figura 3 apresenta o crescimento micelial diário em placas de Petri, medido em centímetros lineares por dia.

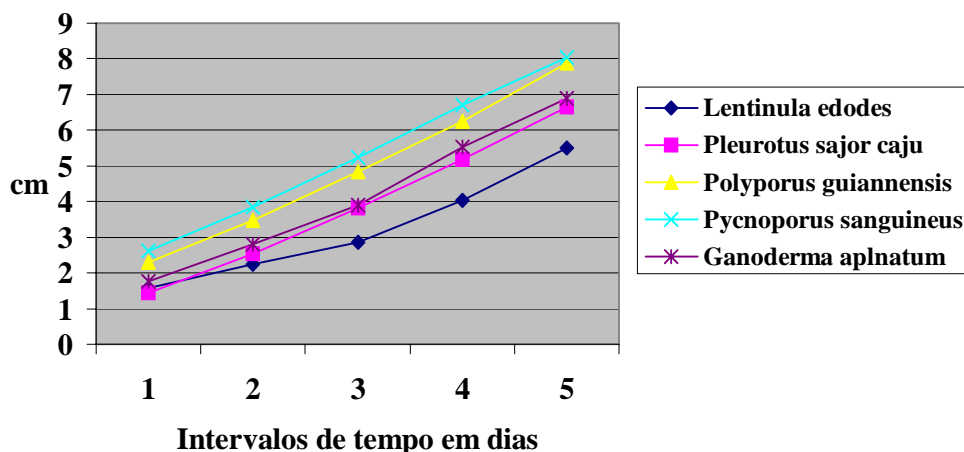


Figura 3. Crescimento micelial diário dos fungos testados em placas de Petri, meio de cultura SDA, temperatura 25° C.

5.2. Determinação do crescimento micelial em tubos

A Tabela 2 apresenta as médias (desvio padrão) do crescimento micelial diário em tubos de ensaio contendo substrato a base de serragem de *Eucalyptus* spp. medido em centímetros. Neste experimento nota-se diferença significativas quanto às médias do crescimento entre as espécies. As espécies *Polyporus guianensis*, *Pycnoporus sanguineus* e *Ganoderma applanatum* apresentaram as maiores médias de crescimento na colonização do substrato à base de serragem (item 3.1.2.). Já as espécies *Pleurotus sajor caju* e *Lentinula edodes*, apresentaram um crescimento mais lento neste tipo substrato.

Tabela 2. Médias de crescimento micelial diário (cm) e d. p. desenvolvido em tubos segundo espécies. Substrato a base de serragem de *Eucalyptus* spp., temperatura 25° C.

|



Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente ($p > 0,05$).

A figura 4 apresenta o crescimento micelial diário em tubos, medido em cm lineares por dias.

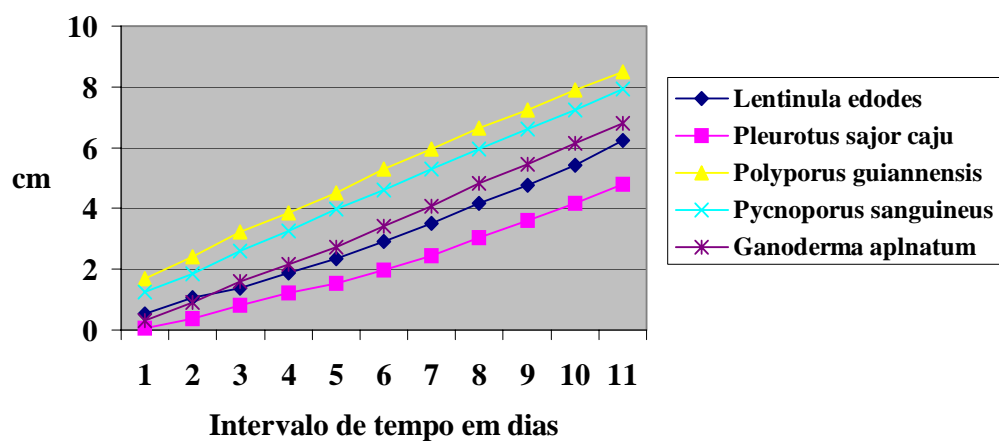


Figura 4. Crescimento micelial diário dos fungos testados em tubos.

5.3. Avaliação da capacidade de degradação dos fungos *in vitro*

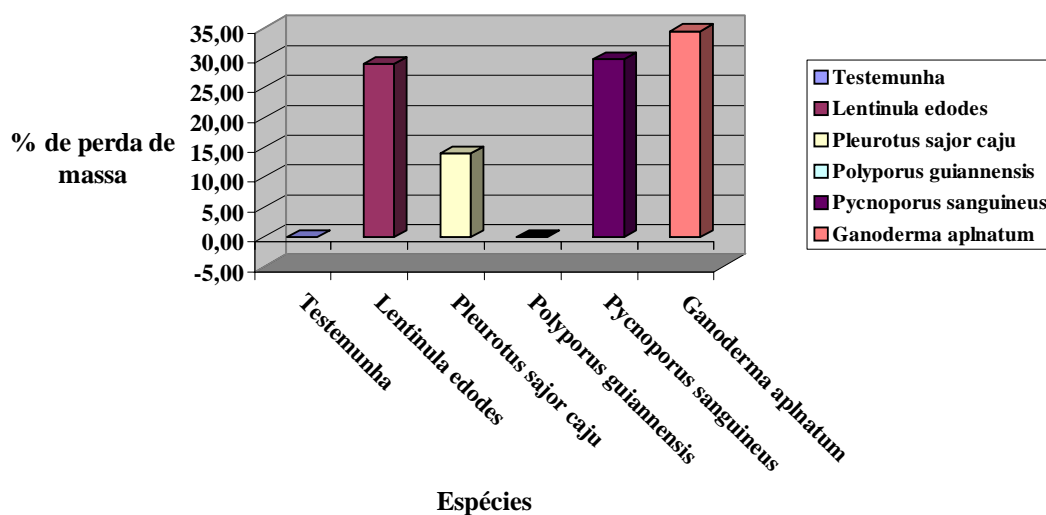
A Tabela 3 apresenta dados de medianas e percentis de perda de massa dos corpos de prova de *Eucalyptus grandis*, submetidos à ação dos fungos aqui testados. A espécie *Ganoderma applanatum* apresentou maior porcentagem de perda de massa, seguida pelas espécies *Pycnoporus sanguineus* e *Lentinula edodes*, que também apresentaram bons resultados.

Tabela 3. Valores medianos e porcentagens, de 40 repetições da perda de massa de corpos de prova de madeira de *Eucalyptus grandis* submetidos ao tratamento com basidiomicetos.

|

Médias seguidas de mesma letra não diferem quanto à perda de massa ($p > 0,05$).

A figura 5 apresenta a porcentagem de perda de massa dos corpos de prova de *Eucalyptus grandis* após a ação dos fungos testados.



5.4. Degradação de tocos no campo

As Tabelas 4, 5 e 6 apresentam os dados médios de degradação de tocos no campo, nas respectivas áreas Luiz Antônio, Capão Bonito e Jacareí, todas no Estado de São Paulo. Pode-se verificar que na ausência da câmara úmida, o número de impactos para se penetrar um cm foi maior, para todas as espécies na região de Capão Bonito. Porém, na região de Jacareí, as espécies *Lentinula edodes* e *Polyporus guianensis* não apresentaram diferença significativa quanto à presença ou ausência de câmara úmida, o mesmo foi observado na região de Luiz Antonio com relação a estas espécies mais a espécie *Pycnoporus sangüineus*.

Figura 5. Média de perda de massa de corpos de madeira de *Eucalyptus grandis* submetidos ao tratamento com basidiomicetos expressa em %.

Na Tabela 4, referente à região Luiz Antônio, verifica-se que as espécies *Pycnoporus sangüineus*, *Ganoderma applanatum* e *Pleurotus sajor caju* apresentaram maior eficiência quanto à degradação dos tocos nos tratamentos onde se utilizou a câmara úmida.

Tabela 4. Médias do número de impactos para se penetrar 1 cm sobre a superfície do toco, segundo espécies e condição ambiental (com ou sem câmara úmida), variável transformada em \sqrt{x} , Experimento de campo região de Luiz Antônio.

Letras maiúsculas comparam com e sem câmara úmida, letras minúsculas comparam espécies, médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem significativamente ($p > 0,05$).

A figura 6 apresenta as médias do número de impactos para se penetrar 1 centímetro, sobre a superfície do toco, com e sem Câmara Úmida, na região de Luiz Antonio.

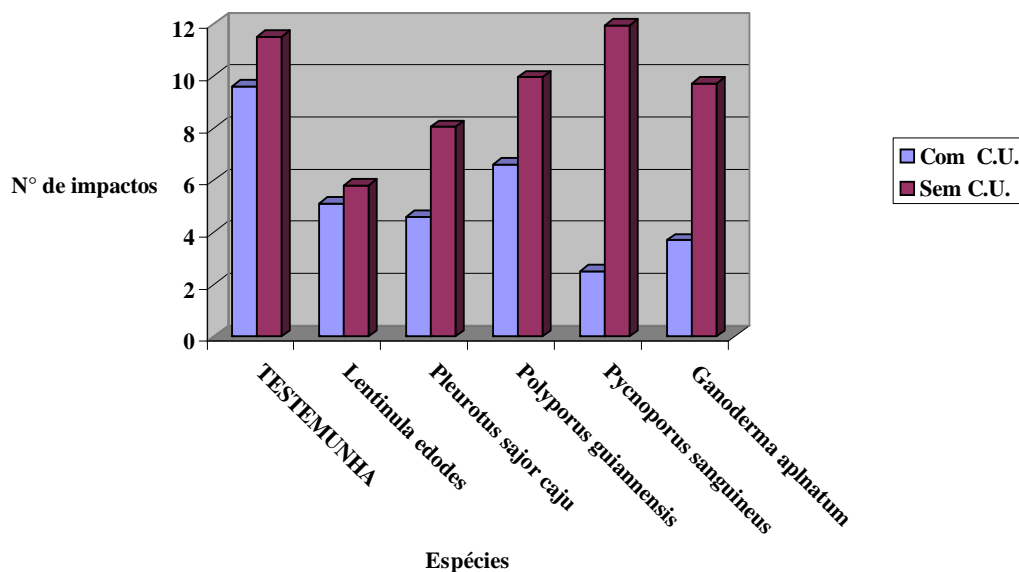


Figura 6. Média do n° de impactos para se penetrar 1 cm na superfície do toco, região Luiz Antonio.

Na Tabela 5, referente à região de Capão Bonito, notamos que há diferença significativa com relação ao tratamento testemunha quando se utilizou a câmara úmida, porém, nota-se que entre as espécies testadas não houve diferença significativa.

Tabela 5. Médias do n.º de impactos para se penetrar 1 cm sobre a superfície do toco, segundo espécies e condição ambiental (com ou sem câmara úmida), variável transformada em \sqrt{x} , Experimento de campo região de Capão Bonito.

Letras maiúsculas comparam com e sem câmara úmida, letras minúsculas comparam espécies, médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem significativamente ($p > 0,05$).

A figura 7 apresenta as médias do número de impactos para se penetrar 1 centímetro, sobre a superfície do toco, com e sem Câmara Úmida, na região de Capão Bonito.

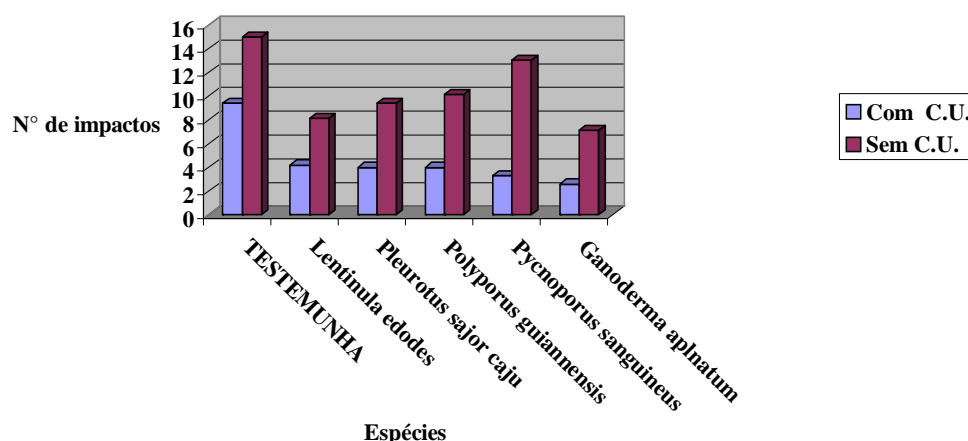


Figura 7. Média do n.º de impactos para se penetrar 1 cm na superfície do toco, região Capão Bonito.

Na Tabela 6, referente à região de Jacareí, não houve diferença significativa entre os tratamentos com câmara úmida, somente verificou-se diferença significativa nos tratamentos sem câmara úmida, onde se pode notar maior eficiência quanto à degradação dos tocos pelas espécies *Polyporus guianensis*, *Pleurotus sajor caju*, *Ganoderma applanatum* e *Lentinula edodes*, respectivamente.

Tabela 6. Médias do n.º de impactos para se penetrar 1 cm sobre a superfície do toco, segundo espécies e condição ambiental (com ou sem câmara úmida), variável transformada em \sqrt{x} , Experimento de campo região de Jacaré

--

Letras maiúsculas comparam com e sem câmara úmida, letras minúsculas comparam espécies, médias seguidas de pelo menos uma letra igual não diferem significativamente ($p > 0,05$).

A figura 8 apresenta o número de impactos para se penetrar 1 centímetro, sobre a superfície do toco, com e sem Câmara Úmida, na região de Jacareí.

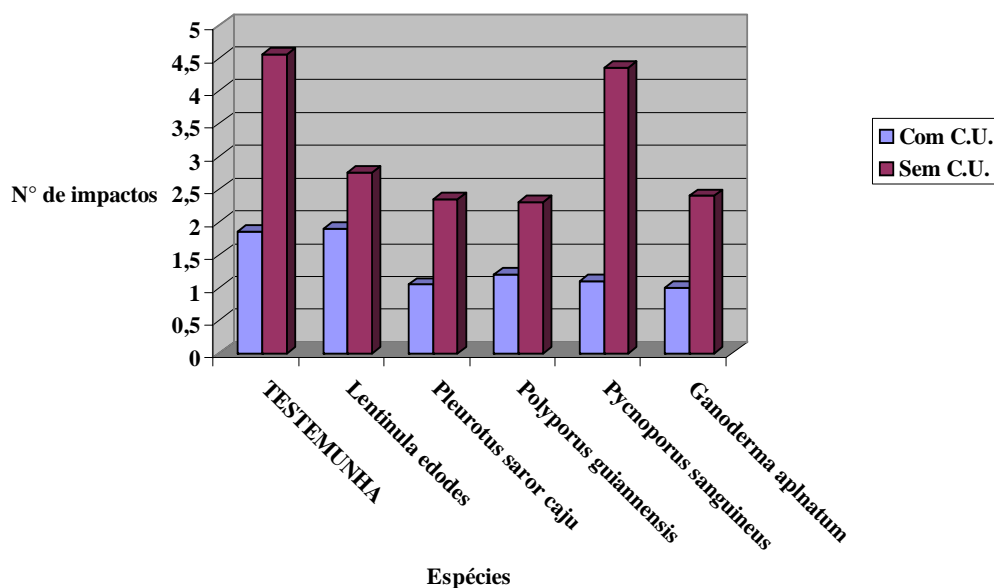


Figura 8. Média do nº de impactos para se penetrar 1 cm na superfície do toco, região Jacareí

5.5. Verificação da patogenicidade em plantas adultas

Os Tabelas 7, 8, 9 e 10 apresentam médias do desenvolvimento de lesões externa e internas. Não houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados aos 15 e 30 dias respectivamente. Pela metodologia utilizada, os fungos aqui testados não causaram lesões em plantas adultas.

Tabela 7. Médias do **comprimento externo** (em centímetros) da lesão segundo espécies e tempo de inoculação.

|

Obs: não se verificou diferença significativa quer entre as espécies ou entre tempos ($p > 0,05$).

Tabela 8. Médias da largura **externa** (em centímetros) da lesão segundo espécies e tempo de inoculação.

Obs: não se verificou diferença significativa quer entre as espécies ou entre tempos ($p > 0,05$).

Tabela 9. Médias do **comprimento interno** (em centímetros) da lesão segundo espécies e tempo de inoculação.

Obs: não se verificou diferença significativa quer entre as espécies ou entre tempos ($p > 0,05$).

Tabela 10. Médias da **largura interna** (em centímetros) da lesão segundo espécies e tempo de inoculação.

Obs: não se verificou diferença significativa quer entre as espécies ou entre tempos ($p > 0,05$).

5.6. Verificação da patogenicidade dos fungos em plantas jovens

Este experimento foi realizado com plantas jovens, quando as mesmas receberam inóculo dos fungos testados no presente trabalho conforme descrito no item 3.6.2.. Após completar trinta dias da inoculação quando se fez a avaliação para a verificação da

presença de lesões, verificou-se a ausência das mesmas, o que demonstra que segundo a metodologia utilizada, os fungos testados não causaram lesões em plantas jovens.

5.7. Análise da composição química da madeira

A Tabela 11 apresenta os valores percentuais em três repetições dos compostos químicos de corpos de *Eucalyptus grandis*, antes e após o ataque dos fungos aqui testados. A espécie *Pycnoporus sangüineus* apresentou os menores teores de lignina, holocelulose e celulose, indicando maior seletividade quanto à degradação destes compostos.

Tabela 11. Valores médios da composição química básica de corpos de prova de *Eucalyptu sgrandis* com e sem a ação dos fungos.

|

Teores de lignina, holocelulose e celulose do *Eucalyptus grandis*, antes e após a ataque dos fungos

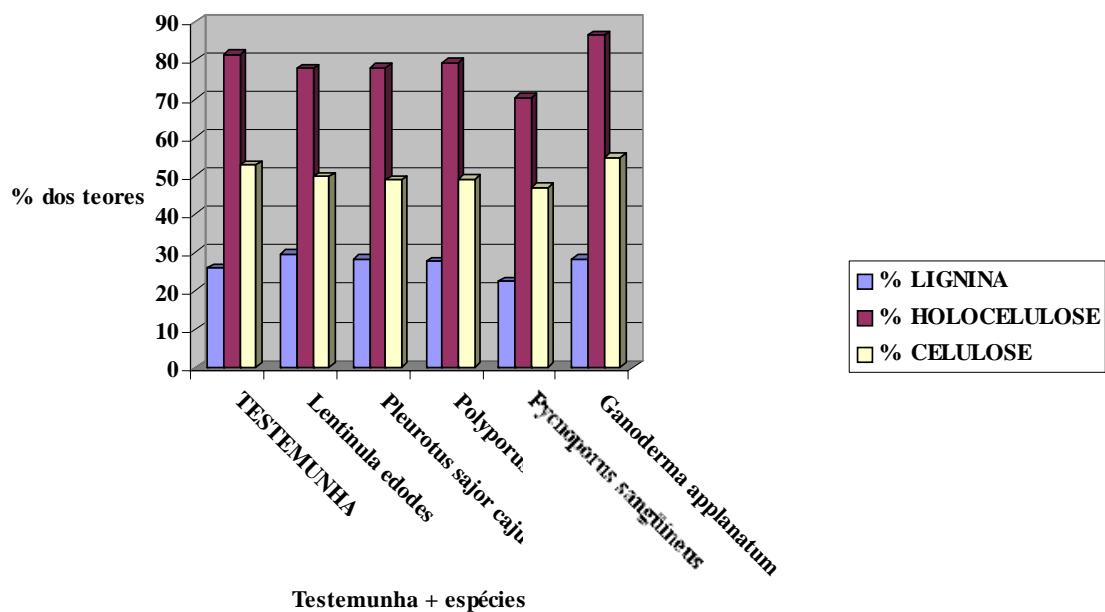


Figura 9. Teores de lignina, holocelulose e celulose, da madeira de *Eucalyptus grandis*, antes e após ao ataque dos fungos testados.

A Tabela 12 apresenta os valores médios e percentuais dos teores de lignina e holocelulose, do corpo de frutificação do fungo *Ganoderma applanatum*.

Tabela 12. Valores médios da composição química básica do corpo de frutificação do fungo *Ganoderma applanatum*.

6. DISCUSSÃO

No experimento conduzido em placas de Petri contendo meio de cultura, as espécies *Polyporus guianensis* e *Pycnoporus sanguineus* apresentaram as maiores taxas de crescimento diário; a espécie *Lentinula edodes* mostrou-se mais lenta se comparada com as demais. Já no experimento conduzido em tubos, as espécies mais lentas foram *Pleurotus sajor caju* e *Lentinula edodes*, sem apresentar diferença significativa, e as espécies de crescimento mais rápido foram as mesmas do experimento anterior. Este resultado aponta uma maior taxa de crescimento pelas espécies isoladas diretamente do campo em relação à colonização de substratos ricos e a condições favoráveis.

Regina (2001), em um estudo sobre a cinética do crescimento miceliano de *Lentinula edodes* em bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto, observou necessidades nutricionais diferentes entre as linhagens, onde para algumas linhagens a velocidade de crescimento aumentava de forma diretamente proporcional à adição de farelos. Em experimentos onde se utilizou tubo de ensaio, pode verificar o efeito da falta de oxigenação. O mesmo foi observado por Donoghue & Denison (1995), onde o crescimento do

micelial de *Lentinula edodes* era mais lento em altas concentrações de CO₂, devido a alterações do sistema enzimático, o que diminui a velocidade de miceliação.

Através de um método alternativo denominado mini-agar-block (Monteiro, 1997), foi avaliada a perda de massa causada pelos fungos testados no presente trabalho. Os resultados obtidos neste experimento apontam as maiores perdas de massa dos corpos de prova, quando inoculados com *Ganoderma applanatum*, da ordem de 34,43 % do peso inicial. Também promissoras quanto à degradação dos corpos de prova, apresentando 29,78 % e 28,98 % de perda de massa, foram as espécies *Pycnoporus sangüineus* e *Lentinula edodes*, respectivamente. Nota-se neste experimento uma diferença quanto à habilidade de degradação da madeira por parte das espécies testadas, onde a espécie *Ganoderma applanatum* apresenta-se como a mais hábil em degradar os compostos da madeira de *Eucalyptus grandis*. Esta diferença na habilidade de degradação da madeira também foi vista por Brazolin (1997), em um estudo em que avaliou a capacidade de degradação por 26 fungos causadores de podridão mole, testados em duas espécies de madeira, *Eucalyptus grandis* e *Pinus elliottii*. Observou ainda uma maior susceptibilidade por parte da espécie *Eucalyptus grandis*; a maior porcentagem de perda de massa observada foi obtida com a espécie fúngica *Acremonium kiliense*, 13,50 %.

Com o intuito de se determinar quais os fungos testados eram mais específicos quanto à degradação dos compostos de lignina, holocelulose e celulose, foram realizadas análises químicas destes teores nos corpos de prova submetidos a ação dos degradadores. Através dos resultados obtidos, pode-se observar uma diminuição dos os teores de lignina, holocelulose e celulose, com a inoculação do fungo *Pycnoporus sangüineus* quando comparado ao tratamento testemunha e aos demais fungos testados. Este fato sugere

que o fungo em questão é o mais hábil quanto à degradação destes compostos. Os demais fungos apresentaram maiores teores de lignina comparados ao tratamento testemunha. Com a intenção de elucidar os resultados referentes ao teor de lignina, foram realizadas as mesmas análises químicas, empregadas nos corpos de prova de madeira, para o corpo de frutificação do fungo *Ganoderma applanatum*. Pode-se verificar um valor de 94 % de lignina, indicando que o fungo utiliza a lignina para a formação de seu corpo de frutificação.

Quanto à porcentagem dos teores de holocelulose e celulose, apenas a madeira tratada com *Ganoderma applanatum* apresentou teores maiores que o tratamento testemunha; as demais madeiras tratadas com os fungos testados apresentaram teores menores quando comparadas ao tratamento testemunha. Leal (1999), em seu estudo sobre a biodegradação de *Eucalyptus grandis* pelo fungo *Ceriporiopsis subvermispora*, verificou perdas de glucana, hemicelulose e lignina de 7,3, 21,6 e 27% respectivamente, mostrando que o fungo é seletivo para lignina. Um estudo realizado por Fernandez (1998), sobre a atividade degradativa do *Eucalyptus grandis* por fungos de podridão branca em madeira, observou que os fungos *Confertobasidium sp.* e *P. tigrinus*, possuem alta seletividade quanto a degradação da lignina, demonstrada por perdas de lignina de 41 % e 32 %, respectivamente.

Na busca por alternativas tecnológicas para o processo de deslignificação da madeira na produção de polpa celulósica e papel, Mendonça (1997) realizou um trabalho que combina um pré-tratamento biológico da madeira com fungos e um processo Organosolv-Masat. Os resultados das análises químicas demonstraram que o fungo *Punctularia artropurpurascens* é seletivo na degradação de lignina, causando perdas entre 4 e 20 % deste componente, e perdas mínimas de celulose, 0 a 8 %. Já o fungo *Wolfiporia cocos*, causou perdas entre 5 e 14 % de lignina e 0 a 23 % de celulose.

Nos testes de campo referentes à degradação dos tocos através da inoculação dos fungos anteriormente descritos, avaliou-se o número de impactos para se penetrar 1 cm com o aparelho conhecido por Penetrômetro de Impacto. Nos tratamentos com a presença de câmara úmida, o número de impactos foi menor do que nos tratamentos sem câmara úmida, para todos os fungos testados nas regiões de Luiz Antonio e Capão Bonito. Na região de Jacareí, não houve diferença significativa entre os tratamentos com e sem câmara úmida, sob ação dos fungos *Lentinula edodes* e *Polyporus guianensis*; já para os demais fungos houve diferença significativa entre os tratamentos com e sem câmara úmida. Na região de Jacareí, não só o número de impactos foi menor do que nas outras áreas, como se pode notar através de observações visuais, que os tocos inoculados estavam bem mais degradados que nas demais regiões, isto para os tratamentos com e sem câmara úmida. Namise et al. (1959) citado por Testa (1972), no estudo da destoca com o auxílio de fungos decompositores de madeira, observou que o tempo de decomposição natural dos tocos de *Larix Kaempferi*, *Pinus densiflora*, *Quercus spp.* e *Abies mayrina*, diminuía para menos da metade do tempo requerido para a decomposição natural (ponto de decomposição que facilitava o desenraizamento).

A câmara úmida normalmente é utilizada nos procedimentos de diagnose de doenças fúngicas, principalmente nos casos de materiais onde não estão presentes as estruturas reprodutivas. O propósito da câmara úmida é o de proporcionar condições de umidade para o bom desenvolvimento de fungos ou bactérias (Duarte, 199_).

Normalmente a avaliação de doenças em plantas é realizada com infecções naturais ou em plantas inoculadas artificialmente no campo ou ambiente controlado (Siviero et al., 2002). Fazendo-se uso de uma metodologia aplicada ao estudo sobre métodos

de inoculação e avaliação de doenças causadas por *Phytophthora* em citros realizado por Siviero (2001), foram testados os fungos anteriormente descritos, para a verificação da patogenicidade. Os resultados das inoculações em plantas adultas não apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento testemunha. No experimento onde se inocularam plantas jovens não se verificou formação de lesão. Estes resultados demonstram que segundo a metodologia utilizada, os fungos testados não são patogênicos. O método em questão foi descrito por Rossetti em 1947, e continua sendo o mais utilizado em inoculações para estudos de gomose em condições controladas e de campo (Siviero et al., 2002).

6.1. Considerações finais

Observando os resultados obtidos nos experimentos realizados neste trabalho, nota-se que as espécies *Ganoderma applanatum* e *Pycnoporus sanguineus* obtiveram bons resultados quanto à degradação da madeira de *Eucalyptus grandis*, “*in vitro*” e no campo, se comparadas aos outros fungos aqui testados. Tais espécies, por serem isoladas do campo, são adaptadas a condições adversas de ambiente, e por isso mostram-se mais agressivas e eficientes quanto à colonização e degradação da madeira.

As análises químicas dos compostos da madeira serviram como instrumento para verificação da capacidade dos fungos em degradar os compostos de lignina, hoclulose e celulose. Os resultados onde se verificou teores de lignina maiores que o do tratamento testemunha, sugerem o desenvolvimento de novos estudos a fim de se elucidar tais resultados.

Como se pode verificar, a espécie *Ganoderma applanatum* não só obteve bons resultados nos experimentos de degradação da madeira mas, visualmente, a madeira colonizada por este fungo mostra-se mais quebradiça, leve e com aspecto mais avançado de degradação que as demais; nota-se através da pressão da mão que esta tem menor resistência.

De modo geral, a metodologia proposta neste trabalho mostrou-se promissora, mas é necessário o aprimoramento da técnica, principalmente no que se refere à inoculação, furação dos tocos, vedação dos furos e material empregado para a câmara úmida. Também se faz necessário a realização de novos testes envolvendo outras espécies de fungos, pois o número de espécies da divisão Basidiomycota com atividades envolvendo a biodegradação de materiais lignolíticos é enorme, não faltando material a ser estudado.

7. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- A espécie *Polyporus guianensis* é mais eficiente na colonização “in vitro” (meio de cultura e substrato);
- A espécie *Ganoderma applanatum* é mais eficiente, quanto à degradação “in vitro”, causando as maiores perdas de massa dos corpos de prova de *Eucalyptus grandis*;
- A câmara úmida melhora as condições de ambiente, favorecendo o desenvolvimento dos fungos e à colonização dos tocos;
- É possível se obter a degradação dos tocos de *Eucalyptus grandis*, através da utilização de fungos;
- As espécies *Ganoderma applanatum* e *Pycnoporus sanguineus*, são promissoras quanto à degradação de tocos de *Eucalyptus grandis* em florestas;
- Segundo a metodologia utilizada, os fungos testados não são patogênicos;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, F.A.. Efeitos de fungos contaminantes na produção de shiitake (*Lentinula edodes* (Berk) Pegler) em toras de *Eucalyptus saligna* SM. Botucatu / SP, 1999. p. 61
Dissertação (Mestrado, Agronomia / área de concentração Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas Júlio de Mesquita Filho, UNESP.
- BRAZOLIN, S.. Podridão mole em madeira de *Tabebuia* sp. (*Ipê*) em torre de resfriamento de água: identificação e avaliação da degradação dos fungos e alterações na estrutura anatômica da madeira. Piracicaba, SP, 1997. 127 p. Dissertação, (Mestrado em Ciências, área de concentração: Ciências e Tecnologia de Madeiras) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP.
- CHARÃO, C., GIRARDI, G.. Florestas que salvam florestas., 132 ed. rev. [s.l.], Editora Globo, 2002. Revista GALILEU. Fonte site <http://galileu.globo.com/>
- COCHRAN, W. G., COX, G. M.. Experimental designs. Singapore. John Wiley & Sons, 2º ed., 1957. p. 611.
- DONOGHUE, J.D., DENISON, W.C.. Shiitake cultivation: gas phase during incubation influences productivity. Mycologia, v.87, p.239-44, 1995.
- DUARTE, V.. Técnica da câmara úmida. Porto Alegre / RS. Departamento De Fitossanidade, Faculdade De Agronomia – UFRGS. [199-].
- DURÁN, N., FERRAZ, A., MANSSILA, H.. Biopulping: A new view on wood delignification. Arg. Biol. Tecnol., 1990. v. 33, p. 295 -315.

- EIRA, A. F., MONTINI, R. M. C., ICHIDA, M. S., MARINO, R. H., BRAGA, G. C., SHENG, Y. W., SILVA, J.. Manual de cultivo do shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler). Botucatu / SP, 1997. p. 38. FEPAF – Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais. Faculdade de Ciências Agrônômicas Júlio de Mesquita Filho, UNESP.
- ERIKISSON, K. E.. Biotechnology in the pulp and paper industry. Wood Sci. Technol, 1990. v. 24, p. 79 – 101.
- ERIKISSON, K. E.. Swedish developments in biotechnology related to the pulp and paper industry. Tappi J., 1985. p 46 – 77.
- ERIKISSON, K. E.. Breakthroughs in biotechnology show promise for paper industry. Pulp & Paper, 1987. p. 114 – 117.
- FERNANDEZ, A. M. S.. Caracterização química e ultraestrutural da atividade degradativa de fungos de decomposição branca em madeira de *Eucalyptus grandis*. Lorena / SP, 1998. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, FAENQUIL.
- FERREIRA, C.A.. Desbravamento de Terras. Seminário, apresentado na disciplina de Formação e Manejo de Povoamentos Florestais do curso de Pós-Graduado de Fitotecnia. Piracicaba, 1971. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP.
- FERRAZ, A.. Contribuição ao estudo do ascomiceto *Chrysonilia sitophila*: biodegradação de madeira e seus componentes. Campinas / SP, 1991. p. 113. Tese (Doutorado, Departamento de Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- FONSECA, S. M., OLIVEIRA, R. C. & SILVEIRA, P. N. Seleção da árvore industrial. Revista Arvore, v.20, p. 69-85, 1996.
- FONSECA, S. M.. Preparo do solo para implantação de florestas. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 1978. 30 p
- GALETI, P. A.. Conservação do solo, reflorestamento e clima. 2. edição. Campinas - SP, Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1973. p. 279.
- HASSE, G., PICCOLO, G.. Eucalipto. 170 ed. rev. [s.l.], Editora Globo, 1999. Revista Globo Rural. Fonte site <http://globorural.globo.com/>

- HUDSON, H.J.. Fungal Biology. Contemporary Biology, editor Edward Arnold (Publishers) Ltd, 41 Bedford Square. London, 1986. 298 p.
- JURASEK, L., PAICE, M. G.. Biological treatments of pulps. BIOMASS, 1988. v. 15, p. 103 – 108.
- LEAL, A. M. C.. Biodegradação de *Eucalyptus grandis* pelo fungo de decomposição branca *Ceriporiopsis subvermispora*: aspectos químicos e bioquímicos. Lorena / SP, 1999. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, FAENQUIL.
- LEVY, J. F.. The natural history of the degradation of wood. Phil. Trans. R. London Soc., 1987. p. 423 – 433.
- LIMA, W. P.. Impacto Ambiental do Eucalipto - 2. ed., Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- MENDONÇA, R. M. T.. A biodegradação de *Eucalyptus grandis* pelos fungos *Punctularia arthropurpurascens* e *Wolfiporia cocos* como um pré-tratamento para o processo de deslignificação ORGANOSOLV-MASAT. Lorena / SP, 1997. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, FAENQUIL.
- MONTEIRO, M.B.B.. Método alternativo de ensaio acelerado para avaliação da resistência natural de madeiras ao ataque de fungos apodrecedores. Piracicaba / SP, 1997. 58 p. Dissertação (mestrado em Ciências e Tecnologia de Madeiras). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP.
- MONTINI, R.M.C., EIRA, A.F., REGINA, M., ANDRADE, F.A.. Avaliação do crescimento de linhagens de *Lentinula edodes* (Berk) Pegler em meio de cultura e na produção de inoculantes. II Simpósio de Energia na Agricultura, novembro de 2000, Botucatu / SP, Faculdade de Ciências Agronômicas Júlio de Mesquita Filho, UNESP.
- MORAES, C.A., FERNANDES, P.S.. Erradicação química de touças de *Eucalyptos sp.*. Dados parciais DOW. 1982.
- OLIVEIRA, A. M. F., LELIS, A. T., LEPAGE, E. S., LOPEZ, G. A. C., OLIVEIRA, L. C. S., CAÑEDO, M. D., MILANO, S.. Agentes destruidores de madeira. In: LEPAGE, E. S. (Coord.), OLIVEIRA, A. M. F., LOPEZ, G. A. C., CHIMELO, J. P., OLIVEIRA, L. C. S., CAÑEDO, M. D., CAVALCANTE, M. S., IEIO, P. K. Y., ZANOTTO, P. A.,

- MILANO, S.. Manual de preservação de madeiras. São Paulo, 1986. p. 99-278. v. 1. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, Divisão de Madeiras.
- ONOFRE, F. F., DAMACENO, A. C. F., VALE, C. F., FURTADO, E. L.. Modelo de degradação de tocos remanescentes em povoamentos de eucalipto. XIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, outubro de 2001, Bauru, SP.
- REGINA, M.. Cinética do crescimento miceliano de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler em bagaço de cana-de-açúcar e serragem de Eucalipto. Botucatu / SP, Janeiro de 2001. p. 76. Dissertação, (Mestrado em Agronomia, área de concentração – Energia na Agricultura). Faculdade de Ciências Agrônômicas Júlio de Mesquita Filho, UNESP.
- SAAD, O.. Máquinas e técnicas de preparo inicial do solo. São Paulo, SP, NOBEL, 1984. p. 98.
- SANT’ANNA, A.. Cultivo do cogumelo *shiitake Lentinula edodes* (Berk) Pegler, em serragem e em toras de eucalipto. Rio Claro, 1998. 162 p. Dissertação, (Mestrado em Ciências Biológicas, área de Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro.
- SANTOS, C. R.. Métodos não-convencionais para determinação de celulose como parâmetro de seleção de árvores matrizes visando a produção de polpa KRAFT – AQ. Piracicaba / SP, maio de 2000. p. 117. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração – Ciências e Tecnologia de Madeiras). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP.
- SCHARF, R.. Florestas para o desenvolvimento, 135 ed. rev. [s.l.], Editora Globo, 2002. Revista GALILEU. Fonte site <http://galileu.globo.com/>
- SILVA, J. R., WADT, L. G.. Destocamento por desintegração em *Eucalyptus saligna* SMITH. In: XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, II Congresso Latino Americano de Engenharia Agrícola, 1996, UNESP – Bauru, SP.
- SIMÕES, J.W., BRANDI, R.M., LEITE, N. B., BALLONI, E. A.. Formação, manejo e exploração de floresta com espécies de rápido crescimento. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Brasília, 1981. 131 p.
- SIVIERO, A.. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasítica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbrido de Citrus sunki VS. *Poncirus trifoliata* a gomose. Botucatu / SP, julho de 2001. p. 114. Tese, (Doutorado em Agronomia, área de

concentração – Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agrônomicas Júlio de Mesquita Filho, UNESP.

SIVIERO, A., FURTADO, E. L., MACHADO, M. A.. Métodos de inoculação e avaliação de doenças causadas por *Phytophthora* em citros. LARANJA: revista técnico-científica de citricultura. Cordeirópolis, Instituto Agrônomico/Centro APTA Citros Sílvio Moreira. 2002, v. 23, p.203 –219.

TESTA, A.. Desbravamento de terras incultas: estudo do desmatamento com lâmina cortadora de árvores e com correntão. Piracicaba, SP, 1972. p. 228. Tese, (Doutorado em Agronomia, Departamento de Engenharia Rural) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP.

TESTA, A.. Mecanização do desmatamento: as novas fronteiras agrícolas. São Paulo, SP. Editora Agronômica Ceres LTDA., 1983. p. 313.

WRIGHT, P. J., WALLIS, A. F. A.. Rapid determination of cellulose in plantation eucalypt woods to predict kraft pulps yields. Tappi Journal, Mar. 1978. v. 61, p. 41 – 44.

ZAR, J. H.. Biostatistical analysis. New Jersey. Prentice Hall, 1996. p. 718.