

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

**SELEÇÃO DE FUNGOS DEGRADADORES DE MADEIRA PARA USO NA  
DESTOCA BIOLÓGICA DE *EUCALYPTUS* SPP.**

**DJANIRA RODRIGUES NEGRÃO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu,  
para obtenção do título de Mestre em Agronomia  
(Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP

Julho – 2011

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

**SELEÇÃO DE FUNGOS DEGRADADORES DE MADEIRA PARA USO NA  
DESTOCA BIOLÓGICA DE *EUCALYPTUS* SPP.**

**DJANIRA RODRIGUES NEGRÃO**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marli Teixeira de Almeida Minhoni  
Co-orientador: Prof. Dr. Edson Luís Furtado

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da UNESP - Campus de Botucatu,  
para obtenção do título de Mestre em Agronomia  
(Proteção de Plantas).

BOTUCATU-SP

Julho – 2011

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

N385s Negrão, Djanira Rodrigues, 1979-  
Seleção de fungos degradadores de madeira para uso na destoca biológica de *Eucalyptus* spp. / Djanira Rodrigues Negrão. - Botucatu : [s.n.], 2011

xiii, 95 f. : ils., gráfs., tabs., fots. color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2011

Orientador: Marli Teixeira de Almeida Minhoni

Co-orientador: Edson Luiz Furtado

Inclui bibliografia

1. *Eucalyptus* spp. 2. Destoca biológica. 3. Degradação da madeira. 4. Podridão branca. I. Minhoni, Marli Teixeira de Almeida. II. Furtado, Edson Luiz. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS**

**CAMPUS DE BOTUCATU**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO: "SELEÇÃO DE FUNGOS DEGRADADORES DA MADEIRA PARA USO  
NA DESTOCA BIOLÓGICA DE EUCALYPTUS UROGRANDIS"**

**ALUNA: DJANIRA RODRIGUES NEGRÃO**

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI  
CO-ORIENTADOR: EDSON LUIZ FURTADO**

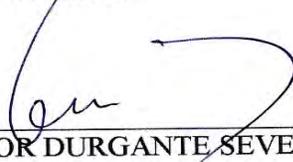
Aprovado pela Comissão Examinadora



\_\_\_\_\_  
PROFA. DRA. MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI



\_\_\_\_\_  
PROF. DR. CELSO GARCIA AUER



\_\_\_\_\_  
PROF. DR. ELIAS TAYLOR DURGANTE SEVERO

Data da Realização: 06 de julho de 2011.

*Dedico este trabalho especialmente aos meus queridos pais*

*Elpídio e Maria Aparecida*

*E aos meus inesquecíveis avós,*

*Benedito, Elvira e Pedro (in memoriam) e avó Magdalena*

*E a todos que fazem pesquisa com dedicação.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo presente diário da vida e por preencher meu coração de esperança e fé... E a Santo Expedito, por me escutar...

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agronômicas, pela oportunidade de realização deste curso. Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À querida Professora Marli Teixeira de Almeida Minhoni, pela orientação, amizade, confiança, ensinamentos e agradável convívio, além da paciência e cuidado na elaboração deste trabalho.

Ao estimado Professor Edson Luís Furtado, principalmente pela amizade, confiança, agradável convívio e pelos conselhos.

Ao meu querido Tadeu, pelo amor, carinho, compreensão, pela feliz convivência, e também pela ajuda em todas as fases desta pesquisa e na minha vida...

A toda minha família, meus queridos tios e tias, primos e primas pela agradável convivência de sempre... Aos meus irmãos, Élcio, Maisa, Maria e Alice pela força e amizade, durante toda a minha vida... E aos meus queridos sobrinhos Hiago, Taisa, José Victor, Matheus e Maiara, pela inocência da infância e pelos alegres momentos.

Às queridas amigas Amanda Cassetari, Lucivane, Juliana Cruz, Karol Dória, Maria Peres, Patrícia Martins, Sthefany Viana, pelo incentivo e conselhos, pelas risadas e, principalmente, pelo sentimento recíproco de amizade e confiança.

Ao César e Adriana Arruda, pelo inestimável apoio e amizade.

Ao Sr. Tadeu Antônio, Mary Neide e Marina pelo agradável convívio diário, pelo apoio, amizade e carinho.

Às funcionárias da FCA, Maria de Fátima, do Laboratório de Microbiologia, e Liliane, do Departamento de Ciência Florestal, pela amizade e ajuda. Aos funcionários do Setor de Defesa Fitossanitária, Beá, Sr. Domingos, Norberto e à Maria do Carmo, pelas colaborações. A todos os funcionários da biblioteca da FCA, em especial à Denise, Nilson, Célia, Ana Lúcia, Janaína, Airton, Solange, Maria Inês e Ermete, pelas colaborações e boa vontade de sempre. Às funcionárias da Seção da Pós-Graduação, Jaqueline, Marlene, Taynan e Kátia, pelos cuidados dispensados. Aos Srs. Silvio, Cavallari e Soler, da marcenaria da

FCA pelos cuidados e pela dedicação na confecção dos corpos-de-prova e aos outros materiais importantes para a realização deste trabalho. Ao Sr. Aparecido Agostinho, o Seu Didão, pela inestimável ajuda e disposição de sempre, além do agradável convívio e boa vontade.

Aos meus companheiros de laboratório Fabrício, João, Diego, Meire, pela amizade. Aos técnicos do Módulo de Cogumelos, Sr. Toninho Fogaça e Ivando Fogaça, pela ajuda e pelo bom convívio. Aos caros colegas de Pós-Graduação, Denise, Maria de Jesus, Michelle, Juliana Nogueira, Mônica, Ana Carolina, Tatiane, Martha, Kelly, Fabiano (Kioski), Haroldo, Júlio, William, Ronaldo (Genérico), Marcelo, Ronaldo, Lucas, Mariane (Shoyu), Amanda (Xiu) e a todos os outros parceiros de disciplinas pelo agradável convívio, companheirismo e amizade. À Adriana Itako (Japs), Karina Tumura (Babaçu), e Érika (Cachoeira) pela amizade e bom convívio.

À Marina Capelari e Adriana de Mello Gugliotta, do Instituto de Botânica de São Paulo, pela disposição na identificação dos fungos e pelos ensinamentos.

À Maria Aparecida, do Viveiro de mudas Avaré, pela amizade, confiança, agradável convívio, interesse neste trabalho, e pela doação das mudas de eucalipto.

Ao Horto Florestal de Avaré, pela doação da madeira de *Pinus*, e em especial ao Senhor Hideyo Aoki, pela amizade e contribuições para a realização deste trabalho.

À Eucatex, pela doação da madeira de usada neste trabalho e em especial ao Sr. Eduardo Bernardes, pela inestimável ajuda.

À empresa Conpacel (Suzano), pela doação da madeira de eucalipto, e aos funcionários, Sr. Cláudio Oriani, Alex Passos dos Santos, Jansen Barrozo Fernandes e Isnar Aparecido Theodoro, pela ajuda e apoio dado à continuação deste trabalho.

Ao Professor Cláudio Angeli Sansígolo pela orientação e apoio nas análises químicas da madeira. Aos professores Elias Taylor e Celso Auer, pelas valiosas contribuições e importância, dadas a este trabalho durante a minha defesa. Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, Antonio C. Maringoni, Marcelo A. Pavan, Renate K. Sakate, Carlos G. Raetano, Edson L. Baldin, Silvia Renata e Carlos F. Wilcken, e aos demais professores do Setor de Defesa Fitossanitária pelos ensinamentos e contribuições à minha formação.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE TABELAS .....	XII
RESUMO .....	01
SUMMARY .....	03
1. INTRODUÇÃO .....	05
2. OBJETIVOS .....	08
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	09
3.1. Importância econômica do <i>Eucalyptus</i> spp. ....	09
3.2. Características da madeira do <i>Eucalyptus</i> spp. ....	11
3.3. Tratos culturais na cultura do eucalipto .....	13
3.4. Fungos degradadores da madeira .....	14
3.4.1. Fungos de podridão branca .....	15
3.4.2. Fungos de podridão marrom .....	16
3.4.3. Fungos de podridão macia ou mole .....	17
3.5. Uso de fungos apodrecedores da madeira na destoca natural .....	18
3.6. Enzimas produzidas por fungos degradadores da madeira .....	19
3.6.1. Enzimas ligninolíticas .....	20
3.6.2. Enzimas hidrolíticas .....	21
4.0. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
4.1. EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DOS FUNGOS EM PLANTAS VIVAS .....	26
4.2. EXPERIMENTO 2 – CRESCIMENTO MICELIAL EM DIFERENTES SUBSTRATOS E TEMPERATURAS .....	30
4.2.1. Em serragem enriquecida .....	30
4.2.2. Em meios de cultivo .....	32
4.3. EXPERIMENTO 3 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS FUNGOS .....	34
4.3.1. Lacase .....	34
4.3.2. Protease .....	34

4.3.3. Pectinase 5 .....	35
4.3.4. Pectinase 7 .....	35
4.3.5. Celulase .....	35
4.3.6 Lipase .....	36
4.4. EXPERIMENTO 4 – DEGRADAÇÃO DO EUCALIPTO UROGRANDIS E ANÁLISE QUÍMICA DA MADEIRA .....	37
4.4.1 Coleta e preparo das madeiras: corpos-de-prova e alimentadores .....	37
4.4.2. Solo .....	38
4.4.3. Preparo dos frascos e inoculação .....	38
4.4.4. Variáveis analisadas .....	40
4.4.5.1. Perda de massa dos corpos-de-prova .....	40
4.4.5.2. Análise química dos corpos-de-prova, após a degradação .....	40
5.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
5.1. EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DOS FUNGOS EM PLANTAS DO EUCALIPTO UROGRANDIS .....	46
5.2. EXPERIMENTO 2 – CRESCIMENTO MICELIAL EM DIFERENTES TEMPERATURAS .....	53
5.2.1. Em serragem enriquecida .....	53
5.2.2. Em meios de cultura .....	57
5.3. EXPERIMENTO 3 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS FUNGOS .....	61
5.4. EXPERIMENTO 4 – DEGRADAÇÃO DO EUCALIPTO UROGRANDIS E ANÁLISE QUÍMICA .....	66
5.4.1. Degradação acelerada .....	66
5.4.1.1. Perdas de massa em 50% de umidade .....	67
5.4.1.2. Perdas de massa em 100% de umidade .....	70
5.4.2. Análise química da madeira degradada .....	72
6.0. Conclusões gerais .....	77
7.0.Referências bibliográficas .....	78

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Umidade e temperatura relativas na estufa, após a inoculação com os fungos basidiomicotas em plantas de eucalipto urograndis .....	27
2. Inoculação de plantas de <i>Eucalyptus urograndis</i> . <b>A</b> e <b>B</b> : retirada da casca com furador de cobre; <b>C</b> : discos de meio de cultura colonizado pelo fungo; <b>D</b> : inoculação do fungo no local do ferimento; <b>E</b> : ferimento com disco de micélio colonizado, protegido com algodão úmido; <b>F</b> : vedação do ferimento com fita adesiva.....	28
3. Inoculação da serragem enriquecida com disco de micélio de 10 mm de diâmetro, no ponto central da superfície do substrato .....	31
4. Acompanhamento do crescimento micelial em serragem enriquecida, com auxílio de oito linhas com divisão milimétrica, até o percurso final de 7,5 cm .....	31
5. Avaliação do crescimento micelial em meios de cultura. <b>A</b> : Placa de Petri fechada. <b>B</b> : Disco de meio de cultura contendo micélio fúngico, depositado no centro da placa, com duas linhas perpendiculares entre si, marcadas no fundo da placa de Petri. <b>C</b> : Acompanhamento do crescimento micelial em meio de cultura .....	33
6. Materiais usados para o ensaio da degradação acelerada da madeira de eucalipto urograndis. <b>A</b> : Acomodação dos corpos-de-prova em placas de Petri, para esterilização. <b>B</b> : Corpo-de-prova após autoclavagem. <b>C</b> : Alimentador colonizado sobre o solo; <b>D</b> : Alimentador e corpo-de-prova colonizado por fungo .....	39

7. Lesões externas (acima) e internas (abaixo) de plantas de eucalipto urograndis, avaliadas aos 60 dias após a inoculação dos fungos pelo método do disco. <b>A e F:</b> <i>Pycnoporus sanguineus</i> ; <b>B e G:</b> <i>Lentinus bertieri</i> ; <b>C e H:</b> <i>Xylaria</i> sp.; <b>D e I:</b> <i>Lentinula edodes</i> ; <b>E e J:</b> Testemunha, inoculada com disco de meio de cultura sem micélio .....	51
8. Crescimento micelial (cm) de <i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>Lentinus bertieri</i> , <i>Xylaria</i> sp., <i>Lentinula edodes</i> e <i>Stereum ostrea</i> , em serragem enriquecida a 23, 27 e 31°C, após nove dias de inoculação .....	56
9. Crescimento micelial (cm) de <i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>Lentinus bertieri</i> , <i>Xylaria</i> sp., <i>Lentinula edodes</i> e <i>Stereum ostrea</i> , em serragem enriquecida a 23, 27 e 31°C, após nove dias de inoculação .....	60
10. Halos de inibição formados pelos fungos, através da produção de enzimas, em meios de cultura específicos. <b>A:</b> produção de lacase por <i>Lentinus bertieri</i> . <b>B:</b> produção de protease por <i>Pycnoporus sanguineus</i> . <b>C:</b> produção de pectato liase por <i>Stereum ostrea</i> . <b>D:</b> produção de pectina polimerase por <i>Lentinula edodes</i> . <b>E:</b> produção de celulase por <i>Pycnoporus sanguineus</i> . <b>F:</b> produção de lipase por <i>Xylaria</i> sp. ....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
<p><b>1.</b> Diâmetro (cm) das lesões externas no caule de eucalipto urograndis aos 30 e 60 dias após a inoculação com os fungos <i>Pycnoporus sanguineus</i>, <i>Lentinus bertieri</i>, <i>Xylaria</i> sp., <i>Lentinula edodes</i>, <i>Stereum ostrea</i> e um isolado não identificado*.....</p>	48
<p><b>2:</b> Diâmetro (cm) das lesões internas no caule de eucalipto urograndis aos 30 e 60 dias após a inoculação com os fungos <i>Pycnoporus sanguineus</i>, <i>Lentinus bertieri</i>, <i>Xylaria</i> sp., <i>Lentinula edodes</i>, <i>Stereum ostrea</i> e um isolado não identificado*.....</p>	49
<p><b>3:</b> Crescimento micelial (cm) de <i>Pycnoporus sanguineus</i>, <i>Lentinus bertieri</i>, <i>Xylaria</i> sp., <i>Lentinula edodes</i> e <i>Stereum ostrea</i>, em serragem enriquecida após nove dias de cultivo a 23, 27 e 31°C .....</p>	54
<p><b>4.</b> Crescimento micelial (cm) de <i>Pycnoporus sanguineus</i>, <i>Lentinus bertieri</i>, <i>Xylaria</i> sp., <i>Lentinula edodes</i> e <i>Stereum ostrea</i>, após seis dias de incubação a 23°C, em meios de cultura BDA, MA e SDA .....</p>	57
<p><b>5.</b> Crescimento micelial (cm) de <i>Pycnoporus sanguineus</i>, <i>Lentinus bertieri</i>, <i>Xylaria</i> sp., <i>Lentinula edodes</i> e <i>Stereum ostrea</i>, após quatro dias de incubação a 27°C em meios de cultura BDA, MA e SDA (média de cinco repetições) .....</p>	58
<p><b>6.</b> Crescimento micelial (cm) de <i>Pycnoporus sanguineus</i>, <i>Lentinus bertieri</i>, <i>Xylaria</i> sp., <i>Lentinula edodes</i> e <i>Stereum ostrea</i>, após quatro dias de incubação a 31 °C em meios de cultura BDA, MA e SDA .....</p>	59
<p><b>7.</b> Atividade enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i>, <i>Lentinus bertieri</i>, <i>Xylaria</i> sp. e <i>Lentinula edodes</i> e <i>Stereum ostrea</i> após cinco dias de incubação a 25°C em meios de cultura específicos para as enzimas lacase, protease, pectinases, celulase e lipase .....</p>	61

8. Perda de massa (%) de corpos-de-prova de eucalipto urograndis em condições de 50 e 100% de umidade no solo, pela ação de <i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>Lentinus bertieri</i> , <i>Xylaria</i> sp. e <i>Lentinula edodes</i> , após 120 dias de incubação .....	68
9. Média dos teores totais (%) dos componentes químicos da madeira degradada de eucalipto urograndis, por <i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>Lentinus bertieri</i> , <i>Xylaria</i> sp. e <i>Lentinula edodes</i> , e das Testemunhas, submetidas às umidades de 50 e 100%, após 120 dias de degradação .....	74

## RESUMO

O eucalipto é a arbórea mais plantada no Brasil, devido ao seu amplo uso e após seu corte, os tocos e raízes que permanecem no local, dificultam o manejo da cultura. Com base nessa necessidade, o objetivo do presente estudo foi avaliar as características fisiológicas e funcionais de fungos basidiomicotas, isolados de campos de reflorestamento de *Eucalyptus* spp., com vistas à possibilidade do uso destes na destoca natural. Os fungos *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Xylaria* sp. e *Lentinula edodes* e um isolado não identificado foram estudados. No primeiro experimento, avaliou-se a patogenicidade dos mesmos em plantas de eucalipto urograndis (10 meses de idade), através da inoculação de disco de meio de cultura colonizado e não colonizado (Testemunha). As avaliações foram feitas aos 30 e 60 dias após a inoculação, com base no tamanho das lesões internas e externas. No segundo experimento, avaliou-se o crescimento micelial dos fungos *P. sanguineus*, *L. bertieri*, *Xylaria* sp., *L. edodes* e *S. ostrea*, em substrato à base de serragem enriquecida com farelos, e em três composições de meios de cultura, Batata-Dextrose-Ágar (BDA); Malte-Ágar (MA) e Serragem-Dextrose-Ágar (SDA), e incubados a 23, 27 e 31°C. No terceiro experimento, avaliou-se a produção das enzimas ligninocelulolíticas lacase e celulase, e outras ligadas à degradação de tecidos vegetais, as proteases, pectinases e

lipase, em meios de cultura específicos. No quarto experimento, estudou-se, pelo método “soil block”, a perda de massa (%) de corpos-de-prova de eucalipto urograndis, inoculados com os fungos *P. sanguineus*, *L. bertieri*, *Xylaria* sp. e *L. edodes*, mantidos sob dois regimes de umidade (50 e 100%), e avaliados aos 30, 60, 90 e 120 após inoculação. Estudaram-se também as características químicas da madeira, após 120 dias da inoculação. No primeiro experimento, verificou-se que as lesões externas das plantas inoculadas com fungos, avaliadas aos 60 dias, diminuíram em relação às lesões avaliadas aos 30 dias; as lesões internas, avaliadas aos 30 e 60 dias, foram menores às lesões das testemunhas. No segundo experimento, observou-se rápida colonização de *P. sanguineus* e *L. bertieri* nos substratos à base de serragem enriquecida e no meio SDA, a 27 e 31°C; *L. edodes* e *S. ostrea* não cresceram em serragem a 31°C. No terceiro experimento, verificou-se que todos os fungos produziram lacases e celulases; *P. sanguineus* foi o único a produzir proteases; somente *S. ostrea* e *Xylaria* sp. produziram lipases; não detectou-se produção de pectinases somente por *Xylaria* sp. No quarto experimento, observou-se que na umidade 50%, as perdas de massa da madeira de eucalipto urograndis não foram superiores a 10%, para todos os fungos avaliados; na umidade 100%, as perdas de massa causadas por *P. sanguineus* e *L. bertieri* foram de 48,9 e 26%, respectivamente; *L. edodes* teve o crescimento micelial negativamente afetado nesta umidade e *Xylaria* sp. causou perda de massa menor que 5%. Através das análises químicas da madeira degradada, observou-se que, em relação à lignina e celulose, na umidade 50%, o consumo pelos fungos ficou na ordem decrescente: *P. sanguineus*, *L. edodes*, *L. bertieri* e *Xylaria* sp., na umidade 100%, o consumo da lignina, celulose e hemicelulose ficou na ordem decrescente: *P. sanguineus*, *L. bertieri*, *L. edodes* e *Xylaria* sp.

---

**Palavras-chave:** destoca biológica, *Eucalyptus* spp., degradação da madeira, podridão branca.

**SELECTION OF WOOD DECAY FUNGUS TO USE ON BIOLOGICAL STUMP REMOVAL OF THE *EUCALYPTUS* SPP. Botucatu, 2011. 95 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.**

**Author: DJANIRA RODRIGUES NEGRÃO**

**Adviser: MARLI TEIXEIRA DE ALMEIDA MINHONI**

**Co-Adviser: EDSON LUÍS FURTADO**

## **SUMMARY**

The *Eucalyptus* spp. tree is the most planted in Brazil, due to its widespread use and after its use, the stumps and roots that remains in the area, hinder crop management. Based on this need, the purpose of this work was evaluate the physiological and functional characteristics of basidiomycetes fungi, obtained in reforestation fields of *Eucalyptus* spp., with the possibility of using the fungi in natural stump removal. *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Xylaria* sp., *Stereum ostrea* and a unidentified isolate, were studied. In the first, was evaluate the fungi pathogenicity in eucalipt urograndis plants (10 months old), by means of

disk inoculation into culture medium colonized and non-colonized (control) by fungi. Evaluations were performed at 30 and 60 days after inoculation based on the external and internal size of lesions. In experiment 2, the mycelial growth of *P. sanguineus*, *L. bertieri*, *Xylaria* sp., *L. edodes* and *S. ostrea* was evaluated in bran and sawdust-based substrate, as well as in three culture media: Potato-Dextrose-Agar (PDA), Malt-Agar (MA) and Sawdust-Dextrose-Agar (SDA), and at three incubation temperatures, at 23, 27 and 31°C. In experiment 3, the production of lignolytic enzymes lacase and cellulase, and other enzymes related to degradation of plant tissues, like protease, pectinases and lipase was assessed in specific culture media. In experiment 4, mass loss (%) and chemical features of eucalypt urograndis wood degraded by the soil block method were evaluated by the *P. sanguineus*, *L. bertieri*, *Xylaria* sp. and *L. edodes* fungi. Thus, test specimens were inoculated with the fungi and kept under two moisture regimes, 50 and 100%, and incubated at 25 ±2°C. Mass loss was assessed at 30, 60, 90 and 120 days after inoculation. The chemical features of eucalypt urograndis test specimens were only analyzed at 120 days. External lesions of plants inoculated with the fungi, assessed at 60 days, were smaller than the lesions at 30 days. The same behavior was noted for internal lesions at 30 and 60 days. A fast colonization by *P. sanguineus* and *L. bertieri* was observed in sawdust substrate and in sawdust-based culture medium, at 27 and 31°C; *L. edodes* e *S. ostrea* had no growth in sawdust at 31°C. All fungi produced the enzymes lacase and cellulases; *P. sanguineus* was the only one that produced proteases; only *S. ostrea* and *Xylaria* sp. produced lipases; no pectinases production was detected only by *Xylaria* sp. In the 50% humidity, the wood eucalypti urograndis mass losses were lower than 10%, for all the evaluated fungi; at 100% humidity, wood mass losses by *P. sanguineus* and *L. bertieri* were 48,9 and 26 %, respectively; *Xylaria* sp. mass loss was less than 5%. Through chemical analysis of decayed wood, it was observed that, in relation to lignin and cellulose, at 50% humidity, consumption by the fungus was in the following order: *P. sanguineus*, *L. edodes*, *L. bertieri* and *Xylaria* sp. In 100% humidity, the use of lignin, cellulose and hemicelluloses was in descending order: *P. sanguineus*, *L. bertieri*, *L. edodes* and *Xylaria* sp.

---

Keywords: natural stump removal, *Eucalyptus* spp., white rot fungus, wood decay.

## 1. INTRODUÇÃO

No ano de 2010, as florestas plantadas no Brasil ocuparam uma área de 3,5 milhões de hectares, formadas principalmente por pinus e eucalipto, o qual corresponde por 65% desta área. A distribuição destas florestas ocorre, na sua maioria, nas regiões Sul e Sudeste, e também na região Nordeste, principalmente na Bahia (BRACELPA, 2008, ABRAF, 2009).

A madeira de eucalipto é usada para diversas finalidades, como na construção civil, na indústria moveleira, na produção de polpa celulósica e papel e na metalurgia, na forma de carvão, como para a produção do ferro gusa (ABRAF, 2009). No plantio do eucalipto, o terreno não é totalmente limpo com a retirada dos restos florestais e da vegetação, que são deixados no local. Quanto ao reflorestamento de áreas já cultivadas com essa espécie, utiliza-se o sistema de “cultivo mínimo” (QUEIROZ e BARRICHELLO, 2007).

Dependendo da finalidade, como na produção de celulose, o corte do eucalipto, em geral, se inicia a partir de seis a sete anos de idade. Os tocos que permanecem nos campos de reflorestamento após o corte não são retirados, apenas cortados o mais rente possível do solo. Estes, por sua vez, demandam, em média, 25 anos para serem naturalmente degradados. Essa situação dificulta os novos plantios subsequentes e o manejo da cultura, como o trânsito de

máquinas para adubação e para a colheita da madeira (ONOFRE *et al.*, 2001). Na primeira e segunda rotação, o plantio é feito entre linhas, já na terceira rotação, não há espaço para novos plantios e, a menos que os tocos e raízes ali presentes sejam retirados mecanicamente, a área torna-se imprópria para novos plantios.

Apesar de atrapalhar o manejo da cultura, manter esses tocos nos próprios locais gera riquezas às florestas plantadas, pois sua degradação promove a ciclagem de nutrientes, disponibilizando-os às novas plantas, além de aumentar a comunidade microbiana e aeração do solo.

Uma maneira de acelerar o processo de degradação dos tocos e raízes é o emprego de fungos degradadores da madeira não patogênicos, muito conhecidos como fungos de podridão branca. O método consiste basicamente, na inoculação dos tocos com fungos adaptados à região onde a técnica será aplicada, o qual é denominado de destoca biológica (ANDRADE, 2003; ABREU *et al.*, 2007). Ademais, com este método, tem-se uma redução da exportação de nutrientes da área e manutenção da microbiota, contribuindo desta forma, para a sustentabilidade desse sistema (ALONSO *et al.*, 2007).

Os microrganismos conhecidamente capazes de degradar madeira são os basidiomicotas pertencentes às ordens Agaricales e Aphylloporales. Durante o crescimento micelial e formação de basidiomas, estes fungos produzem enzimas oxidativas, lacases e peroxidases, que estão envolvidas no processo de degradação dos componentes estruturais da parede celular vegetal: celulose, hemicelulose e lignina (HAKALA *et al.*, 2004). Contudo, a capacidade de degradação da madeira pode variar entre espécies de fungos e mesmo da madeira a ser degradada (ORTH *et al.*, 1993; FERNANDES, 2005).

Como em todos os processos de biodegradação, tem-se a formação de metabólicos diversos e de produtos finais, como a água, CO<sub>2</sub> e liberação de calor (BOOMINATHAN e REID, 1992). Neste processo, os fungos obtêm energia e nutrientes para seu metabolismo, crescimento miceliano e reprodução, geralmente pela formação dos basidiomas (KÜES e LIU, 2000).

A biodegradação de madeira, também conhecida como podridão, é classificada em três tipos: mole, branca e parda (BLANCHETTE, 1985, 1991). Na podridão mole ocorre a degradação de compostos solúveis, como os açúcares simples e carboidratos. Na podridão branca, ocorre a degradação dos principais constituintes da célula vegetal da madeira,

ou seja, a celulose, hemicelulose e a lignina. De forma similar, a madeira que sofreu o ataque de fungos de podridão parda ou marrom perde compostos solúveis, a hemicelulose e a celulose, porém pouca ou nenhuma quantidade de lignina é degradada e, em alguns casos, apenas modificada molecularmente (BLANCHETE *et al.*, 2000).

Deste modo, a atividade de fungos degradadores da madeira, representado por várias espécies de basidiomicotas, apresentam-se como uma forma alternativa, sustentável e de metodologia acessível para acelerar a degradação de tocos de *Eucalyptus* spp. (FERNANDES, 2005). Contudo, para implantar o sistema de destoca microbiológica em campos de reflorestamento de *Eucalyptus* sp. é absolutamente necessário estudos sobre o perfil não-patogênico de fungos apodrecedores, para que futuramente não se tornem um problema fitossanitário.

A partir dos conceitos apresentados, estima-se que a aplicação da destoca biológica facilitará a retirada das raízes de eucalipto, ali presentes durante aproximadamente catorze anos. Desta forma, com a degradação dos tocos e raízes em estágio mais avançados, é provável que a demanda energética das máquinas para esse serviço seja menor, se comparado às raízes degradadas naturalmente.

Pelo exposto, a pesquisa com algumas espécies de fungos degradadores de madeira, é de extrema importância para o setor florestal brasileiro, visto que possibilitam um manejo adequado das raízes e tocos de eucalipto, presentes nos povoamentos de eucalipto.

## **2. OBJETIVOS**

- Coletar espécies de fungos degradadores da madeira, naturalmente presentes nos povoamentos de eucalipto.
- Verificar o potencial patogênico dos fungos selecionados em plantas vivas de eucalipto, com intuito de eliminar os riscos de introdução de agentes fitopatogênicos nos povoamentos.
- Estudar características fisiológicas e funcionais dos fungos degradadores da madeira e selecionar os fungos com maiores capacidades de degradação de madeira.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Importância econômica do gênero *Eucalyptus*

As espécies de madeira mais utilizadas no Brasil, em florestas plantadas, pertencem ao gênero *Eucalyptus*, da família botânica *Myrtaceae*, abrangendo cerca de 605 espécies. Dependendo da espécie, as árvores o tamanho das árvores podem variar de 25 a 54 m de altura, sendo as espécies mais plantadas no Brasil o *E. grandis*, *E. saligna*, *E. urophylla*, *E. dunnii* e *E. cloeziana* (ELDRICH *et al.*, 19940

Florestas plantadas atendem as necessidades internas do país e contribuem com a economia, gerando riquezas, através de exportações de uma série de derivados da madeira. O aumento a cada ano das áreas plantadas tem mudado o quadro geral do desmatamento de espécies nativas presentes nas florestas naturais, retiradas de forma não sustentável. Atualmente, a substituição da madeira oriunda de florestas nativas pelo eucalipto está influenciando diretamente a diminuição do desmatamento dos biomas, como por exemplo, do cerrado, que até 2008 somou uma área desmatada de 975.711 Km<sup>2</sup> (BRASIL<sup>a</sup>, 2011 ABRAF, 2009).

O eucalipto vem sendo cada vez mais utilizado para diversas finalidades na construção civil em substituição às madeiras de lei, como a Peroba-rosa e o Pinho-do-Paraná. As espécies *E. tereticornis*, *E. saligna* e *Corymbia citriodora* são as mais empregadas para essas finalidades. Além dessas espécies, o *E. grandis*, gerado em plantios destinados à produção de polpas celulósicas, ultimamente também tem sido utilizado em diversos usos na construção civil e na produção de móveis. Atualmente, para a produção de celulose e papel, o híbrido urograndis (*E. grandis* x *E. urophylla*) têm tomado grande parte das áreas clonais plantadas no Brasil (ABRAF, 2011).

A produção em larga escala do eucalipto pode ser atribuída, principalmente, a algumas vantagens que essa espécie possui em relação a outras, também como grande potencial de produção. Assim, a escolha pelo eucalipto está diretamente relacionada à alta produtividade nas áreas reflorestadas, ao pleno domínio das tecnologias de produção de sua madeira no território nacional, além da sua boa adaptação aos climas diversos em vários estados brasileiros. Somados, esses fatores geram grandes volumes de madeira que atendem as indústrias madeireiras, de celulose e papel entre outros segmentos, conferindo uma posição ímpar ao eucalipto (ABRAF, 2011).

Os principais países que importaram os produtos florestais do Brasil no ano de 2010 foram: Estados Unidos (US\$1.256,80 bilhões); China (1.198,70 bilhões) e países europeus (Reino Unido, França, Holanda, Alemanha, Itália e Bélgica) que juntos somaram quase 2 bilhões de dólares (BRASIL, 2011; FAO 2011). No âmbito de exportações, a celulose, papel, carvão e serrados destacam-se em maior volume e divisas. Contudo, o Brasil também importou papel, celulose e painéis de fibra para suprir a demanda interna (FAO, 2011).

Os três principais estados brasileiros produtores de eucalipto são Minas Gerais, com 1.300.000 ha, São Paulo, com 1.029.670 ha e Bahia com 628.440 ha. O segmento florestal vem crescendo a cada ano, e as áreas de florestas com eucalipto está em plena expansão na maioria dos estados brasileiros (BRASIL., 2011; ABRAF, 2011). No estado de São Paulo, a taxa de crescimento da área de florestas plantadas com eucalipto no período entre 2004 e 2009 foi de 26,5%.

Em 2009, o Brasil se tornou o quarto maior produtor mundial de celulose. Neste mesmo ano, o setor florestal foi responsável por 4% do PIB (equivalente a US\$ 37,3 bilhões) e 7,3% das exportações totais do país (US\$ 10,3 bilhões). Tomando como exemplo

somente a madeira serrada, o total de exportações gerado, em 2009, ficou próximo de 9,6 milhões de m<sup>3</sup> gerando um aporte de quase US\$ 1,5 bilhão à economia no país. Com a exportação de papel para impressão, o país gerou quase 10 bilhões de dólares (BRASIL, 2011; FAO 2011).

Atualmente, existem dois modelos de organização industrial no setor florestal brasileiro. O principal setor, dominado por poucas empresas de grande porte, é responsável pela fabricação de celulose, papel, lâminas de madeira, chapa de fibra e madeira aglomerada e, do outro lado, estão as empresas de pequeno e médio porte, que produzem madeira serrada, compensados e móveis. Assim, os diversos segmentos do setor florestal foram responsáveis pela geração de 7 milhões de empregos diretos e indiretos no ano de 2010 (ABRAF, 2011; BRASIL, 2011).

### 3.2. Características da madeira do *Eucalyptus* sp.

As plantas lenhosas são divididas em dois grupos botânicos, as angiospermas e as gimnospermas. Basicamente, as gimnospermas compreendem as coníferas, como o *Pinus* (também denominadas de madeiras moles), e as angiospermas, que compreendem as folhosas, também denominadas de madeiras duras. As folhosas compreendem um grande número de espécies, sendo as mais numerosas em espécies, tendo o gênero *Eucalyptus* como integrante (RAY e EICHHORN, 2006).

Quanto à composição química, as madeiras das diversas espécies de eucalipto apresentam as seguintes composições: 40-62% de celulose; 22% de hemicelulose; 15-25% de lignina e 3 a 10% de extrativos (CASTRO e SILVA, 2005).

A celulose, composta por unidades de  $\beta$ -D-glucose, é o principal componente da parede celular vegetal e é o polissacarídeo mais abundante na natureza. Ela é constituída por microfibrilas que, unidas por pontes de hidrogênio, formam as fibras (KOGA, 1986; CARVALHO *et al.*, 2009). As fibras de celulose, por sua vez, são constituídas de regiões cristalinas (altamente ordenadas), com maior resistência ao ataque microbiano, e pelas regiões amorfas (desordenadas), que são pouco resistentes às enzimas de fungos celulolíticos (D'ALMEIDA, 1981, RAY e EICHHORN, 2006; CARVALHO *et al.*, 2009).

A hemicelulose refere-se à uma mistura de polissacarídeos de massa molecular baixa, os quais estão intimamente associados com a celulose e lignina nas paredes

celulares das plantas. Ela é constituída por açúcares como a xilose, glucose, manose, ácidos urônicos e grupos acetila. Nas folhosas, o açúcar mais presente é a xilose (KOGA, 1986). O teor e a proporção dos diferentes componentes encontrados nas hemiceluloses variam com a espécie da madeira e também entre árvores de uma mesma espécie, dependendo também das condições do solo e clima, por exemplo.

Como constituintes moleculares da lignina, têm-se somente os elementos carbono, hidrogênio e o oxigênio. A principal função da lignina é dar integridade à estrutura da madeira e protegê-la contra danos biológicos e não biológicos (ORTH *et al.*, 1993). Na parede celular, a lignina forma, juntamente com a hemicelulose, uma matriz amorfa e resistente que protege a celulose da biodegradação (MARTÍNEZ, *et al.*, 2005).

Além da celulose, hemicelulose e lignina, todas as espécies de madeiras contêm quantidades variáveis de outras substâncias, denominadas de constituintes menores. Dentro deste grupo, incluem-se os mais diversos compostos orgânicos e inorgânicos. Esses constituintes não residem na parede celular e basicamente, dividem-se em duas classes: a) materiais conhecidos como extrativos, por serem extraíveis em água e solventes orgânicos; b) materiais que não são extraíveis, como compostos inorgânicos, proteínas e substâncias pécticas (CARVALHO *et al.*, 2009). Nas folhosas, os extrativos podem ser terpenos e seus derivados, taninos, gorduras, gomas, resinas, ceras, fenóis e materiais aromáticos de coloração (MARTÍNEZ *et al.*, 2005).

Castro e Silva *et al.* (2005) encontraram variações na madeira de *E. grandis* quanto aos teores de extrativos totais e de lignina. Estes dois componentes apresentaram tendência de maior deposição e estabilização nos tecidos do cerne, em árvores adultas (20 anos). Contudo, as concentrações de extrativos e lignina variam de acordo com a posição do tronco e, além disso, os teores de celulose e hemicelulose mostraram tendência inversamente proporcional em relação à idade. Já a deposição de extrativos e de lignina está relacionada à maior durabilidade da madeira ao ataque biológico, sejam por fungos, bactérias, insetos e outros. No gênero *Eucalyptus*, o cerne contém mais umidade que no alburno, porém, com o aumento da idade e juntamente com os extrativos, ele vai se tornando cada vez mais infiltrado (RAY e EICHHORN, 2006).

A exposição dessas características é importante para o entendimento dos processos de degradação, pois de acordo com a espécie da madeira, idade e composição química, os fungos de podridão branca degradam-na em diferentes velocidades e quantidade.

### **3.3. Tratos culturais na cultura do eucalipto**

No Brasil, a colheita do eucalipto é realizada de forma mecanizada utilizando-se máquinas que cortam as árvores em plano rente ao solo, sendo também conhecido como corte raso. Atualmente, esta é a prática mais freqüente de colheita nas grandes empresas do setor florestal. Nesse caso, o que resta são os tocos, que ficam com 5 cm de altura, em média. Quando feito manualmente, com auxílio de motosserra, os tocos permanecem com 10 cm de altura, em média. Se houver interesse de condução da rebrota, os tocos são cortados a 15 cm de altura, caso contrário, logo após o corte, geralmente faz-se o uso de herbicida no local, evitando-se assim a rebrota (Eduardo Bernardo/Eucatex, informação pessoal, maio, 2011).

Na fase de reflorestamento de áreas já cultivadas, utiliza-se o sistema de “cultivo mínimo”, onde o preparo do solo é feito com sulcos e descompactação do solo no terreno, com auxílio de subsolador. Nesses sulcos, faz-se a adubação e o plantio das novas mudas, geralmente com auxílio de máquinas (QUEIROZ e BARRICHELLO, 2007).

Dessa forma, as atuais técnicas de manejo utilizadas nas florestas plantadas de eucalipto favorecem a permanente cobertura do solo, e quando as árvores são cortadas, geralmente um novo ciclo de plantio recomeça. A serrapilheira nas florestas é naturalmente formada pela queda de galhos, ramos, cascas, folhas e flores, sendo que, a quantidade depositada é dependente do estado nutricional da floresta. Através dos ciclos biogeoquímicos, os nutrientes retidos na serrapilheira retornam às plantas, auxiliando no crescimento anual das árvores, além de nutrir o solo e aumentar a atividade microbiana.

Em povoamentos de eucalipto, os sistemas de manejo que mantêm o solo sem revolvimento constituem em elevados conteúdos de carbono, apresentando efeitos positivos na redução das emissões de CO<sub>2</sub> (BAYER *et al.*, 2000). A biomassa presente nos tocos de eucalipto deixados após o corte é importante tanto como hábitat para a biodiversidade microbiana quanto para reserva de carbono orgânico, contribuindo, dessa forma, para a diminuição do aquecimento global (PETERSSON e MELIN, 2010).

### 3.4. Fungos degradadores da madeira

Os principais fungos que degradam eficientemente a madeira pertencem ao filo Basidiomycota, segundo a classificação de Alexopoulos *et al.* (1996), e estão organizados na ordem Aphyllophorales e Agaricales.

Os Aphyllophorales possuem um importante papel nos ecossistemas, sendo importantes como decompositores da madeira, geralmente associados com outros táxons (BADER *et al.*, 1995). Dentro dessa ordem, está o gênero *Pycnoporus*, um poliporáceo muito encontrado nas florestas tropicais e também em locais urbanos. Esses fungos são popularmente conhecidos como “orelhas-de-pau” devido à aparência sésil e endurecida do basidioma. As espécies da ordem Aphyllophorales são, na sua maioria, saprófitas lignocelulolíticas, que possuem um papel fundamental na ciclagem de nutrientes e na manutenção dos ecossistemas terrestres (GLUGLIOTTA e CAPELARI, 1998).

Os fungos comumente conhecidos como cogumelos estão incluídos na ordem Agaricales. Esses fungos são carnosos e também possuem um papel importante como decompositores de diversos materiais vegetais, desde folhas até a madeira, chegando a ser eficientes fungos ligninolíticos, como o cogumelo comestível *Lentinula edodes*, o “shiitake” (GLUGLIOTTA e CAPELARI, 1998).

O filo Ascomycota abriga alguns fungos degradadores, mas em menor quantidade. Neste filo, está o gênero *Xylaria*, que vem sendo retratado como degradador da madeira, devido ao hábito de colonizar madeira em decomposição e/ou vivendo como saprófita de plantas lenhosas. Esses fungos podem ser encontrados na madeira, no folheto e no solo (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Na maioria dos casos, um grande número de fungos trabalha simultaneamente na degradação da madeira. As taxas de degradação podem ser maiores quando há umidade suficiente na madeira (HOADLEY, 2000; RAYNER e BODDY, 1988). O limite de água presente na madeira não degradada situa-se próximo a 30% e, em potenciais abaixo disso, a água está presente somente nos microporos, que são muito pequenos para permitir a passagem das hifas ou de enzimas (GRIFFIN, 1977; MAGAN, 2008).

Sem água, muitas reações metabólicas não acontecem e a habilidade de colonização do substrato pelos fungos torna-se mais lenta.

Quando o lúmen ou cavidades celulares são preenchidas por água, as paredes celulares podem se tornar saturadas, ou seja, absorvem água até um ponto máximo de absorção, denominado de ponto de saturação da fibra. Isso ocorre porque a celulose possui afinidade com a água e, desta forma, a fibra celulósica tem capacidade de absorção de umidade. Contudo, a situação inversa também ocorre, ou seja, na carência de água, a fibra celulósica não constitui força em manter a umidade e, assim, perde água. Essa situação diminui a aeração dentro dos microporos celulares, dificultando a colonização microbiana (RAYNER e BODDY, 1988, HOADLEY, 2000).

Nas florestas úmidas, a madeira degradada pode absorver água em excesso e tornar-se saturada. Para se protegerem, alguns fungos produzem sobre o seu substrato, placas de pseudo-escleródio, que evita a entrada excessiva de água. Da mesma forma, essas estruturas também servem para manter a umidade adequada, diminuindo a perda de água. Essa capacidade sugere que, muitos fungos podem regular parcialmente condições favoráveis ao seu desenvolvimento, dando continuidade aos processos de degradação e de sua sobrevivência (BLANCHETTE, 1991).

Além da força que a água exerce sobre a madeira, ela também influencia as atividades metabólicas dos fungos. De acordo com o substrato, as enzimas extracelulares difundem-se na água presente, convertendo os componentes da parede celular vegetal em moléculas menores, as quais poderão ser transportadas através da membrana plasmática e participar do metabolismo intracelular (CARLILE *et al.*, 2001).

Contudo, em casos de estresse hídrico, alguns fungos como *Xylaria hypoxylon* demonstram habilidade em manter baixo o potencial de água na madeira que está colonizando. Dessa forma, ele evita dividir seu substrato com decompositores mais ativos como *Trametes versicolor* (MAGAN, 2008).

### **3.4.1. Fungos de podridão branca**

Durante a degradação da célula vegetal, muitos fungos consomem seletivamente a lignina. Esse componente, juntamente com os extrativos, deixa a madeira com coloração característica à cada espécie. Ao consumir a lignina, os fungos deixam a madeira com

aspecto esbranquiçado e quebradiço no sentido das fibras (BLANCHETTE, 1984; MARTÍNEZ *et al.*, 2005).

Os fungos que degradam a lignina são denominados de ligninolíticos e também conhecidos como fungos de podridão branca. Segundo Blanchette (2000), a habilidade de metabolizar grande quantidade de lignina é única entre os basidiomicetos. Dependendo da espécie fúngica e do substrato, a madeira pode sofrer dois modelos de degradação. O primeiro tipo é a degradação seletiva, que ocorre quando a lignina é preferencialmente consumida; o segundo tipo, a degradação simultânea, ocorre quando o fungo remove todos os componentes da parede celular, ou seja, celulose, hemicelulose e lignina, na mesma velocidade (BLANCHETTE, 1984).

Além disso, os fungos poderão apresentar um modo particular de degradação de acordo com os nutrientes disponíveis. Por exemplo, baixos níveis de nitrogênio estimulam a degradação da lignina por fungos de podridão branca, enquanto que altas concentrações desse elemento estimulam a degradação de polissacarídeos, como a hemicelulose (BLANCHETTE, 1991; KÜES e LIU, 2000).

A degradação da lignina por fungos de podridão branca em angiospermas é mais rápida quando comparada à degradação de gimnospermas. Isso se deve à composição química da lignina que, nas folhosas, ela é do tipo guaiacila-siringuila, enquanto que nas coníferas, a lignina é do tipo guaiacila. Esse fator, dentre outros, justifica a preferência dos fungos de podridão branca pelas folhosas (LEWIS e YAMAMOTO, 1990, OLIVEIRA *et al.*, 2005), e a sua presença quase unânime em campos de reflorestamento de eucalipto (ALONSO *et al.*, 2007).

Contudo, essa regra não é geral, e adaptações ecológicas intrínsecas de cada espécie podem ocorrer na natureza. Segundo Silva *et al.* (2007), *Pinus elliotti* foi mais suscetível à degradação por *Pycnoporus sanguineus* (fungo de podridão branca) do *Eucalyptus grandis*, quando submetido à degradação artificial.

### **3.4.2. Fungos de podridão marrom**

Embora a maioria dos fungos de podridão branca e marrom esteja taxonomicamente muito próximos, a principal diferença entre eles se baseia na aparência

morfológica da madeira após a degradação. Entretanto, outras diferenças, como produção de enzimas e mecanismos de difusão no substrato, também estão inclusas (BALDRIAN, 2008).

Durante a podridão marrom, os polissacarídeos presentes na parede celular são degradados extensivamente pela ação de enzimas fúngicas, resultando em um substrato rico em lignina modificada, a qual contribui para a formação do húmus depositado nos solos das florestas e nos leitos de rios (BLANCHETTE, 1991, 2000; FERRAZ, 2010).

O composto húmico é uma potente fonte de compostos aromáticos, rico em matéria orgânica estável e, quando incorporados ao solo, suas características físico-químicas tornam-se melhores (MARTÍNEZ *et al.*, 2005; MAGAN, 2008). Embora colonizem folhosas, os fungos de podridão marrom crescem preferencialmente em coníferas, e representam apenas 7% dos basidiomicotas apodrecedores (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

### **3.4.3. Fungos de podridão macia ou mole**

Os fungos que causam podridão macia ou mole pertencem principalmente ao filo ascomicota e seus anamorfos, contudo, alguns basidiomicotas podem produzir podridão mole em situações especiais. Ao contrário dos basidiomicetos, o conhecimento sobre a degradação lignocelulósica por esses habitantes da madeira ainda é muito limitado. Algumas pesquisas demonstraram a habilidade desses fungos em degradar a lignina em pelo menos alguma extensão.

Ascomicotas da família *Xylariaceae* têm sido relatados como causadores de podridão macia (BLANCHETTE, 1995). Porém, Anagnost (1998) observou que a madeira degradada por *Xylaria polymorpha*, permaneceu com características macroscópicas de podridão branca. Contudo, ao ser analisada quimicamente, a madeira degradada mostrou similaridades tanto com podridão branca (NILSSON e DANIEL *et al.*, 1989) quanto podridão mole (WORRALL *et al.*, 1997).

Pelo exposto, ainda há controvérsias em relação ao tipo de degradação que certas espécies do gênero *Xylaria* sp. causa na madeira. Dessa forma, uma análise concisa dependerá de características macroscópicas, microscópicas e químicas.

Alguns ascomicotas e seus anamorfos podem colonizar a madeira em contato com o solo, resultando numa queda das propriedades mecânicas e gerando podridão

mole. Esses tipos de fungos podem degradar a madeira em condições extremamente adversas (pouco ou excesso de água) fato que evita ou inibe a atividade de outros fungos.

Um bom conhecimento dos mecanismos de degradação pode oferecer importantes esclarecimentos de estratégias e mecanismos de colonização fúngica (BLANCHETTE, 1991).

### **3.5. Uso de fungos apodrecedores da madeira na destoca natural**

Com a crescente demanda por madeira a cada ano, mais áreas devem ser exploradas, e as áreas já plantadas merecem maior atenção, devido principalmente à presença dos cepos e raízes que ficam nesses locais após o corte raso. Após o terceiro corte, esses restos culturais devem ser retirados de alguma forma, e atualmente, existem duas práticas mais usadas, o rebaixamento de tocos e a retirada mecânica. Contudo, essas práticas demandam alta energia e custo, encarecendo todo o processo produtivo da madeira.

A retirada dos tocos, mesmo quando necessária causa um grave empobrecimento do solo, tanto de nutrientes quanto da microbiota. Após o período de um ano da retirada de raízes, Hope (2007) verificou que várias mudanças químicas ocorreram solo, dentre elas, baixas concentrações de nitrogênio, carbono, enxofre e altas concentrações de fósforo. Os autores verificaram também que normalização da quantidade de nutrientes no solo, através da atividade microbiana, foi restituída somente 10 anos após a retirada das raízes.

A degradação da madeira, em especial de tocos e raízes, em solos de clima tropical é favorecida pela temperatura. Segundo Chen *et al.* (2000), a taxa de CO<sub>2</sub> liberado pela respiração de microrganismos, que atuam em raízes mortas, aumenta com a temperatura, alcançado o máximo a 30-40° C. Acima disso, entre 50-60° C, ocorre declínio dos processos de respiração, embora ela não pare completamente. Em geral, temperaturas mais elevadas propiciam as atividades enzimáticas. Essa situação pode ocorrer em áreas recém cortadas, devido à radiação solar elevada. Concomitantemente com a umidade, espécie e idade da madeira, presença de microrganismos entre outros fatores, a degradação da madeira é favorecida (CHEN *et al.*, 2000).

De acordo com O'Connell (1990), no folheto de florestas de eucalipto, o fator umidade (próximo a 100%) e temperatura (entre 33-34° C) resultaram em um taxa de

respiração constante, influenciando positivamente a degradação da madeira. Por outro lado, valores de umidade próximos a 80% foram o suficiente para diminuir a atividade microbiana.

Considerando que o diâmetro da altura do peito (DAP) médio de uma árvore de 7 anos é de 18 cm, em média, a área que as raízes ocupam é de aproximadamente 2,5 m de profundidade, ou de 258 cm<sup>2</sup>. A contar que, geralmente, são plantadas 1500 árvores/ha<sup>-1</sup>, a área ocupada pelos tocos passa a ser de aproximadamente 38,72 m<sup>2</sup>/ha<sup>-1</sup> (LOCONTE *et al.*, 2010).

As raízes de uma árvore de eucalipto normalmente demoram cerca de 25 anos para serem completamente degradadas. Esta situação dificulta novos plantios, o trânsito de máquinas para colheita da madeira, além de práticas silviculturais, como adubação e manejo da cultura (ONOFRE *et al.*, 2001).

Pelo exposto, a destoca biológica é um método que pode ser usado para acelerar o processo de degradação de tocos de eucalipto remanescentes (ALONSO *et al.*, 2007; ANDRADE, 2003). Contudo, alguns estudos apontam que o sucesso da destoca biológica é variável de acordo com a espécie de fungo utilizada, com o método de inoculação e a estação do ano (ANDRADE, 2003; ABREU *et al.*, 2005). Os fungos mais promissores para essa tarefa são aqueles naturalmente presentes nos povoamentos de eucalipto, os quais já estão adaptados ao tipo de substrato e clima.

Além disso, é extremamente importante o conhecimento da capacidade saprofítica desses fungos, tomando-se o cuidado de não empregar fungos fitopatogênicos. Usada corretamente, a destoca biológica pode ser uma alternativa sustentável para a problemática dos tocos de eucalipto nos campos de reflorestamento (ALONSO *et al.*, 2007).

### **3.6. Enzimas produzidas por fungos degradadores da madeira**

Enzimas são proteínas produzidas pelas células de todos os organismos, com a finalidade de acelerar reações químicas, ou seja, são biocatalizadores. Geralmente, as enzimas são específicas quanto à função e ao substrato. Desta forma, são conhecidas inúmeras classes e tipos de enzimas, sintetizadas para catalisar diferentes tipos de reações bioquímicas (ÂNGELO, 2010).

Uma vez que as fontes de carbono utilizadas pelos basidiomicotas geralmente são de caráter lignocelulósico, as enzimas produzidas para degradar esses compostos são denominadas de ligninolíticas. Durante o crescimento vegetativo uma ampla gama de enzimas deve ser produzida para degradar a celulose, hemicelulose e a lignina. As enzimas oxidativas secretadas pelos fungos de podridão branca são capazes de quebrar a molécula de lignina em porções menores, para finalmente serem transportadas para o citoplasma fúngico.

### 3.6.1. Enzimas ligninolíticas

Conhecer o perfil enzimático dos fungos de podridão branca é importante do ponto de vista ecológico. Na seleção de microrganismos, e em especial, àqueles que possam ser utilizados na destoca natural essas características altamente são relevantes.

As enzimas envolvidas na degradação da lignina são classificadas como oxidoreduções. A catálise desta molécula ocorre pela transferência de elétrons ou de átomos de hidrogênio do substrato, para o metabolismo intracelular microbiano. Ademais, as enzimas capazes de degradar a lignina podem ser agrupadas em duas classes distintas: as fenoloxidasas e as enzimas que produzem peróxido de hidrogênio (MARTÍNEZ *et al.*, 2005).

Dentre as fenoloxidasas, é possível identificar dois subgrupos: as enzimas que dependem de peróxido como substrato, a lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP), e as enzimas que não dependem de peróxido como substrato para atuarem, as lacases.

A lacase e a manganês peroxidase possuem um grande potencial redutor de estruturas fenólicas e não-fenólicas da lignina. Contudo, a lignina peroxidase tem potencial redutor maior em relação às lacases e manganês peroxidases. Dessa forma, a lignina peroxidase é responsável pela oxidação direta de estruturas aromáticas não-fenólicas da lignina, as quais são extremamente complexas e de difícil degradação (RABINOVICH *et al.*, 2004).

Existem diversas maneiras de se identificar quais enzimas são produzidas pelos fungos. Os mais simples, faz uso de meios com corantes industriais e altamente poluentes, como o RBB (Remazol Brilliant Blue), e o guaiacol. A degradação destes compostos presentes no meio gera a formação de halos mais claros ao redor do micélio ativo, indicando, principalmente, a produção de lignina peroxidases.

No entanto, os fungos de podridão branca também podem ser distinguíveis de acordo com sua capacidade enzimática, quando crescem em meio de cultura sólido contendo ácido gálico. Nesse caso, durante o crescimento micelial, há produção de uma zona muito evidente de coloração marrom ao redor do micélio, fenômeno não observado entre fungos de podridão marrom. Essa descoloração é resultado da secreção de fenoloxidasas extracelulares (lacases e peroxidases) durante o seu metabolismo (LEWIS & YAMAMOTO, 1990).

### 3.6.2. Enzimas hidrolíticas

As enzimas necessárias para a degradação da celulose e hemiceluloses são denominadas enzimas hidrolíticas, as celulases e hemicelulases, sendo que a maior parte dos fungos produz pelo menos um tipo de celulase (ÂNGELO, 2010; CORRADI *et al.*, 2006; KÜES e LIU, 2000). As celulases formam uma classe extremamente vasta de enzimas de grande importância bioquímica, participando de uma série de reações hidrolíticas, a qual necessita da adição de uma molécula de água para que a ligação química seja rompida (ÂNGELO, 2010).

A hidrólise completa da celulose requer a ação combinada de pelo menos três grupos distintos de enzimas que atuam sinergicamente: as endoglucanases, que hidrolisam ligações glicosídicas no interior da cadeia (principalmente nas regiões amorfas da celulose); as celobiohidrolases, que hidrolisam as ligações glicosídicas nas extremidades da cadeia da celulose, liberando celobioses e as  $\beta$ -glucosidasases, que hidrolisam as celobioses, liberando finalmente, unidades de glucose que serão transportadas para o metabolismo intracelular (BALDRIAN e VALÁSKOVÁ, 2008).

Embora não seja um substrato natural, a carboximetilcelulose (CMC) é um bom indicador para detectar a produção de endoglucanases em meio de cultivo sólido de um determinado fungo. Se o resultado da atividade enzimática é positivo, classifica-se o fungo como produtor de celulases (BALDRIAN e VALÁSKOVÁ, 2008).

A hemicelulose é hidrolisada pela ação combinada de diversas endoenzimas, exoenzimas e outras enzimas auxiliares. Geralmente, os fungos de baixa capacidade degradadora de compostos ligninolíticos exibem maior habilidade em degradar esse polissacarídeo (ÂNGELO, 2010).

As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pectínicas, presentes principalmente na lamela média. O termo geral pectina designa ácidos pectínicos solúveis em água e, as substâncias pectínicas podem ser degradadas pelas enzimas pectinolíticas, produzidas por plantas, fungos, leveduras e bactérias (UENOJO e PASTORE, 2007).

A lipólise, ou hidrólise do material lipídico libera ácido graxos livres e parcialmente glicerídeos, usados no metabolismo microbiano (SHELLEY *et al.*, 1987). Para detectar a produção de lipase por um determinado microrganismo, tem-se utilizado o Tween, (polissorbato) como principal reagente. O método de detecção da lipase é baseado na precipitação de sais de cálcio e ácidos graxos, liberados pela hidrólise do mesmo (PLOU *et al.*, 1998). As lipases são produzidas por fungos degradadores da madeira para hidrolisar compostos presentes nos extrativos, como óleos e resinas, e então, utilizá-los no metabolismo intracelular.

As proteases, mais especificamente, peptidases, são enzimas responsáveis pela clivagem hidrolítica das ligações peptídicas das proteínas. As peptidases podem ser divididas em dois grandes grupos: as exopeptidases, que removem sequencialmente os aminoácidos nas extremidades da molécula da proteína, e as endopeptidases, responsáveis pela clivagem das ligações peptídicas internas da proteína (ÂNGELO, 2010).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, avaliaram-se características fisiológicas e metabólicas de fungos basidiomicotas, os quais têm na madeira, o seu substrato natural. Para tanto, desenvolveram-se quatro experimentos: avaliação da patogenicidade, atividade enzimática, crescimento micelial e degradação da madeira de eucalipto. Os fungos utilizados nos três primeiros experimentos foram *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Lentinula edodes*, *Stereum ostrea*, *Xylaria* sp. e um basidiomicota não identificado (Dut-1). Com base nos resultados obtidos, optou-se em estudar somente os fungos *P. sanguineus*, *L. bertieri*, *Xylaria* sp. e *L. edodes* no ensaio de degradação acelerada da madeira de eucalipto *urograndis*.

Os fungos utilizados foram *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Lentinula edodes*, *Stereum ostrea*, *Xylaria* sp. e um basidiomicota não identificado (Dut-1). Os fungos *S. ostrea* (BT-1) e *Xylaria* sp. (BT-23), foram coletados de madeira de eucalipto, no município de Botucatu/SP. Duas espécies de *P. sanguineus* foram usadas, sendo a primeira (BT-11) coletada de uma planta viva *Liquidambar* sp., e a segunda, *P. sanguineus* Jaú-30, de madeira apodrecida de eucalipto, na cidade de Jaú/SP. O fungo *L. bertieri* (BFT-35) foi coletado em campo de reflorestamento de *Eucalyptus* spp., na cidade de Bofete/SP. O fungo *L. edodes* (Led 98/47 e Led 96/13) foram usados como modelo de comparação, por serem conhecidamente

ligninolíticos, os quais foram obtidos junto à coleção de fungos da Micoteca do Módulo de Cogumelos UNESP/Botucatu.

Os fungos *P. sanguineus* (Jaú-30 e BT-11), *L. bertieri* e *S. ostrea* foram isolados a partir de basidiomas. Para tanto, os mesmos foram partidos ao meio com as mãos (com o cuidado de não tocar o interior dos mesmos) e, com auxílio de um bisturi, retirou-se um fragmento do seu pseudo-tecido interno (estipe e píleo). A assepsia dos fragmentos dos basidiomas ( $\pm 0,5 \text{ cm}^3$ ) foi feita em solução alcoólica (70 %), por 60 segundos, seguida de solução de hipoclorito de sódio (0,2 %), por 60 segundos, dispostas em placas de Petri de vidro previamente esterilizadas. Após, os fragmentos foram lavados, por três vezes consecutivas, com água destilada esterilizada e secos em papel filtro autoclavado. Para a inoculação, colocaram-se três fragmentos na superfície dos meios de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e serragem-dextrose-ágar (SDA), e as placas foram incubadas a 25 °C, no escuro (item 5.2.2).

O ascomicota *Xylaria* e o isolado não identificado (Dut-1) sp. foram isolados a partir de pedaços de madeira de eucalipto. A assepsia, inoculação e meios de cultura usados foram os mesmos utilizados para *P. sanguineus* e *L. bertieri* e *S. ostrea*. Os isolados de *L. edodes* (Led 98/47 e Led 93/13) foram repicados para os meios BDA e SDA, provenientes de discos de meio de cultura já colonizados pelos fungos, os quais estavam preservados em óleo mineral. Todos os procedimentos foram feitos em condições assépticas de câmara de fluxo laminar. A incubação dos fungos deu-se no escuro, a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , por cinco dias, em câmara de germinação tipo B.O.D (Biochemical Oxygen Demand).

Quanto à certificação da identidade dos fungos, a *Xylaria* sp., foi identificada com base nas características macroscópicas e o *L. bertieri* e *S. ostrea* foram identificados com base em características macro e microscópicas, no Núcleo de Pesquisa em Micologia do Instituto de Botânica de São Paulo. Os fungos *P. sanguineus*, *L. bertieri* e *S. ostrea* foram depositados na Coleção de Culturas de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica de São Paulo, tendo os respectivos registros: CCIBt 3817, CCIBt 3818 e CCIBt 3820.

Os isolados de *P. sanguineus* (Jaú-30 e BT-11) foram identificados no laboratório de Microbiologia Agrícola, Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP/Botucatu, com base em características macroscópicas do basidioma e microscópicas do micélio, como pela presença de grampos de conexão (ou ansas) e cor do micélio (alaranjado característico).

Após o crescimento dos fungos, as bordas das placas de Petri foram vedadas com filme plástico e armazenadas em B.O.D. a  $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , no escuro. Outra forma de preservação foi o método de Castellani. Para tanto, discos de micélio ( $\varphi$  0,5 cm, de sete dias de idade) foram dispostos em frascos de vidro (tipo penicilina) contendo água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1964), e armazenados no escuro, a  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

A seguir, serão descritos os experimentos relativos à patogenicidade dos fungos, crescimento micelial em meios de cultura e serragem enriquecida, atividade enzimática e degradação da madeira de eucalipto urograndis.

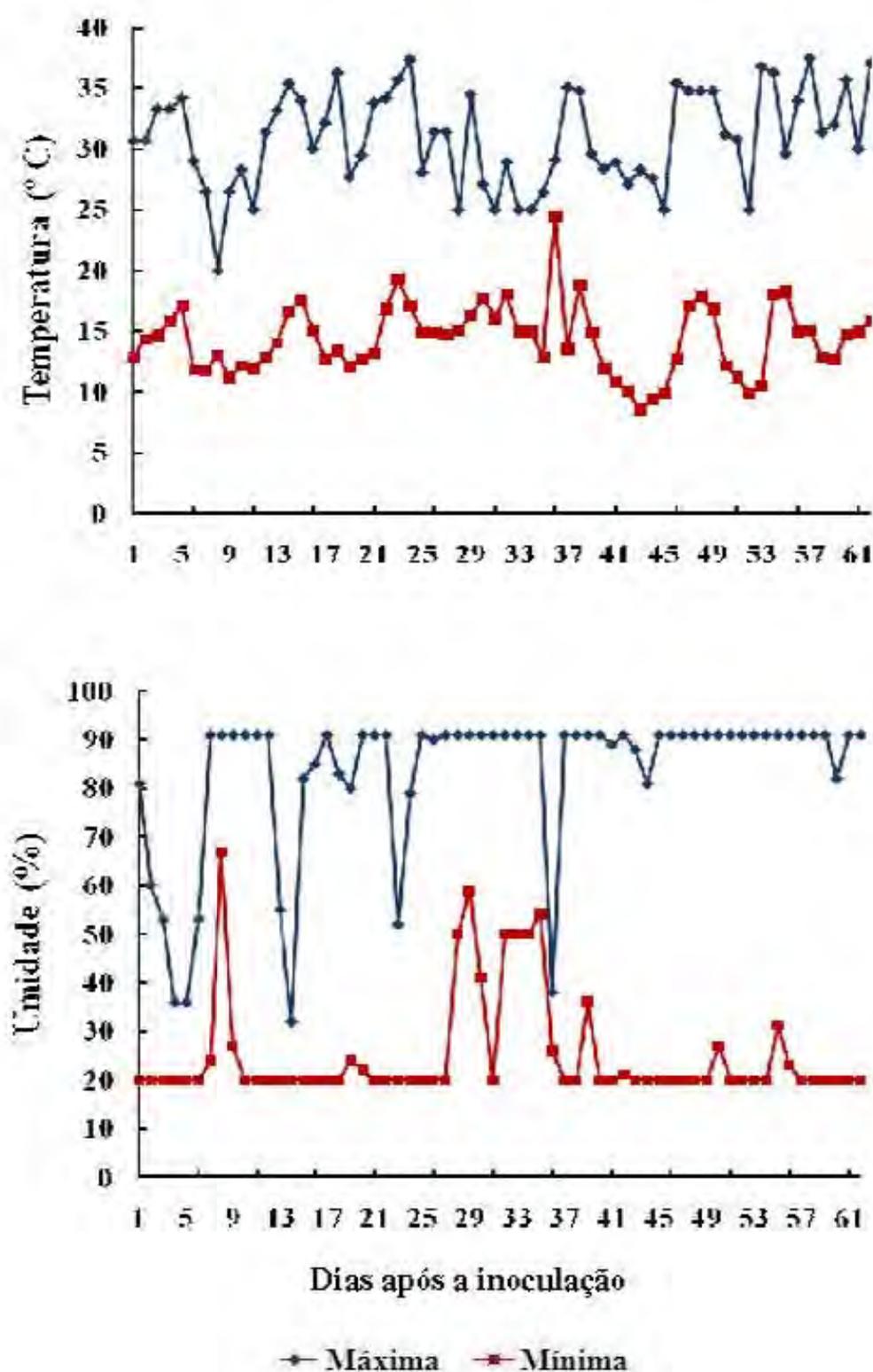
#### 4.1. EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DOS FUNGOS EM PLANTAS VIVAS

O principal objetivo do presente estudo é usar fungos para acelerar o processo de degradação dos tocos e raízes em povoamentos de eucalipto. Um fungo com perfil patogênico, ou seja, capaz de infectar plantas vivas (causando podridão do cerne ou cancrios), deve ser totalmente excluído da metodologia empregada para a destoca biológica. Desta forma, o teste de patogenicidade foi realizado com o intuito de se conhecer um possível comportamento patogênico dos fungos, sendo então inoculados em plantas vivas de eucalipto.

Para o teste de patogenicidade, utilizaram-se plantas sadias de eucalipto urograndis, de procedência seminal, com idade média de 10 meses, e com diâmetro médio do caule de 180 mm. As plantas foram cultivadas individualmente, durante cinco meses em vasos de polietileno (cinco litros) contendo substrato Plantmax<sup>®</sup> adicionado de adubo Yorin Master<sup>®</sup>.

Nos primeiros três meses, procedeu-se adição quinzenal de 250 mL de uma solução de macronutrientes e 0,5 mL de solução de micronutrientes para cada planta. A solução de macronutrientes foi composta por uréia (0,75 g L<sup>-1</sup>), sulfato de magnésio (1,2 g L<sup>-1</sup>), nitrato de cálcio (2 g L<sup>-1</sup>), cloreto de potássio (1 g L<sup>-1</sup>), fosfato de amônio (MAP, 1,6 g L<sup>-1</sup>). A solução de micronutrientes foi composta por boro (30 mg L<sup>-1</sup>), ferro (150 mg L<sup>-1</sup>), cobre (7 mg L<sup>-1</sup>), zinco (35 g L<sup>-1</sup>), manganês (400 mg L<sup>-1</sup>), molibdênio (0,5 mg L<sup>-1</sup>). Nos dois meses subsequentes, a adubação consistiu somente de uma solução de MAP (1,6 g L<sup>-1</sup>) na quantidade de 250 mL L<sup>-1</sup>, a qual foi adicionada quinzenalmente nas plantas. A adubação adotada foi baseada em GONÇALVES (1995).

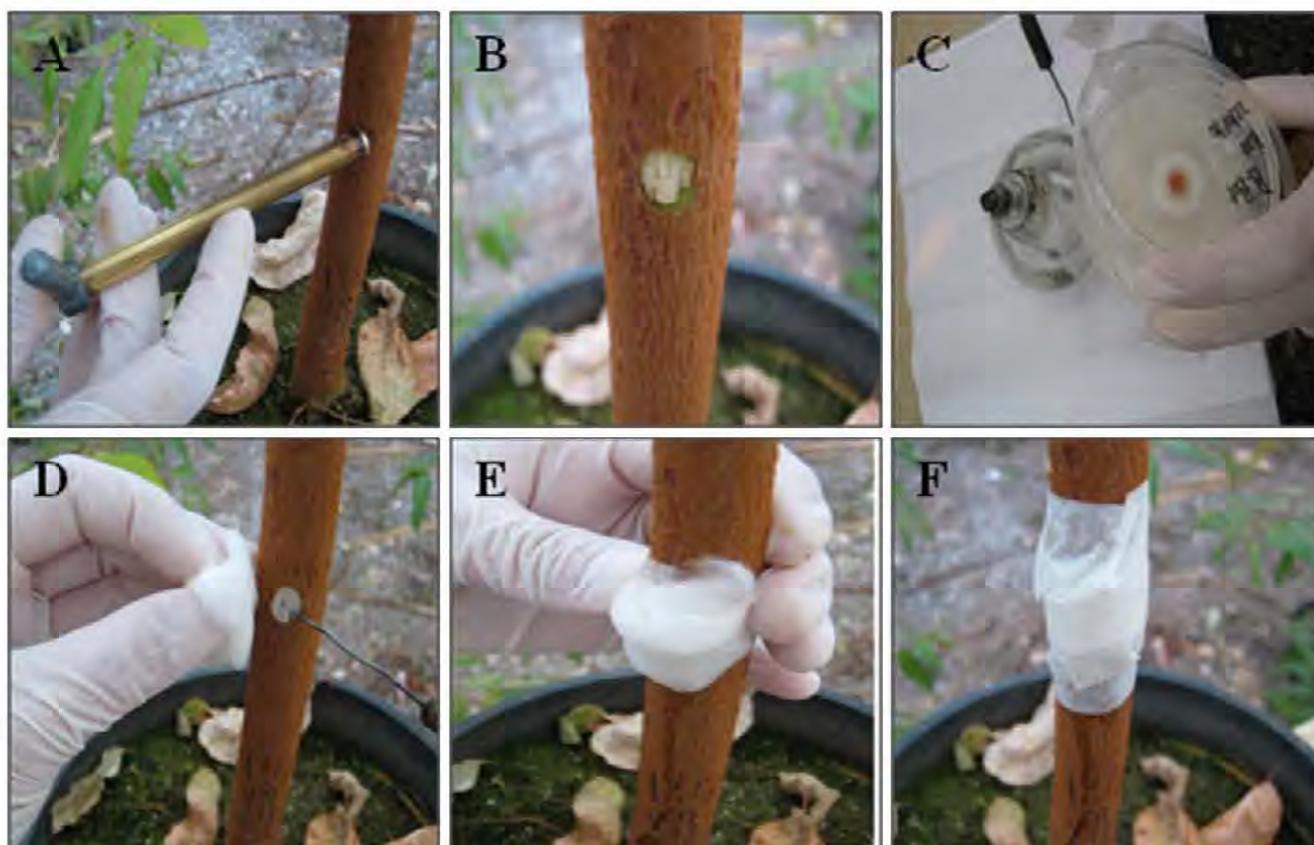
Durante todo o experimento, as plantas ficaram acomodadas em ambiente semi-controlado, em estufa, coberta com filme agrícola branco leitoso e laterais com sombrite. A temperatura e umidade foram anotadas diariamente, a partir do dia da inoculação das plantas com os fungos e estão dispostas na Figura 1.



**Figura 1:** Umidade e temperatura relativas na estufa, após a inoculação com os fungos basidiomicotas em plantas de eucalipto urograndis.

O método utilizado para a inoculação das plantas foi o de disco de micélio (VAN ZYL e WINGFIELD, 1999, ROUX *et al.*, 2004) e os fungos avaliados foram *P. sanguineus* (Jaú-30, BT-11), *L. bertieri* (BFT-35), *Xylaria* sp. (BT-23), *L. edodes* (Led 98/47, Led 96/13), *S. ostrea* (BT-1) e o isolado Dut-1.

Para a inoculação, retirou-se um fragmento ( $\phi$  5 mm) da casca das plantas (a 15 cm do substrato), com um furador de meio de cultura de cobre, previamente flambado, expondo-se o câmbio., incubados a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 5 dias. Neste local, inseriu-se um disco invertido ( $\phi$  5 mm) de meio de cultura BDA, previamente colonizado pelo fungo. Nas testemunhas, utilizaram-se discos de meio de cultura não colonizados. Após a inoculação, recobriu-se o local com algodão umedecido com água destilada esterilizada, vedando-o com uma fita adesiva, ao redor do caule, a fim de se evitar a dessecação do inóculo (Figura 2).



**Figura 2.** Inoculação de plantas de *Eucalyptus urograndis*. **A e B:** retirada da casca com furador de cobre; **C:** discos de meio de cultura colonizado pelo fungo; **D:** inoculação do fungo no local do ferimento; **E:** ferimento com disco de micélio colonizado, protegido com algodão úmido; **F:** vedação do ferimento com fita adesiva.

A patogenicidade dos fungos foi avaliada através da observação de lesões na casca (lesão externa) e no lenho (lesão interna), sendo quantificadas e dimensionadas (largura e comprimento), sobre a casca e abaixo dela, aos 30 e 60 dias após a inoculação. Para a avaliação das lesões internas, retirou-se a casca formada no local do ferimento, com auxílio de um bisturi, expondo-se assim o lenho. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito fungos e quatro repetições, sendo cada repetição uma planta, para cada período de avaliação (8 x 4 x 2). Os dados obtidos foram analisados pela análise de variância (ANOVA), com comparação das médias pelo Teste de Tukey.

Para fechar o Postulado de Koch, procedeu-se o reisolamento dos fungos, logo após a segunda avaliação, a partir de tecidos internos das plantas inoculadas com os fungos. Para tanto, retiraram-se fragmentos do lenho, somente do local do ferimento, onde a madeira poderia ter ou não manchas ou coloração. Em seguida, esses fragmentos foram assepticamente inoculados em meio de cultura BDA, a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  (Item 5.1) e após o crescimento, comparou-se o micélio obtido com a cultura original correspondente, com base na coloração e características do micélio, típica e particular de cada espécie estudada, além da verificação microscópica de ansas.

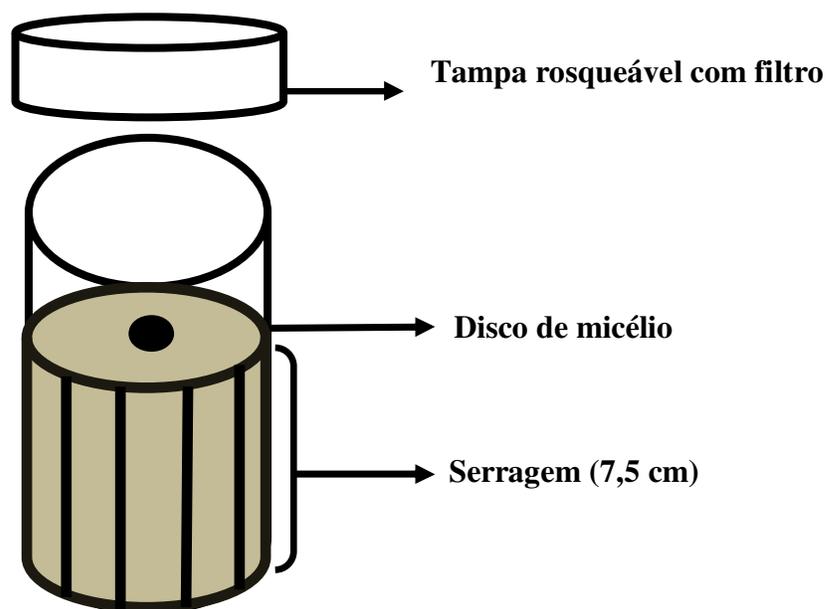
## 4.2. EXPERIMENTO 2 – CRESCIMENTO MICELIAL EM DIFERENTES SUBSTRATOS E TEMPERATURAS

### 4.2.1. Em serragem enriquecida

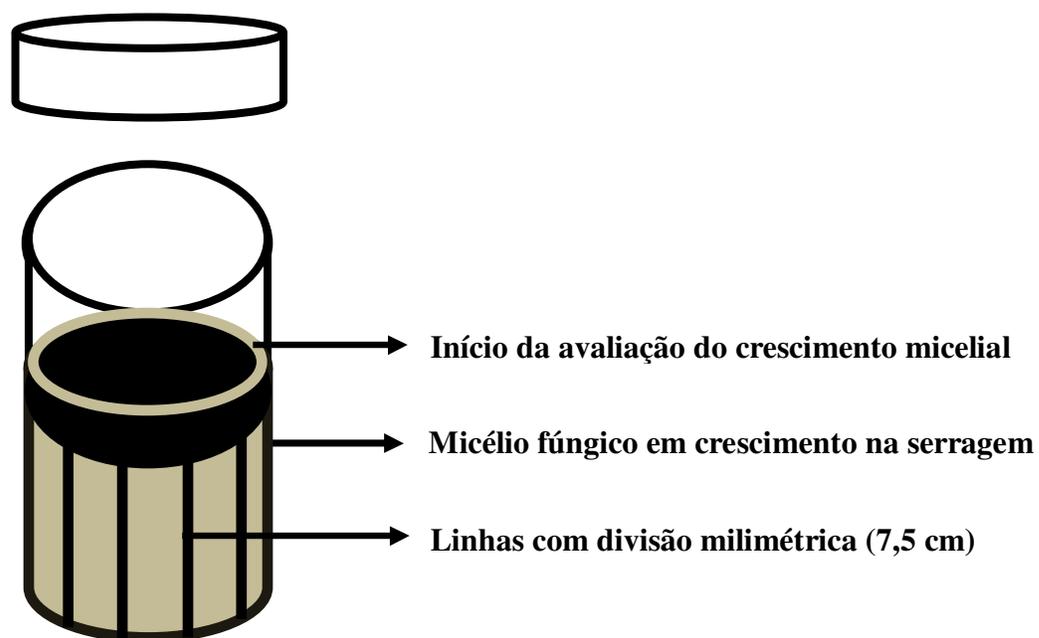
Para o preparo da serragem enriquecida, utilizou-se uma mistura de serragem de *Eucalyptus* spp., farelo de trigo, farelo de milho e carbonato de cálcio (41:4:4:1, base seca), sendo os materiais misturados em betoneira. Após, adicionou-se água (de abastecimento público), até 60 % de umidade, homogeneizando-se constantemente até a obtenção de uma massa uniforme. A serragem foi acondicionada em frascos de vidro, com capacidade de 600 mL, e com tampa metálica rosqueável, a qual recebeu dois discos de papel de filtro de (0,2 µm) para diminuir o risco de contaminações, havendo, contudo, trocas gasosas. Cada frasco recebeu 255 g (base úmida) da serragem enriquecida, sendo autoclavados a 121°C, por 4 horas.

Para a inoculação, discos (φ 10 mm) de meio SDA com micélio de *P. sanguineus* (Jaú-30), *L. bertieri*, *Xylaria* sp. e *L. edodes* (Led 98/47) e *S. ostrea*, crescidos a 25°C por 5 dias, foram depositados no ponto central da superfície da serragem, ficando o micélio em contato direto com a mesma (Figura 3). A incubação deu-se no escuro, sob as temperaturas de 23, 27 e 31°C. Para o acompanhamento do crescimento miceliano dos fungos, cada frasco foi marcado externamente com oito linhas eqüidistantes entre si e com divisão milimétrica. Diariamente, mediu-se o crescimento dos fungos, a partir do micélio em crescimento na superfície externa da serragem, aparente através do vidro do frasco, até que o micélio colonizasse todo o substrato, ou seja, o equivalente a 7,5 cm de altura (Figura 4).

O delineamento foi casualizado em esquema fatorial 4 x 3 (fungo x temperatura), com sete repetições. A análise estatística dos dados foi realizada pela análise de variância dos resultados (ANOVA), com comparação de médias pelo Teste de Tukey.



**Figura 3:** Inoculação da serragem enriquecida com disco de micélio de 10 mm de diâmetro, no ponto central da superfície do substrato.



**Figura 4:** Acompanhamento do crescimento micelial em serragem enriquecida, com auxílio de oito linhas com divisão milimétrica, até o percurso final de 7,5 cm.

O crescimento dos fungos *P. sanguineus* (Jaú-30), *L. bertieri*, *Xylaria* sp, *L. edodes* (Led 98/47) e *S. ostrea* foi também avaliado nos meios de cultura, batata-dextrose-ágar (BDA), malte-ágar (MA), serragem-dextrose-ágar (SDA), incubados no escuro, às temperaturas de 23, 27 e 31°C.

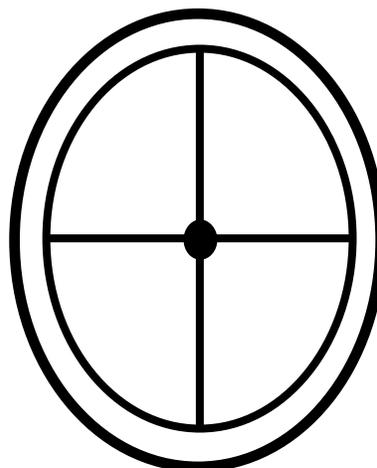
Para o preparo dos meios de cultura, base de um litro, utilizaram-se as seguintes massas, volumes e procedimentos: para o BDA, pesaram-se 39 g do preparado em pó (Acumédia®); para o meio MA, pesaram-se 20 g do preparado em pó (Acumédia®) e 15 g de ágar; para a confecção do meio SDA usou-se a serragem enriquecida de *Eucalyptus* spp. (Item 5.5.1), pesando-se 80 g e adicionando-se 700 mL de água destilada. Ferveu-se a serragem por 15 minutos e, após filtrou-se o caldo resultante em algodão, completou-se com água destilada até o volume final de um litro e adicionaram-se 12 g de dextrose, 15 g de ágar. Todos os meios de cultivo foram autoclavados a 120°C durante 25 minutos.

Para a inoculação dos meios, um disco ( $\varnothing$  5 mm) de meio BDA colonizado pelos fungos foi depositado no centro de cada placa de Petri, e incubados nas três temperaturas. Na face externa da base das placas, marcaram-se duas linhas centrais, perpendiculares entre si e com divisão milimétrica (Figura 5). O crescimento dos fungos foi medido diariamente, finalizando-se as leituras até que o micélio colonizasse 7,80 cm.

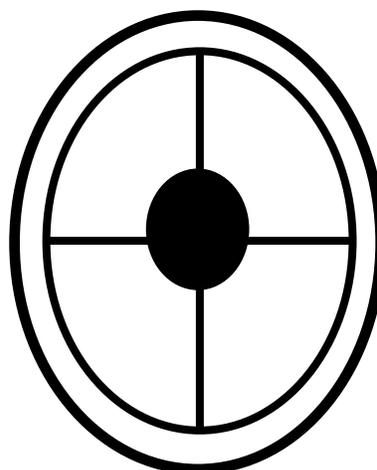
O delineamento foi casualizado em esquema fatorial 5 x 3 x 3 (fungos x meios x temperaturas), com 5 repetições. A análise estatística dos dados foi realizada pela análise de variância dos resultados (ANOVA), com comparação de médias pelo Teste de Tukey.



A



B



C

**Figura 5:** Avaliação do crescimento micelial em meios de cultura. **A:** Placa de Petri fechada. **B:** Disco de meio de cultura contendo micélio fúngico, depositado no centro da placa, com duas linhas perpendiculares entre si, marcadas no fundo da placa de Petri. **C:** Acompanhamento do crescimento micelial em meio de cultura.

### 4.3. EXPERIMENTO 3 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS FUNGOS

Os fungos *P. sanguineus* (Jaú-30), *L. bertieri*, *Xylaria* sp., *L. edodes* (Led 98/47) e *S. ostrea*, foram avaliados quanto à produção de enzimas que degradam a parede celular vegetal, sejam elas as lacases, proteases, pectinases, celulasas e lipases. Essas enzimas são detectadas em meios de cultivos sólidos específicos.

A inoculação dos meios foi feita com discos de meio BDA, contendo micélio dos fungos ( $\phi$  5 mm, cinco dias de crescimento a 25°C), após, as placas de Petri foram incubadas em B.O.D, no escuro a 25°C, por sete dias. O comportamento dos fungos foi avaliado conforme a presença de halo (reação positiva), ou sem a formação de halo (reação negativa) ao redor do micélio em crescimento. O delineamento foi casualizado, em duplicata.

Para cada meio de cultivo específico, quando necessário, ajustou-se o pH dos meios com uma solução de NaOH 1N.

#### 4.3.1. Lacase

A metodologia utilizada para o preparo de meio de cultura de detecção de produção de enzimas oxidativas, em especial a lacase, foi de acordo com Conceição *et al.* (2005) e Poiting (1999). Os reagentes utilizados para o preparo de um litro de meio de cultura foram: ácido gálico (0,5 g), extrato de malte (15 g), peptona (1 g) e ágar (20 g). Este meio de cultura deve ser preparado separadamente, sendo o ácido gálico homogeneizado em 50 mL de água destilada (solução A). Os demais reagentes foram solubilizados em água destilada, o pH ajustado para 7,0 (solução B). As soluções A e B foram autoclavadas separadamente (121°C, 20 minutos). No momento de verter o meio de cultura nas placas de Petri, adicionou-se a solução A junto à solução B, sendo homogeneizados e vertidos nas placas.

A avaliação foi feita pela visualização de um halo de coloração âmbar ao redor da colônia micelial em crescimento.

#### 4.3.2. Protease

A metodologia utilizada para o preparo de meio de cultura de detecção de proteases foi de acordo com Hankin e Anagnostakis (1975). Os reagentes utilizados para o preparo de um litro de meio de cultura foram: extrato de carne (3 g); peptona (5 g), gelatina (40

g) e ágar (15 g). A gelatina foi diluída em 250 mL de água destilada (solução A), separadamente dos demais reagentes, cuja solução aquosa teve o pH ajustado para 6,0 (solução B). As soluções A e B foram autoclavadas separadamente (121 °C, 20 minutos). No momento de verter o meio de cultura nas placas de Petri, adicionou-se a solução A junto à solução B, sendo homogeneizados vertidos nas placas.

A degradação da gelatina foi avaliada pela visualização de um halo mais claro ao redor da colônia em crescimento.

#### **4.3.3. Pectinase 5**

A metodologia para o preparo de meio de detecção de produção de pectinases foi de acordo Hankin e Anagnostakis (1975). Os reagentes utilizados para o preparo de um litro de meio de cultura foram: extrato de levedura (2 g), pectina cítrica (10 g) e ágar (15 g), ajustando-se o pH para 5,0. Os reagentes foram adicionados em água destilada e autoclavados a 121°C por 20 minutos.

Neste pH é possível detectar a atividade da enzima pectato liase. Para a avaliação, cobriu-se o meio de cultura com uma solução aquosa de brometo de hexadecil trimetil amônio (1%). Este reagente precipita a pectina intacta no meio, gerando uma zona mais clara ao redor da colônia micelial, onde a pectina foi consumida, indicando reação positiva.

#### **4.3.4. Pectinase 7**

O meio de cultura utilizado bem como o procedimento de avaliação de atividade desta enzima, pectinase 7, foram os mesmos descritos para a enzima pectina 5 (Item 5.6.3). A única diferença foi o pH, agora ajustado para 7,0, condição necessária para se detectar a produção da enzima pectina polimerase (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975). Os reagentes foram adicionados de água destilada a autoclavados a 121°C, por 20 minutos.

#### **4.3.5. Celulase**

A metodologia para o preparo de meio de detecção de produção de celulase foi de acordo com Santos (2007) e Poiting (1999), sendo os reagentes utilizados para o preparo de um litro de meio de cultura: sulfato de amônio (1 g), fosfato de potássio (1 g), sulfato

de magnésio (1 g), cloreto de sódio (0,001 g), carboximetilcelulose (CMC) (10 g) e ágar (15 g). Os reagentes foram diluídos em água destilada e autovaclados 121°C, por 20 minutos.

Sendo um substrato para endoglucanases, a CMC pode ser usada para a detecção da atividade das enzimas celulolíticas endoglucanase e  $\beta$ -glucosidases. Para a avaliação, adicionaram-se nas placas colonizadas 5 mL de vermelho do congo (2%), aguardando-se 15 minutos. Após, descartou-se a solução, e em seguida, depositou-se 5 mL de NaCl (1N) na superfície das mesmas, aguardando-se novamente 15 minutos.

A degradação do CMC é detectada através da presença de uma área amarelo-opaco, ao redor das colônias miceliais, destacando-se contra a região vermelha do meio de cultura devido à presença de CMC intacta (POITING, 1999).

#### **4.3.6. Lipase**

A metodologia utilizada para o preparo de meio de detecção de produção de lipases foi de acordo com Souza (2007) e Hankin e Anagnostakis (1975). Os reagentes utilizados para o preparo de um litro de meio de cultura foram: Polissorbato (Tween-20) (5 mL), peptona (5 g), cloreto de sódio (5 g); cloreto de cálcio (0,010 g), gelatina (40 g) e ágar (20 g). O Polissorbato foi medido com auxílio de pipeta separadamente dos demais reagentes (solução A), os quais foram solubilizados (solução B). As soluções foram autoclavadas a 121°C, 20 minutos. No momento de verter o meio de cultura nas placas de Petri, adicionou-se a solução A junto à solução B, sendo homogeneizados e vertidos nas placas.

Ao produzir lipase, o Polissorbato é degradado a ácidos graxos e, desta forma, há a liberação de sais de cálcio no meio (PLOU *et al.*, 1998). Esses cristais são evidenciados pela formação de halo claro ao redor das colônias miceliais. Nesta situação, a presença do halo evidencia reação positiva.

#### **4.4. EXPERIMENTO 4 – DEGRADAÇÃO ACELERADA DE EUCALYPTUS UROGRANDIS**

Para a avaliação da degradação da madeira, optou-se em utilizar os fungos *P. sanguineus* (Jaú-30), *L. bertieri*, *Xylaria* sp. e *L. edodes* (Led 98/47), através dos resultados obtidos nos ensaios de patogenicidade, crescimento micelial e atividade enzimática, seguindo a metodologia denominada de “soil-block”, baseado na norma ASTM/2017 (American Society for Testing and Materials).

O método consiste, basicamente, no crescimento miceliano de fungos em amostras de madeira, dispostas sobre terra, no interior de frascos de vidro. Inicialmente, coloca-se uma amostra de madeira de durabilidade natural baixa, denominada de alimentador, sobre o solo (Figura 6 C e D). Este, por sua vez, é inoculado com o fungo e, após a colonização, coloca-se sobre o alimentador a amostra de madeira, denominada de corpo-de-prova e, cuja resistência natural será avaliada.

Após o período de exposição dos corpos-de-prova aos fungos, a perda de massa da madeira é obtida pela diferença entre massa inicial e a massa final, chegando-se à suscetibilidade ou resistência da madeira a um determinado fungo.

##### **4.4.1 Coleta e preparo das madeiras: alimentadores e corpos-de-prova**

Para a confecção dos alimentadores, utilizou-se madeira de *Pinus taeda*, de seis anos de idade, a qual foi doada pelo Horto Florestal de Avaré/SP. O tamanho dos alimentadores foi de 50 x 30 x 3 mm (comprimento x largura x espessura). Esses alimentadores não foram lixados, e a esterilização deu-se por autoclavagem, juntamente com o solo nos frascos de vidro.

A madeira utilizada como corpo-de-prova para avaliação da capacidade degradadora dos fungos foi proveniente de 13 árvores de *Eucalyptus urograndis* (clone 105 urograndis) com idade de 7 anos, da Fazenda São Manoel, município de São Manuel/SP, doada pela empresa Eucatex S/A. De cada árvore, retirou-se um torete de 50 cm de comprimento, a uma distância de 10 cm do solo. Desses toretes, secos em local protegido de umidade por um período de 45 dias, foram confeccionados os corpos-de-prova nas dimensões 25 x 25 x 10 mm

(comprimento x largura x espessura), com a menor dimensão paralela às fibras da madeira, no sentido longitudinal da árvore.

Para a confecção dos corpos-de-prova (Figura 6 A e B), descartou-se o alburno dos toretes, e a madeira restante, cerne e medula, foram cortados. Após, esses corpos-de-prova foram todos reunidos, eliminando-se assim, o fator árvore no delineamento experimental, de modo que não se avaliaram as diferentes orientações das células da madeira, ou seja, o cerne e a medula.

Os corpos-de-prova foram lixados (lixa de 20 mm), identificados com uma numeração a lápis, secos em estufa a  $102 \pm 3^\circ\text{C}$ , até peso constante, pesados em balança digital de quatro dígitos (GEHAKA BG 400), determinando-se assim, a massa inicial ( $P_i$ ) dos mesmos. Os corpos-de-prova foram acomodados em placas de Petri de vidro (Figura 6 A) e autoclavados  $120^\circ\text{C}$ , por 30 minutos.

#### **4.4.2. Solo**

O solo utilizado foi coletado do horizonte B de um Latossolo Roxo, textura argilosa, capacidade de retenção de água de 29%, proveniente da Fazenda Experimental Edgárdia, pertencente à FCA-UNESP de Botucatu-SP. O solo foi acomodado em caixa plástica de polietileno com tampa, de capacidade de 300 litros. Procedeu-se à análise de pH, ajustando-o para 4.7, com adição de calcário dolomítico (PRNT 91,5%). Semanalmente, dentro do período de um mês, a mesma foi umedecida e revolvida. Após, a amostra foi seca ao ar livre e peneirada (malha de 4 mm de abertura), para a eliminação de impurezas e quebra de torrões.

Para a determinação da umidade, amostras de 100 g do solo foram dispostos em dez copos plásticos ( $P_i$ ), com furos na base e protegidos com algodão. Adicionaram-se vagarosamente 100 mL de água em cada amostra de solo. Aguardaram-se 30 minutos e, em seguida, os copos com o solo mais a água, foram novamente pesados ( $P_f$ ). A umidade foi obtida pela quantidade de água ( $P_f - P_i$ ) que permaneceu nas amostras de solo, em porcentagem.

#### **4.4.3. Preparo dos frascos e inoculação**

Utilizaram-se frascos de vidro (600 mL), com tampa metálica rosqueável (com papel filtro, 10  $\mu\text{m}$ ), que receberam 300 g de solo seco. Para o ensaio de degradação,

empregaram-se duas umidades no solo, 50 e 100% da capacidade de campo, ajustando-se com água destilada. Para o emprego da umidade de 50%, adicionaram-se 70 mL de água, e para a umidade de 100%, utilizaram-se 140 mL de água. Tratamentos controle, com solo sem adição de água (Testemunha A), e nas umidades de 50% (Testemunha B), de 100% (Testemunha C), também foram preparados. Após, colocou-se um alimentador na superfície do solo de cada frasco (Figura 6 C), identificando-os e submetendo-os à esterilização, a 121°C durante uma hora, pelo processo de tindalização (três autoclavagens, com intervalos de 24 horas).

Em seguida, inocularam-se os alimentadores com discos de meio BDA ( $\phi$  7 mm), colonizados com *P. sanguineus*, *L. bertieri*, *Xylaria* sp. e *L. edodes* (25°C, 5 dias), retirados da região periférica das colônias e depositados num dos cantos dos alimentadores (Figura 6 C). A seguir, os frascos foram incubados a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , durante 25 dias, no escuro, para a colonização dos alimentadores. Após esse período, colocou-se um corpo-de-prova de eucalipto urograndis no centro de cada alimentador colonizado, e os frascos foram novamente incubados, nas mesmas condições. O delineamento foi casualizado, em esquema fatorial  $4 \times 2 \times 4$  (fungos  $\times$  umidades  $\times$  períodos), com oito repetições para cada período de avaliação.



**Figura 6:** Materiais usados para o ensaio da degradação acelerada da madeira de eucalipto urograndis. **A:** Acomodação dos corpos-de-prova em placas de Petri, para esterilização. **B:** Corpo-de-prova após autoclavagem. **C:** Alimentador colonizado sobre o solo; **D:** Alimentador e corpo-de-prova colonizado por fungo.

#### 4.4.5. Variáveis analisadas no ensaio de degradação acelerada

##### 4.4.5.1. Perda de massa dos corpos-de-prova

Avaliou-se a perda de massa dos corpos-de-prova aos 30, 60, 90 e 120 dias, após a deposição destes sobre os alimentadores colonizados. Em cada período, retiraram-se os corpos-de-prova dos frascos, removendo-se o micélio da superfície dos mesmos com escova de cerdas macias em água corrente de torneira. A seguir, os corpos-de-prova foram secos até peso constante em estufa com circulação forçada de ar ( $102 \pm 3^\circ\text{C}$ ). Posteriormente, foram pesados em balança para verificação do massa final destes ( $P_f$ ). A perda de massa foi calculada pela equação:

$$\text{Perda de massa (\%)} = [(P_i - P_f) / P_i] \times 100$$

Onde:

$P_i$  = massa inicial do corpo-de-prova (g)

$P_f$  = massa final do corpo-de-prova (g)

##### 4.4.5.2. Análise química dos corpos-de-prova após a degradação

O objetivo destas análises foi de correlacionar a perda de massa da madeira de eucalipto urograndis com o consumo dos componentes químicos da madeira, extrativos, lignina, hemicelulose e celulose, após 120 dias de degradação. Dessa forma, foi possível se conhecer a capacidade metabólica do *P. sanguineus*, *L. bertieri*, *Xylaria* sp. e *L. edodes*.

Para a análise química da madeira, prepararam-se 25 frascos adicionais de cada tratamento (fungo x umidade), além dos tratamentos testemunhas A, B, C. Os corpos-de-prova avaliados nas análises químicas, foram reunidos entre si, de acordo com os tratamentos, gerando uma única amostra. As análises foram feitas em duplicata.

A limpeza dos corpos-de-prova seguiu da mesma forma como descrito no item 5.8.1. Após, os corpos-de-prova foram seccionados manualmente, para a forma de cavacos, com auxílio de formão e martelo. A madeira de cada tratamento foi colocada em placas de Petri

de vidro, devidamente identificados, e secos em estufa a  $35 \pm 5^\circ\text{C}$ , por sete dias. Esse material não foi seco a  $102 \pm 3^\circ\text{C}$ , pois isto poderia influenciar o resultado final das análises.

Após, os cavacos de cada tratamento foram moídos até serragem, em macro moinho Wiley, com tela de 10 mesh. A serragem obtida foi classificada em vibrador Produtest, para obtenção das frações 40 e 60 mesh (F 40/60), cuja fração foi utilizada para todas as análises químicas. O preparo da madeira para as análises químicas foi de acordo com a norma TAPPI T264 cm-07 (TAPPI, 1997); extrativos totais, de acordo com a norma T204 cm-07 (TAPPI, 1997); lignina Klason, de acordo com a norma TAPPI T222 om-11 (TAPPI, 1999); holocelulose, de acordo com a norma T249 cm-09 (TAPPI, 1999); celulose de acordo com Santos (2000) e Wright e Wallis (1998).

### **Extrativos totais**

Para a determinação do teor de extrativos totais, pesou-se o equivalente a um grama de serragem (base seca) de todos os tratamentos ( $P_1$ ), acomodando-os em envelopes de papel filtro, sendo identificados e fechados com grampos. As serragens contidas nos envelopes foram submetidas à duas extrações: a primeira extração foi feita com álcool-tolueno (proporção de 1:2), e a segunda extração, feita 24 h após a primeira, com álcool 96° GL.

Para as duas extrações, acomodaram-se todos os envelopes no extrator, o qual é conectado ao balão volumétrico de borossilicato, que permanece acomodado em manta aquecedora. Realizaram-se as extrações das serragens adicionando-se ao balão, 200 mL da solução álcool-tolueno, aquecida a  $100^\circ\text{C}$ , permanecendo constante durante oito horas. Posteriormente, aguardaram-se 16 horas para a segunda extração.

Para a segunda extração, conectou-se ao extrator, um novo balão, o qual recebeu 200 mL de álcool 96° GL. O tempo decorrido foi de oito horas consecutivas a  $100^\circ\text{C}$ . Após o período de descanso de 16 horas, os envelopes foram retirados do conjunto extrator, acomodados em copo de béquer de vidro, de um litro, e submetidos à extração em água quente, a  $90^\circ\text{C}$  em chapa aquecedora, durante quatro horas.

Depois, os envelopes foram secos em estufa a  $35 \pm 5^\circ\text{C}$ , retiraram-se as serragens contidas neles, transferindo-as para cápsula de Petri (previamente pesada), secos em estufa ( $105^\circ\text{C}$ , 24 horas) e pesados em balança digital (Marca Marte, modelo AW 220), para a

determinação do peso final ( $P_{fe}$ ) da serragem após a extração. O teor de extrativos totais foi determinado pela equação:

$$\% E = \frac{P_1 - P_{fe}}{1} \times 100$$

Onde:

$\% E$  = Extrativos totais

$P_1$  = Massa inicial de serragem base seca

$P_{fe}$  = Massa final da serragem após a extração

### **Lignina total**

Após a determinação do teor de extrativos totais, as mesmas serragens, aqui denominadas de amostras ( $P_1$ ), que sofreram a ação de algum componente químico, foram utilizadas para a determinação do teor de lignina total, pelo método de hidrólise ácida em ácido sulfúrico 72%, denominada de lignina Klason. As amostras foram acomodadas separadamente em copos de béquer de vidro (100 mL), adicionaram-se 15 mL de solução de  $H_2SO_4$  72%, os quais foram aquecidos em banho-maria (18-20°C), durante duas horas, mexendo-se periodicamente com bastão de vidro.

Após, as amostras foram transferidas para erlenmeyers de um litro, e adicionaram-se 560 mL de água destilada. Os recipientes foram levados à chapa aquecedora, submetendo-os à fervura durante 4 horas, mas mantendo periodicamente o nível de água. Após esse período, deixaram-se as amostras nos erlenmeyers em repouso durante 16 horas, permitindo assim, a decantação das amostras no fundo dos recipientes.

Em seguida, transferiram-se as amostras dos erlenmeyers para cadinhos de vidro de placa sinterizada (previamente pesados), com auxílio de água destilada morna ( $\pm 500$  mL). Os cadinhos foram acoplados em uma bomba à vácuo e filtrados. Em seguida, levaram-se os cadinhos de vidro com as serragens à estufa a 105°C, por 24 horas e determinaram-se o peso residual da lignina ( $P_{fl}$ ) em balança digital (Marca Marte, modelo AW 220).

O teor de lignina total foi determinado pela seguinte equação:

$$\% L = \frac{P_1 - P_{fL}}{1} \times 100$$

Onde:

$\% L$  = Lignina total

$P_1$  = Massa inicial de serragem base seca (g)

$P_{fL}$  = Massa final da serragem após a hidrólise ácida (g)

### Holocelulose total

O teor de holocelulose (celulose + hemicelulose) de cada tratamento foi determinado por hidrólise com  $\text{NaClO}_2$  (20%) e ácido acético (20%). Para tanto, pesaram-se dois gramas de serragem, base seca, ( $P_1$ ). As serragens foram transferidas para erlenmeyers, de 250 mL, adicionaram-se 3 mL de clorito de sódio ( $\text{NaClO}_2$ ) e 2 mL de ácido acético e, levando-os a banho-maria a 80°C. A cada 45 minutos, retiraram-se os erlenmeyers do banho-maria, adicionaram-se novamente as mesmas quantidades de clorito de sódio e de ácido acético e retornando-os ao banho-maria. Essa operação foi realizada por quatro vezes consecutivas.

Após, as transferiram-se as amostras para cadinhos de vidro de placa sinterizada (previamente pesados) com água destilada morna ( $\pm 500$  mL), os quais foram filtrados em bomba à vácuo. Levaram-se os cadinhos e as serragens à secagem em estufa a 105°C, por 24 horas. Determinou-se a massa residual de holocelulose total ( $P_{fH}$ ), em balança digital (Marca Marte, modelo AW 220).

O teor de holocelulose foi determinado pela seguinte equação:

$$\% H = \frac{P_1 - P_{fH}}{2} \times 100$$

Onde:

$\% H$  = Holocelulose total

$P_1$  = Massa inicial de serragem base seca (g)

$P_{fH}$  = Massa final da serragem após a hidrólise ácida (g)

O teor de hemicelulose total foi obtido pela diferença dos valores resultantes obtidos entre a holocelulose total e a celulose total.

### **Celulose total**

Para a determinação do teor de celulose total das serragens de todos os tratamentos, fez-se necessária a hidrólise dos componentes na madeira, feita em duas fases. Na primeira fase, utiliza-se perborato de sódio e peróxido de hidrogênio como reagentes. As amostras resultantes desta fase são aqui denominadas de CE1.

Na segunda fase da hidrólise, as amostras que foram hidrolisadas pelo perborato e peróxido de hidrogênio foram submetidas à extração alcalina, com hidróxido de sódio, e denominada de CE2. A extração alcalina faz-se necessária porque elimina possíveis grupos acilas nas cadeias de polissacarídeos, devido à presença de ácido acético glacial nas amostras que sofreram hidrólise pelo ácido peroxiacético. Dessa forma, os pesos das amostras resultantes dessa segunda fase de reação é que foram usados para determinar o teor de celulose total.

Para tanto, pesaram-se um grama de serragem (base seca) de cada tratamento ( $P_1$ ), colocadas em envelopes de papel filtro, fechados com grampos, e submetidos à extração de forma idêntica à metodologia utilizada para a determinação dos extrativos totais. Após a extração, as amostras (dentro dos envelopes) foram secas em temperatura ambiente ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ), por duas semanas. Em seguida, para a hidrólise das amostras e determinação da CE1, utilizaram-se uma solução composta por perborato de sódio trihidratado (5,6 g), dissolvido em 25 mL de ácido acético glacial e 25 mL de peróxido de hidrogênio 30%. Esta solução foi denominada de solução A.

As amostras foram acomodadas em balões de vidro de fundo chato, de 250 mL, e em cada balão, adicionaram-se todo o volume da solução A sobre as amostras, levando-se a banho-maria ( $120^\circ\text{C}$ ), por quatro horas. Retiraram-se os balões do banho-maria e, após o resfriamento destes, removeram-se as amostras dos balões para cadinhos de vidro de placa sinterizada (previamente pesados), com auxílio de água morna (500 mL), filtrando-as em bomba à vácuo. Após, levaram-se os cadinhos com as amostras para estufa, a  $105^\circ\text{C}$ , por 24 horas e, determinaram-se o peso residual da celulose ( $P_{FC1}$ ) em balança digital (Marca Marte, modelo AW 220).

O teor de CE 1 total foi determinado pela seguinte equação:

$$\% \text{ CE1} = \frac{\mathbf{P_1} - \mathbf{P_{fC1}}}{2} \times 100$$

Onde:

**% CE1** = Celulose total

**P<sub>1</sub>** = Massa inicial de serragem base seca (g)

**P<sub>fC1</sub>** = Massa final da serragem após a hidrólise ácida (g)

Após a determinação do peso residual da CE1, procedeu-se à extração alcalina das amostras para obtenção da CE2. Para tanto, transferiram-se quantitativamente as amostras contidas nos cadinhos de vidro para copos de bquer de 250 mL. Após, adicionaram-se 25 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 5,2 N e levaram-se as amostras e o reagente para banho-maria a 25°C, durante uma hora, homogeneizados periodicamente com bastão de vidro.

Após o resfriamento, transferiram-se as amostras com auxílio de água morna ( $\pm$  500 mL) em cadinhos de vidro de placa sinterizada, depois foram filtradas em bomba à vácuo, e levados à estufa a 105°C, por 24 horas. Após, determinaram-se o peso residual de celulose total (**P<sub>fC2</sub>**), em balança digital (Marca Marte, modelo AW 220).

O teor de celulose foi determinado a partir do material de partida, ou seja, de um grama de base seca, pela seguinte equação:

$$\% \text{ CE2} = \frac{\mathbf{P_1} - \mathbf{P_{fC2}}}{2} \times 100$$

Onde:

**% CE2** = Celulose total

**P<sub>1</sub>** = Massa inicial de serragem base seca (g)

**P<sub>fC2</sub>** = Massa final da serragem após a extração alcalina (g)

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DOS FUNGOS EM PLANTAS DE EUCALIPTO UROGRANDIS**

A temperatura média tomada durante as duas avaliações foi de 22,6 °C e a umidade média de 54,2 % (Figura 1). Os valores médios destas variáveis também são favoráveis ao crescimento dos fungos apodrecedores, conforme já observado na literatura. Zabel e Morrel (1992) verificaram que a temperatura favorável para o desenvolvimento de fungos apodrecedores situa-se entre 15 e 40°C. Quanto à umidade, Kües e Liu (2000) verificaram que o conteúdo adequado de água presente na madeira para o crescimento de fungos basidiomicotas deve estar entre 35 - 60%.

Verificou-se, através da inoculação artificial, que todos os fungos inoculados, *P. sanguineus* (Jaú-30, BT-11), *L. bertieri*, *Xylaria* sp., *L. edodes* (Led 98/47, 96/13), *Stereum ostrea* (BT-1) e o Dut-1, não foram patogênicos às plantas eucalipto urograndis nas condições avaliadas. No geral, aos 30 e 60 dias, as lesões internas e externas foram menores às testemunhas, não havendo diferenças estatísticas significativas (Tabelas 1 e 2).

A cicatrização mais relevante das lesões externas das plantas avaliadas, de 30 para 60 dias, foi de *P. sanguineus* (BT-11), em 18 %, *L. edodes* (Led 98/47), em 25 %, e da testemunha, em 21 % (Tabela 1). Porém, houve aumento das lesões externas nas plantas inoculadas com *P. sanguineus* (Jaú-30), *L. bertieri* e *S. ostrea*, em 5, 11 e 16 %, na segunda avaliação, respectivamente, contudo, sem diferença estatística da testemunha.

Enquanto que as lesões externas de *Pycnoporus sanguineus* (BT-11) e *L. edodes* (Led 98/47) foram menores aos 60 dias, o tamanho das lesões internas, avaliadas neste mesmo período, aumentaram em 7 e 30 %, respectivamente. Contudo, somente as lesões de *L. edodes* avaliadas apresentaram diferença estatística entre as avaliações e com a testemunha, aos 30 dias (Tabela 1).

No geral, as plantas mostraram rápida resposta de defesa aos ferimentos internos, já aos 30 dias após a inoculação, sendo que todas as lesões avaliadas das plantas inoculadas com fungos foram menores às lesões das plantas testemunhas. Além disso, na segunda avaliação, lesões internas ainda menores foram observadas, em relação às testemunhas. A recuperação das lesões internas de *P. sanguineus* (Jaú-30) e *L. bertieri* aos 60 foram de 84 e 100%, em relação aos 30 dias. Observou-se também que o tamanho das lesões internas das plantas inoculadas com *L. edodes* (Led 96/13) e *L. bertieri* cicatrizaram completamente (Tabela 2), ficando visíveis apenas calos (Figura 7 G).

Observou-se que a recuperação das lesões externas aos 60 dias, de *P. sanguineus* (Jaú-30) e *L. bertieri*, foram inversamente proporcionais à recuperação das lesões internas, ou seja, enquanto que as lesões internas diminuíram de tamanho de 30 para 60 dias, as lesões externas aumentaram. Contudo, não houve diferença estatística em relação às testemunhas (Tabelas 1 e 2).

Comportamento similar foi observado com o tamanho das lesões avaliadas nas plantas inoculadas com *P. sanguineus* (BT-11) e *L. edodes* (98/47). O tamanho das lesões externas das plantas foi menor na segunda avaliação, enquanto que o tamanho das lesões internas foram maiores na segunda avaliação.

**Tabela 1:** Diâmetro (cm) das lesões externas no caule de eucalipto urograndis aos 30 e 60 dias após a inoculação com os fungos *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Xylaria* sp., *Lentinula edodes*, *Stereum ostrea* e um isolado não identificado\*.

Fungos	Dias após a inoculação	
	30 dias	60 dias
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (Jaú-30)	0,59 abA	0,62 aA
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (BT-110)	0,79 aA	0,65 aB
<i>Lentinus bertieri</i> (BFT-35)	0,66 abA	0,73 aA
<i>Xylaria</i> sp. (BT-23)	0,73 abA	0,70 aA
<i>Lentinula edodes</i> (Led 98/47)	0,73 abA	0,55 aB
<i>Lentinula edodes</i> (Led 96/13)	0,61 abA	0,56 aA
<i>Stereum ostrea</i> (BT-1)	0,54 bA	0,64 aA
Dut-1*	0,71 abA	0,71 aA
Testemunha	0,88 abA	0,70 aA

Letras minúsculas comparam médias na vertical e letras maiúsculas comparam médias na horizontal. Dados foram transformados em  $(x + 0,5)^{1/2}$ . Médias de quatro repetições.

Embora *Stereum ostrea* apresentasse lesões externas e internas maiores aos 60 dias (Tabela 1 e 2), houve diferença estatística em relação à testemunha somente neste período de avaliação. No entanto, outros testes devem ser conduzidos a fim de descartar a possibilidade de patogenicidade de *S. ostrea*. Segundo Alexopoulos *et al.* (1996), algumas espécies do gênero *Stereum* podem se comportar, em alguns casos, como patógenos a plantas debilitadas ou doentes.

As plantas inoculadas com *Xylaria* sp. e Dut-1, e também a testemunha, tiveram diminuição do tamanho das lesões internas e externas da primeira para a segunda avaliação, em 58, 68 e 100 %, respectivamente (Tabelas 1 e 2). *L. edodes* (96/13) não causou nenhum tipo de reação no tecido vegetal das plantas, visto pela presença somente de calos nas regiões inoculadas.

**Tabela 2:** Diâmetro (cm) das lesões internas no caule de eucalipto *urograndis* aos 30 e 60 dias após a inoculação com os fungos *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Xylaria* sp., *Lentinula edodes*, *Stereum ostrea* e um isolado não identificado\*.

Fungos	Dias após a inoculação	
	30 dias	60 dias
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (Jaú-30)	0,18 bA	0,03 abA
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (BT-110)	0 bA	0,07 abA
<i>Lentinus bertieri</i> (BFT-35)	0,15 bA	0 bA
<i>Xylaria</i> sp. (BT-23)	0,31 abA	0,13 abA
<i>Lentinula edodes</i> (Led 98/47)	0 bB	0,30 abA
<i>Lentinula edodes</i> (Led 96/13)	0 bA	0 bA
<i>Stereum ostrea</i> (BT-1)	0,36 abA	0,49 aA
Dut-1*	0,22 bA	0,07 abA
Testemunha	0,72 aA	0 bB

Letras minúsculas comparam médias na vertical e letras maiúsculas comparam médias na horizontal. Dados foram transformados em  $(x + 0,5)^{1/2}$ . Médias de quatro repetições.

Não se observaram plantas com sintomas ou sinais de doença durante os períodos de avaliação, sejam estes, murcha, secamento das folhas ou lesões nos caules. Em caso afirmativo de patogenicidade, as lesões externas e internas seriam maiores, com exsudação de goma ou escurecimento do lenho, conforme observado por Roux *et al.* (2004), em plantas de *E. grandis* inoculadas com os fungos patogênicos *Ceratocystis fimbriata* e *C. pirilliformis*.

Segundo Leite e Stangarlin (2008), a presença direta de fungos no tecido vegetal pode induzir a planta a se defender mais rapidamente. Quando há interação entre patógeno e hospedeiro, vias metabólicas de ambas as partes são ativadas e o produto dessa interação pode resultar em repostas bioquímicas localizadas ou sistêmicas.

No presente trabalho, considerando-se o diâmetro inicial dos ferimentos da casca (5 mm), tem-se que a recuperação média das lesões externas e internas das plantas inoculadas foi da ordem de 20 a 67 %, respectivamente (Tabelas 1 e 2), ficando visíveis apenas

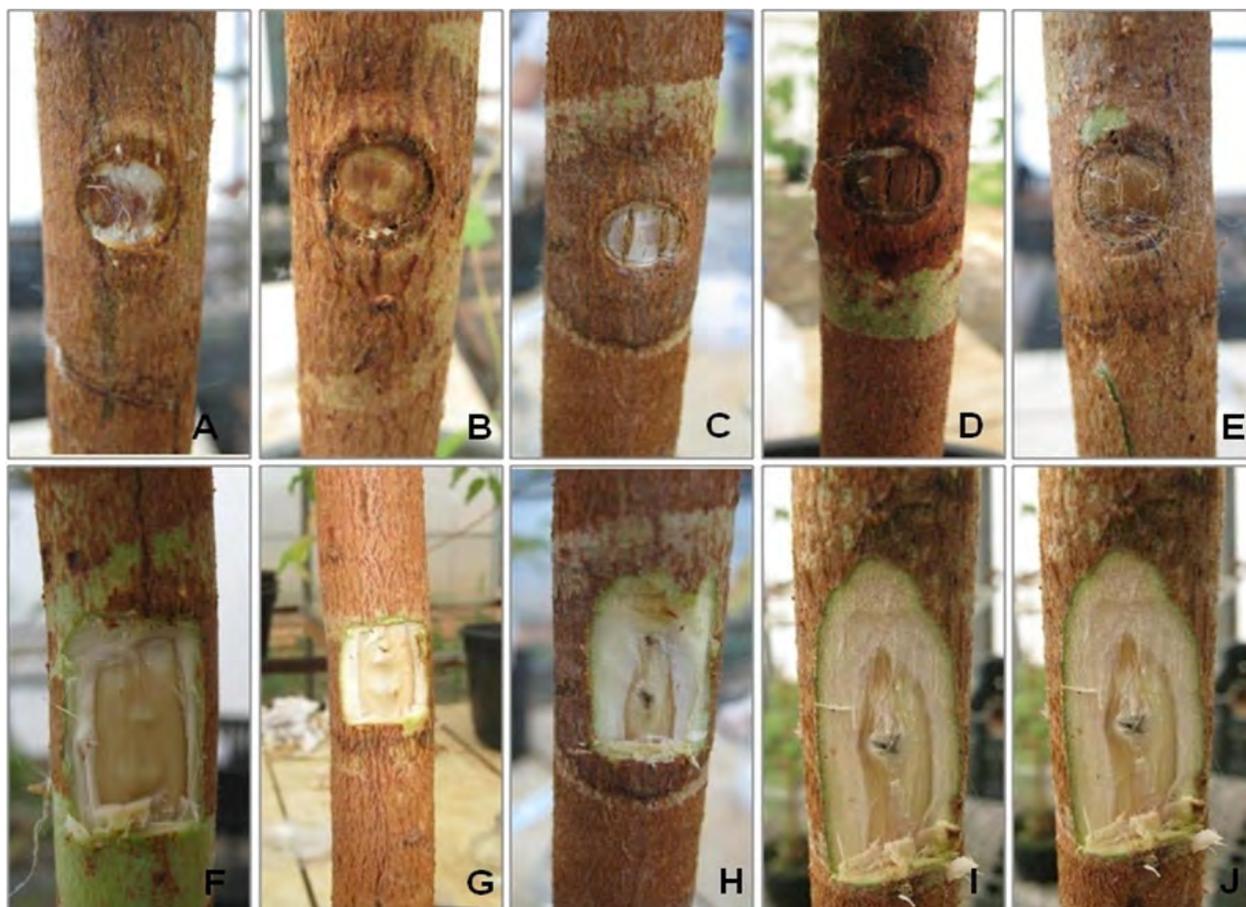
cicatrizes ou calos. Conforme Ferreira (1989), os calos são regiões anatomicamente modificadas formadas após uma injúria, sejam elas bióticas ou abióticas. Estes níveis de recuperação foram semelhantes às lesões das plantas testemunhas, que foram de 21 e 100%, para as lesões externas e internas, respectivamente.

O comportamento das árvores frente às lesões é dependente das interações entre o hospedeiro, o patógeno e o ambiente. De acordo com Chen *et al.* (2011), árvores de *E. grandis* inoculadas com *Botryosphaeria* spp. apresentaram lesões características da doença, ou seja, a formação de cancrios, na sexta semana após a inoculação. No presente estudo, por sua vez, verificou-se que as plantas de eucalipto *urograndis* foram resistentes aos fungos, visto pela capacidade de regeneração das mesmas.

As cicatrizes ou calos são formados por uma nova camada de células corticosas, que recobrem completamente o tecido exposto. Essa rápida regeneração evita ou impede a entrada de outros microrganismos e/ou pragas. A casca inicia rapidamente a formação de uma nova epiderme, caracterizando um mecanismo de defesa não-específico, ou seja, ocorre da mesma forma quando causada agentes bióticos e abióticos (FERREIRA, 1989).

Observaram-se também cicatrizes escuras e manchadas irregularmente em algumas plantas, nos ferimentos internos. Segundo Barry *et al.* (2000), nesses locais, barreiras são formadas logo após a injúria, oferecendo proteção ao alburno e xilema sadios. Afim de impedir ainda mais a colonização fúngica nos tecidos vivos, são formadas tiloses, nas porções do xilema próximas ao local infectado, que obstruem os vasos, na tentativa de impedir o desenvolvimento fúngico no sentido vertical do lenho (FERREIRA, 1989, RAY e EICHHORN, 2006).

Além da formação de novas células, a árvore pode produzir compostos fenólicos, envolvidos nos processos de defesa. Esses compostos constituirão, juntamente com o xilema infectado e o alburno existente, a zona de reação, que formam fronteiras ao redor das lesões, retendo suas funções por um período de tempo, além de inibir o crescimento microbiano (PEARCE, 2000). Segundo Shigo e Hillis (1973), muitos eventos ocorrem após o ferimento da planta, e fatores como a sanidade da mesma, idade, espessura da casca, posição e tamanho do ferimento afetarão diretamente a extensão dos seus ferimentos, sendo que, em geral, árvores sadias são mais aptas a contornar os ferimentos.



**Figura 7:** Lesões externas (acima, A a E) e internas (abaixo, F a J) de plantas de eucalipto urograndis, avaliadas aos 60 dias após a inoculação dos fungos pelo método do disco. **A e F:** *Pycnoporus sanguineus*; **B e G:** *Lentinus bertieri*; **C e H:** *Xylaria* sp.; **D e I:** *Lentinula edodes*; **E e J:** Testemunha, inoculada com disco de meio de cultura sem micélio.

Nos povoamentos de eucalipto, a desrama natural e algumas práticas culturais podem gerar situações favoráveis a muitos tipos de microrganismos, constituindo uma porta de entrada livre para os mesmos nos tecidos vegetais saudáveis (SHIGO, 1985).

Após a inoculação com duas espécies de fungos apodrecedores, *Acanthophysium sparsum* e um isolado não identificado, ambos obtidos de ramos podados de plantações de eucalipto, Deflorio *et al.* (2007) verificaram que *E. globulus* e *E. nitens* produziram fenóis logo após ferimento e inoculação. A aparente resistência de *E. globulus* aos fungos pode ser influenciada especialmente pela presença de terpenos.

Embora a maior parte dos basidiomicotas não seja fitopatogênica, o fungo *Inocutis jamaicensis* vem causando sérios danos em plantios comerciais de *E. globulus* no

Uruguai. Segundo Lupo *et al.* (2009), após a inocular esse fungo em *E. globulus*, a casca e o alburno não apresentaram descoloração ou podridão, indicando que esses tecidos não foram infectados. Porém, mesmo sem aparente colonização, os autores reisolaram o fungo de tecidos sadios da planta, próximos ao local do ferimento. Contudo, a patogenicidade foi confirmada por causar podridão do cerne.

Os resultados do reisolamento dos fungos presentes nos tecidos internos das plantas avaliadas aos 60 dias, foram positivos para *P. sanguineus* (BT-11), *L. bertieri* e *S. ostrea* e o Dut-1. Desta forma, novos estudos de patogenicidade dos fungos estudados deverão ser conduzidos em plantas adultas, já que estas possuem um sistema de defesa mais eficaz.

## 5.2. EXPERIMENTO 2 – CRESCIMENTO MICELIAL EM DIFERENTES TEMPERATURAS

### 5.2.1. Em serragem enriquecida

A avaliação do crescimento micelial sob as temperaturas 23, 27 e 31°C foi concluída no momento em que *Stereum ostrea* colonizou totalmente o substrato a 23°C, após nove dias de incubação, conforme demonstrado na Tabela 3 e Figura 8. O crescimento desses fungos em serragem é um dos primeiros passos para se identificar a capacidade de colonização de substratos, similares a madeira.

Na Tabela 3, têm-se as médias de crescimento micelial obtidas dos fungos nas temperaturas de 23, 27 e 31°C. Com base nos dados, é possível verificar a alta capacidade de adaptação que *P. sanguineus* e *L. bertieri* têm em relação à temperatura. No entanto, houve maior tendência de crescimento nas temperaturas mais elevadas, ou seja, a 27 e 31°C. No presente estudo verificou-se também que o crescimento micelial de *Stereum ostrea* foi mais veloz em relação aos demais fungos somente a 23°C (média diária de crescimento de 0,83 cm) e com crescimento superior a 38% em relação à *P. sanguineus* e *L. bertieri*, e 52 e 84% em relação à *Xylaria* sp. e *L. edodes*, respectivamente, após nove dias de incubação (Tabela 3).

Contudo, após o aumento da temperatura em apenas 4°C, *S. ostrea* teve seu crescimento afetado em 48% em relação à temperatura inferior (média diária de crescimento de 0,43 cm). Na temperatura de 27°C, *S. ostrea* teve taxa de crescimento 35% menor em relação ao *Pycnoporus sanguineus* e *L. bertieri*; a 31°C, tanto *S. ostrea* quanto *L. edodes* não cresceram na serragem.

Foi possível verificar também, que *Xylaria* sp. apresentou maior tendência de crescimento a 23°C, com pouco período de *lag* fase (ou fase de adaptação) ao substrato (Figura 8). Porém, a 27°C, o mesmo teve menor crescimento (próximo a 24%), em relação à temperatura inferior, e além disso, o período de *lag* fase aumentou em três dias, determinando em menor crescimento micelial, próximo a 55 e 30%, quando comparado ao *P. sanguineus* e *L. bertieri*, respectivamente (Figura 8).

*P. sanguineus* e *L. bertieri* crescerem relativamente devagar à 23°C (médias diárias de crescimento de 0,51 cm), demonstrando tendência de crescimento por temperaturas mais elevadas, a 27 e 31°C, com média diária de crescimento de 0,67 cm, para ambos. Esses fungos não tiveram período de *lag* fase (Figura 8), contribuindo para a grande capacidade de colonização em relação aos demais, gerando uma importante característica ecológica de sobrevivência ou versatilidade ecológica, principalmente na escolha de espécies para a destoca biológica, onde ocorre maior competição por substrato.

Segundo Magan (2008), fatores como a disponibilidade de água, o pH e a temperatura, influenciam diretamente o crescimento micelial dos fungos, sendo a temperatura o maior determinante de um nicho ecológico. Em geral, os fungos têm uma faixa ótima de temperatura para seu desenvolvimento e reprodução (KÜES e LIU, 2000; DIAS *et al.*, 2005).

Mswaka e Magan (1999) estudaram fungos isolados de florestas na África, e observaram uma estreita relação entre a temperatura ótima de crescimento e a região geográfica onde foram isolados. De forma similar ao estudo dos autores, observou-se o mesmo comportamento com *P. sanguineus* e *L. bertieri*, isolados de campos de reflorestamento recém cortados, momento em que a incidência solar é alta.

**Tabela 3.** Crescimento micelial (cm) de *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Xylaria* sp., *Lentinula edodes* e *Stereum ostrea*, em serragem enriquecida após nove dias de cultivo a 23, 27 e 31°C.

Fungos	Temperaturas (°C)		
	23	27	31
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	4,65 bB	6,02 aA	6,01 aA
<i>Lentinus bertieri</i>	4,72 bB	5,96 aA	6,12 aA
<i>Xylaria</i> sp.	3,59 cA	2,73 cB	0,32 bC
<i>Lentinula edodes</i>	1,22 dA	0 dB	0 bB
<i>Stereum ostrea</i>	7,50 aA	3,90 bB	0 bC

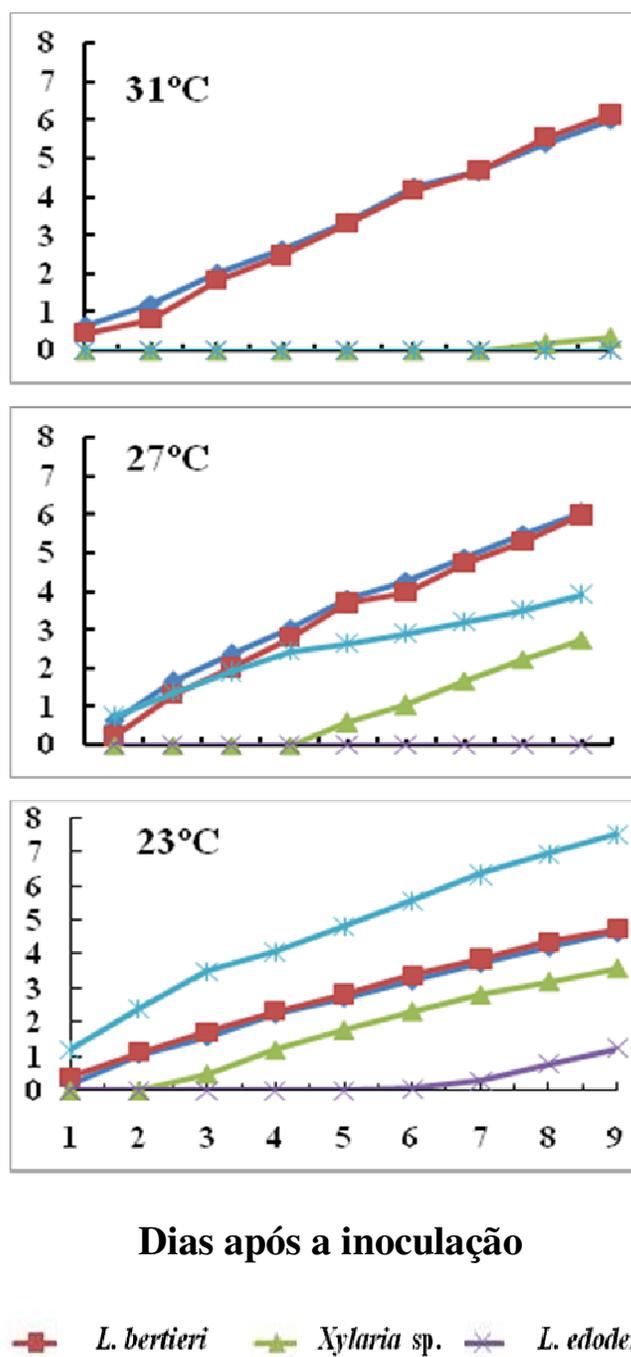
Letras minúsculas comparam médias na vertical e letras maiúsculas comparam médias na horizontal (Tukey, 5%). DMS = diferença mínima significativa; CV = coeficiente de variação. Dados foram transformados em  $(x + 0,5)^{1/2}$ . Médias de sete repetições.

Lonergan *et al.* (1993) observaram maior atividade de enzimas lignocelulolíticas (ligada à degradação da celulose e lignina) em *Phanerochaete chrysosporium* quando cultivado em meio de serragem a 37 do que a 28°C.

A maior parte das espécies fúngicas cresce em uma faixa de temperatura entre 20 a 40°C, com ótimo em 25°C. Desta forma, a maioria dos fungos é considerada termo tolerante. A preferência da temperatura, para o crescimento e metabolismo, pode variar entre e dentro das espécies e, geralmente, as espécies estão adaptadas à condição climática da região onde vivem. Por exemplo, espécies de *Trametes* de regiões tropicais crescem na faixa de 30-40°C e, as espécies de clima temperado, crescem entre 20-30°C (BALDRIAN, 2008).

O comportamento biológico face à temperatura é específico para cada espécie. Damian e Boddy (1997) verificaram que os fungos degradadores da madeira *Stropharia caerulea* e *Phanerochaete velutina*, isolados de florestas de clima frio, também se comportaram de formas distintas quando submetidas à diferentes temperaturas. Embora isolados da mesma região, *S. caerulea* cresceu na faixa de 5-20°C, enquanto *P. velutina* cresceu melhor na faixa de 5-25°C.

Entender quais são características ecológicas dos fungos em relação à temperatura é de extrema importância para a implantação da destoca microbiológica no campo. Neste local, as condições climáticas são flutuantes e podem determinar a colonização ou não dos fungos na madeira. Dessa forma, o período de inoculação (estações do ano), deve ser observado para se alcançar o sucesso da inoculação e colonização fúngica de acordo com a espécie empregada.



**Figura 8:** Crescimento micelial (cm) de *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Xylaria sp.*, *Lentinula edodes* e *Stereum ostrea*, em serragem enriquecida a 23, 27 e 31°C, após nove dias de inoculação.

### 5.2.2. Em meios de cultura

Observou-se que, neste ensaio de crescimento micelial, o substrato e a temperatura influenciaram o crescimento dos fungos de formas distintas. No geral, verificou-se que *P. sanguineus* e *L. bertieri* cresceram de modo similar, nos três tipos de meios de cultivo e nas três temperaturas estudadas. Em virtude de ser um fungo ligninolítico, *P. sanguineus* demonstrou preferência nutricional ao meio SDA, e nas maiores temperaturas, com média de crescimento de 1,95 cm, a 27 e 31°C (Tabela 5 e 6). Essas médias de crescimento foram maiores se comparadas aos meios BDA e MA (Tabela 4, Figura 9).

*L. bertieri* cresceu de forma uniforme em todos os meios e temperaturas avaliados, tendo seu crescimento micelial influenciado somente pela temperatura. As médias de crescimento diário de *L. bertieri* para os meios de cultura BDA, MA e SDA a 23°C, foram todas iguais a 1,3 cm; já nas temperaturas de 27 e 31°C, as médias diárias de crescimento foram todas iguais a 1,95 cm (Tabela 4). A capacidade de colonização deste fungo é, impreterivelmente, superior em relação aos demais.

**Tabela 4.** Crescimento micelial (cm) de *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Xylaria* sp., *Lentinula edodes* e *Stereum ostrea*, após seis dias de incubação a 23°C, em meios de cultura BDA, MA e SDA.

Fungos	Meios de cultura		
	BDA	MA	SDA
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	7,14 bB	7,28 bB	7,80 aA
<i>Lentinus bertieri</i>	7,80 aA	7,80 aA	7,80 aA
<i>Xylaria</i> sp.	5,50 cB	4,44 cC	6,02 bA
<i>Lentinula edodes</i>	2,92 dB	2,60 eC	4,68 dA
<i>Stereum ostrea</i>	7,36 bA	4,00 dC	5,38 cB

Letras minúsculas comparam as médias dentro de cada coluna e letras maiúsculas comparam médias dentro de cada linha. Média de cinco repetições.

*Xylaria* sp. e *L. edodes* também demonstraram certa preferência ao meio SDA, independente da temperatura, conforme demonstrado nas Tabelas 4, 5 e 6. O *L. edodes* mostrou tendência de crescimento a 27°C, com média de crescimento de 0,90 cm/dia. Já na temperatura de 23°C, sua média de crescimento diário foi menor, de 0,78 cm/dia.

Em relação ao *S. ostrea*, na temperatura de 23°C e no meio BDA, seu crescimento micelial foi pouco maior em relação ao *L. bertieri* (em torno de 6%). Já no meio MA, a diferença de crescimento foi de 49%. Nesta temperatura, *S. ostrea* teve um curto período de *lag* fase (Figura 9), mas o suficiente para interferir na velocidade de crescimento e na colonização do substrato, quando comparado à *L. bertieri* e *P. sanguineus*. A média de crescimento diário de *S. ostrea* foi maior no meio BDA, sendo a maior de 1,48 a 31°C. No meio SDA, seu maior crescimento diário foi de 1,06 a 27°C.

O crescimento fúngico também pode ser influenciado pelo tipo de composto lignocelulósico presente no substrato e também dos nutrientes adicionados, como observado com *Pleurotus* spp., que demonstrou preferência a meios de cultivo contendo dextrose (DONINI *et al.*, 2006).

**Tabela 5.** Crescimento micelial (cm) de *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Xylaria* sp., *Lentinula edodes* e *Stereum ostrea*, após quatro dias de incubação a 27° C em meios de cultura BDA, MA e SDA (média de cinco repetições).

Fungos	Meios de cultura		
	BDA	MA	SDA
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	6,64 bC	7,28 bB	7,80 aA
<i>Lentinus bertieri</i>	7,80 aA	7,80 aA	7,80 aA
<i>Xylaria</i> sp.	4,56 cB	3,86 cC	4,98 bA
<i>Lentinula edodes</i>	1,96 dB	1,66 dC	3,62 dA
<i>Stereum ostrea</i>	6,62 bA	3,92 cC	4,24 cB

Letras minúsculas comparam as médias dentro de cada coluna e letras maiúsculas comparam médias dentro de cada linha. DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação. Média de cinco repetições.

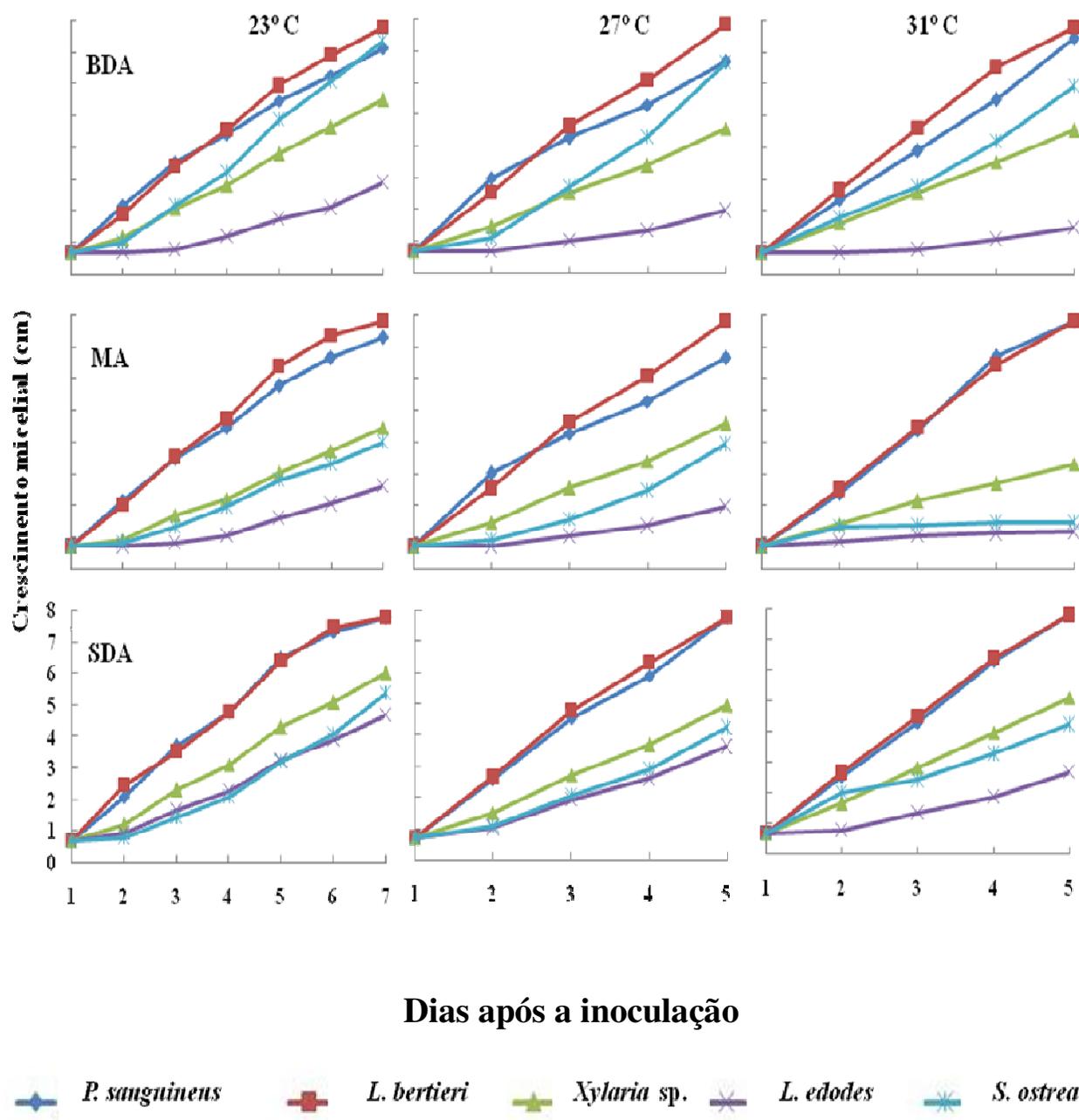
Quando açúcares são adicionados ao substrato, geralmente os fungos utilizam-no para suprir suas funções vitais como fonte de energia, para metabolizar compostos mais complexos. Segundo Griffin (1993), a presença de alguns tipos de açúcares é uma pré-exigência para que a degradação da madeira ocorra. Nesse caso, isso significa que é necessária outra fonte de carbono rapidamente metabolizável, e que em condições naturais é suprida principalmente pela hemicelulose e carboidratos simples.

Fungos de podridão branca degradam preferencialmente materiais lignocelulósicos (BLANCHETTE, 1984; OTJEN e BLANCHETTE, 1985), sendo observado nas Tabelas 4, 5 e 6. O basidiomicota *L. bertieri* demonstrou o mesmo comportamento de crescimento nos três tipos de meios e nas três temperaturas, indicando uma importante característica ecológica de adaptação, superior aos demais. Embora os meios BDA e MA sejam muito utilizados rotineiramente nos laboratórios, eles podem retardar a atividade metabólica dos fungos ligninolíticos, afetando a velocidade do seu crescimento. Neste ensaio ficou evidente a preferência dos fungos pelo meio SDA, conforme observado por Gomes-da-Costa *et al.* (2008), que observaram maior crescimento micelial de *L. edodes* em substratos a base de *Eucalyptus* sp.

**Tabela 6.** Crescimento micelial (cm) de *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Xylaria* sp., *Lentinula edodes* e *Stereum ostrea*, após quatro dias de incubação a 31 °C em meios de cultura BDA, MA e SDA.

Fungos	Meios de cultura		
	BDA	MA	SDA
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	7,44 aA	7,80 aA	7,80 aA
<i>Lentinus bertieri</i>	7,80 aA	7,80 aA	7,80 aA
<i>Xylaria</i> sp.	4,54 cB	3,30 bC	5,12 bA
<i>Lentinula edodes</i>	1,48 dB	1,16 cB	2,68 dA
<i>Stereum ostrea</i>	5,94 bA	1,46 cC	4,22 cB

Letras minúsculas comparam as médias dentro de cada coluna e letras maiúsculas comparam médias dentro de cada linha. DMS: diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação. Média de cinco repetições.



**Figura 9:** Crescimento micelial (cm) de *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Xylaria sp.*, *Lentinula edodes* e *Stereum ostrea*, em serragem enriquecida a 23, 27 e 31°C, após nove dias de inoculação.

### 5.3. EXPERIMENTO 3 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS FUNGOS

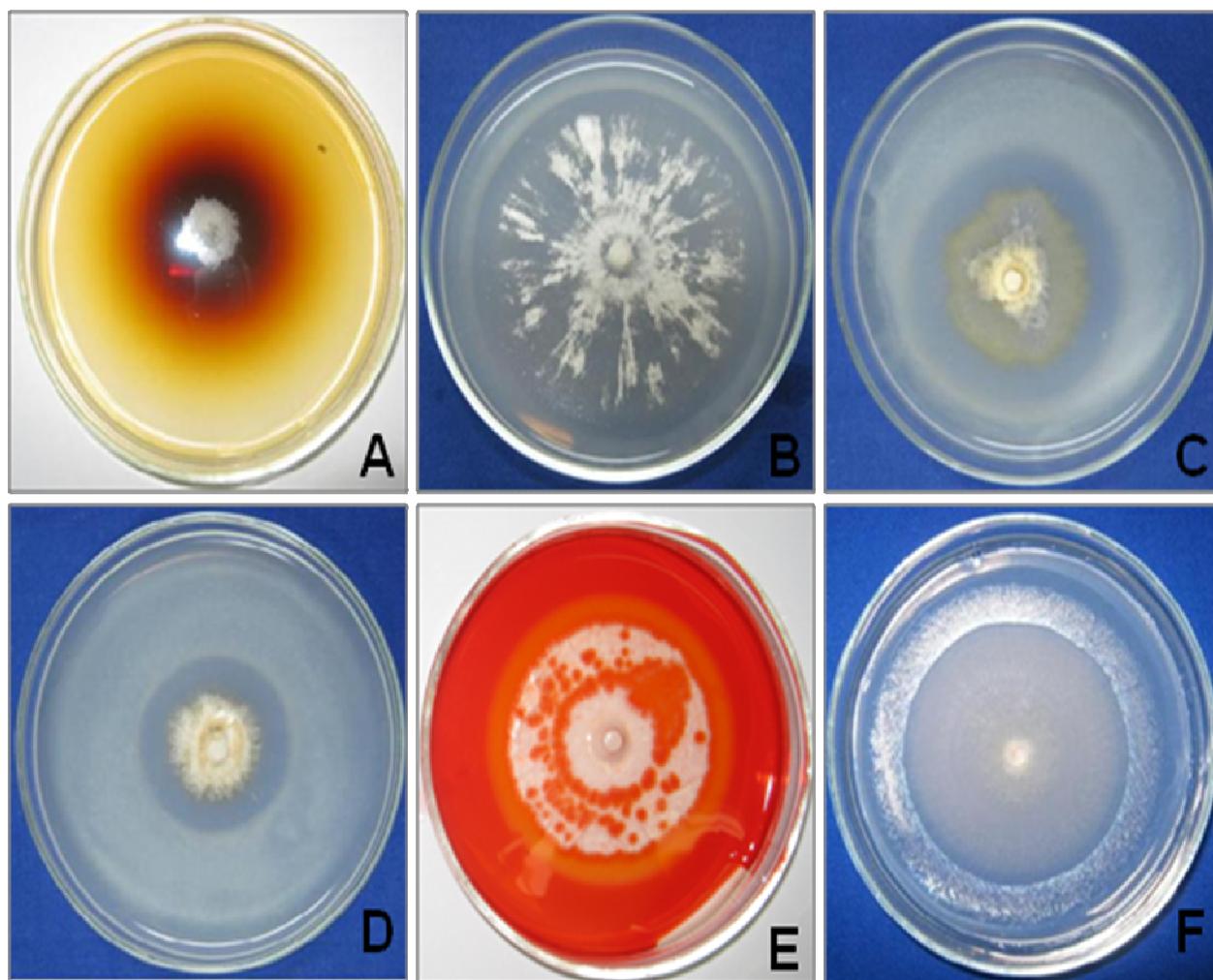
O cultivo de *P. sanguineus*, *L. bertieri*, *Xylaria* sp. e *L. edodes* e *S. ostrea* em meios de cultura específicos para a detecção de enzimas, evidenciou a produção de diferentes enzimas. Os halos formados pelos fungos, nos meios específicos que detectaram as enzimas lacase, protease, pectinases, celulasas e lipases estão demonstrados na Figura 10. Observou-se que todos os fungos produziram lacases e celulasas; somente *P. sanguineus* produziu proteases; *Xylaria* sp. e *S. ostrea* foram os únicos produtores de lipase (Tabela 7).

Enzimas extracelulares que degradam os biopolímeros, como a celulose e a lignina, são uma das características que definem os basidiomicotas saprófitas, gerando uma vantagem seletiva no ambiente em que vivem. Além desses compostos da parede celular, esses fungos utilizam outros materiais de reserva como proteínas, lipídios e pectina (BALDRIAN, 2008) como fonte de energia.

**Tabela 7.** Atividade enzimática de *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Xylaria* sp. e *Lentinula edodes* e *Stereum ostrea* após cinco dias de incubação a 25°C em meios de cultura específicos para as enzimas lacase, protease, pectinases, celulase e lipase.

Fungos	Atividade enzimática					
	Lacase	Protease	Pec5	Pec7	Celulase	Lipase
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	+	+	+	+	+	-
<i>Lentinus bertieri</i>	+	-	+	+	+	-
<i>Xylaria</i> sp.	+	-	-	-	+	+
<i>Lentinula edodes</i>	+	-	+	+	+	-
<i>Stereum ostrea</i>	+	-	+	+	+	+

Legenda: Pec5, pectinase com pH 5,0; Pec7, pectinase com pH 7,0; reação positiva (+); reação negativa (-). Feito em duplicata.



**Figura 10:** Halos de inibição formados pelos fungos, através da produção de enzimas, em meios de cultura específicos. **A:** produção de lacase por *Lentinus bertieri*. **B:** produção de protease por *Pycnoporus sanguineus*. **C:** produção de pectato liase por *Stereum ostrea*. **D:** produção de pectina polimerase por *Lentinula edodes*. **E:** produção de celulase por *Pycnoporus sanguineus*. **F:** produção de lipase por *Xylaria* sp.

A produção de lacase por um fungo revela uma característica essencial na capacidade de metabolizar a lignina da madeira (BLANCHETTE, 1995; DATTA *et al.*, 1991; FERRAZ, 2010). Ferraz *et al.* (2008) detectaram a produção de lacases por *Ceriporiopsis subvermispora*, quando cultivado em madeira de *E. grandis*, sendo possível relacionar a produção desta enzima ao consumo da lignina, que ficou próximo a 27%.

Os resultados obtidos neste estudo só vêm a confirmar a conhecida capacidade de fungos de podridão branca como *Pycnoporus* spp, (KOKER, *et al.*, 2000); *L. edodes* (LEATHAM e STAHMANN, 1981; ORTH *et al.*, 1993), *Trametes* e *P. sanguineus* (MSWAKA e MAGAN, 1998; SOUZA *et al.*, 2008), *L. bertieri* (OKINO *et al.*, 2000), *Xylaria* sp. (POITING *et al.*, 2003), em produzirem lacases. A diversidade de espécies que produzem enzimas ligninolíticas é muito grande dentro dos ecossistemas existentes no Brasil. Okino *et al.* (2000) coletaram inúmeras espécies nativas da mata atlântica e avaliaram a atividade enzimática de 116 isolados fúngicos. Destes, 96,6% produziram lacases e 92,2% produziram peroxidases e, dentre esses fungos estão *L. bertieri* e *P. sanguineus*. Contudo, apenas um isolado de *P. sanguineus* não apresentou atividade de peroxidases que corresponde a outra classe de enzimas ligninolíticas e que, segundo os autores, é devido à variabilidade genética do mesmo.

Dessa forma, é importante ressaltar que, embora a reação da lacase tenha sido positiva para *L. edodes*, observou-se que o halo formado pelo mesmo ficou visualmente com coloração âmbar mais clara que os halos formados pelos demais fungos. Outros fungos de podridão branca como *Lentinus sajor-caju*, *Schizophyllum commune* e *Stereum* spp. também mostraram baixa atividade de lacase em meio de cultivo contendo o corante Poly-R, o qual é muito utilizado como indicador da produção de ligninases (KOKER, *et al.* 2000).

Em relação ao ascomicota *Xylaria* sp., verificou-se um halo de cor âmbar bem evidente ao redor da colônia em crescimento, evidenciando que o mesmo produz enzimas oxidativas, no caso, a lacase. No entanto, Poiting *et al.* (2003) detectaram baixa atividade de ligninases (lacases entre outras) dentro do gênero *Xylaria*, sendo que somente uma espécie, *X. hypoxylon*, foi capaz de descolorir o meio de cultivo contendo o corante Poly-R. Apesar disso, os autores observaram que os fungos dessa família tiveram ótima atividade de enzimas hidrolíticas, como as celulases, em meio de cultivo.

Por outro lado, Liers *et al.* (2006) detectaram diferenças entre os fungos *X. polymorpha* e *X. hypoxylon*, quanto à produção da lacase. Embora cultivados sob as mesmas

condições, *X. hypoxylon* produziu menor quantidade de lacase em relação à *X. polymorpha*. Os autores também verificaram que esses fungos produziram ativamente outras enzimas como estearases e celulasas, confirmando os resultados obtidos, verificados na Tabela 7, onde *Xylaria* sp. e *S. ostrea* foram os únicos fungos produtores de lipases em meio sólido. A capacidade de metabolizar ésteres e outros ácidos graxos pode estar relacionada à hidrólise de alguns componentes dos extrativos, presentes na madeira, que servirão como fonte de nutrientes.

Verificou-se que *P. sanguineus* foi o único fungo a produzir protease. A proteína e peptídeos são utilizados com fonte de nitrogênio e enxofre pelos fungos. Para metabolizá-los, eles secretam proteases que hidrolisam os peptídeos à aminoácidos, e então a absorção ocorre pela membrana plasmática fúngica. Embora produzida em pouca quantidade, as proteínas são armazenadas nas células parenquimáticas da madeira para posterior utilização como fonte de energia no metabolismo primário das plantas (KOGA, 1981, CASTRO e MACHADO, 2006). Souza *et al.* (2007), estudaram diversos fungos coletados da Amazônia e detectaram o mesmo perfil com *P. sanguineus* e outros fungos de podridão branca, como *Pleurotus* sp. e *Stereum* sp., quando o substrato para protease utilizado foi a gelatina e farelo de soja.

Além de fatores nutricionais, como o tipo de substrato lignocelulolítico, a temperatura e o pH são fatores determinantes na síntese e atividade de diversas enzimas (BALDRIAN, 2008). O ajuste do pH nos meios de cultivo para pectinases evidenciou a presença de duas enzimas: a pectato liase (ou pectinase) e a poligalacturonase, verificadas em pH 7,0 e 5,0, respectivamente. Essas enzimas foram produzidas por *P. sanguineus*, *L. bertieri* e *L. edodes*, com exceção da *Xylaria* sp. As pectinases agem em diferentes regiões da pectina, rompendo as ligações glicosídicas da molécula presentes principalmente na lamela média, que une as células vegetais. Uma das principais características macroscópicas da madeira que sofre o ataque por fungos de podridão branca é a aparência frágil e quebradiça, do sentido das fibras, causada pelo afinamento das paredes celulares, da degradação da lignina e também pela dissolução da lamela média (BLANCHETTE, 1991; LUNA *et al.*, 2004).

Todos os fungos apresentaram atividade celulolítica, facilmente visualizada pela formação do halo de cor laranja após a aplicação do corante. Segundo Baldrian (2008), a atividade de celulasas provavelmente existe em todos os fungos degradadores da madeira, porque a celulose é a substância orgânica mais abundante na natureza. Para degradá-la completamente, é necessário um complexo de enzimas fúngicas, que agem sinergisticamente no

substrato (GRIFFIN, 1993; ÂNGELO, 2010). Embora não seja um substrato natural, a carboximetilcelulose (CMC) é considerada um bom indicador de detecção da produção de endoglucanases (ou carboximetil celulase) em meio de cultivo sólido. Essa enzima age nas regiões amorfas (não ordenadas) da molécula da celulose (BALDRIAN e VALÁSKOVÁ, 2008).

A atividade celulolítica de fungos degradadores da madeira é bem estudada (BLANCHETTE *et al.* 1984, 1991; KOKER *et al.*, 2000) e facilmente detectável através de meios de cultura (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975; OKINO *et al.*, 2000; POITING *et al.*, 2003; SOAREZ, 2007; SOUZA *et al.*, 2008).

## 5.4. EXPERIMENTO 4 – DEGRADAÇÃO DO EUCALIPTO UROGRANDIS E ANÁLISE QUÍMICA

### 5.4.1. Degradação acelerada

Através do ensaio de degradação acelerada verificou-se a capacidade de degradação dos fungos *P. sanguineus*, *L. bertieri*, *Xylaria* sp. e *L. edodes* quanto à perda de massa e consumo dos componentes químicos da madeira. Os conhecimentos adquiridos nos três experimentos, patogenicidade, crescimento micelial e atividade enzimática, contribuirão para as práticas de manejo desses fungos, com vistas à possibilidade do emprego da destoca biológica de tocos de *Eucalyptus* sp. em condições de campo.

Independentemente da umidade, *P. sanguineus* e *L. bertieri* apresentaram rápido crescimento na madeira, assim nos ensaios anteriores. Apesar de *L. edodes* ser conhecido como altamente ligninolítico (GUGLIOTTA e CAPELARI, 1998), o mesmo apresentou crescimento ainda mais lento, porém, essa característica é intrínseca da própria espécie (ANDRADE *et al.*, 2008).

No geral, houve grande variação quanto ao crescimento de *P. sanguineus*, *L. bertieri*, *Xylaria* sp. e *L. edodes* sobre os corpos-de-prova de eucalipto urograndis, nas duas umidades empregadas, de 50 e 100%. Verificou-se que a água foi determinante no tratamento com 50%, a qual culminou em menor crescimento micelial e, conseqüentemente, menor taxa de degradação.

Observou-se que as Testemunhas 50 e 100% de umidade sofreram perdas de massa durante as avaliações mensais, apesar de não terem sido submetidas a nenhum tipo de degradação biológica e/ou química. Com base nisso e nas análises químicas da madeira, sugere-se que essas perdas foram causadas pelo processo da autoclavagem. Nessa condição, os constituintes estruturais da madeira (celulose, hemicelulose e lignina), e os não estruturais (extrativos), podem ter sofrido algum efeito da alta temperatura, nas suas respectivas estruturas moleculares. Assim, durante as análises químicas, essas estruturas sofreram hidrólise mais facilmente. Resultados similares quanto à volatilização de extrativos foram observados por Guilmo *et al.* (1993), onde a esterilização da madeira promoveu decréscimo dos teores de extrativos de *E. saligna*.

Os dados obtidos das perdas de massa pelas Testemunhas (50 e 100), durante o processo de autoclavagem, e da Testemunha 0 (que não foi autoclavada), foram usados para a comparação das médias das perdas reais de massa, aquelas provocadas unicamente pelos fungos na madeira. Deste modo, garantiu-se que as perdas de massa causadas pelos fungos nos corpos-de-prova, foram resultantes exclusivamente do ataque fúngico (PAES *et al.*, 2007).

É importante ressaltar também que há poucos trabalhos na literatura que citam essa correção de dados para a madeira que sofreu algum tipo de esterilização.

#### **5.4.1.1. Perdas de massa a 50% de umidade**

A menor quantidade de água empregada nos tratamentos com 50% prejudicou o crescimento fúngico, constatado pela fraca densidade miceliana sobre a superfície de vários corpos-de-prova até o último período de avaliação, aos 120 dias. Contudo, mesmo nessas condições, alguns corpos-de-prova foram colonizados com micélio vigoroso, fato que contribuiu para as perdas de massa detectadas, principalmente para *P. sanguineus*, *L. bertieri* e *L. edodes*.

Nesses tratamentos, as perdas de massa da madeira de eucalipto urograndis, causadas por *P. sanguineus*, *L. bertieri*, *Xylaria* sp. e *L. edodes*, foram menores que 10%, aos 120 dias (Tabela 8), apresentando resultados discrepantes quando comparado aos tratamentos com 100% de umidade.

Para *P. sanguineus*, *L. bertieri* e *L. edodes*, o tempo influenciou no percentual de degradação, sendo as maiores taxas de perda de massa obtidas aos 120 dias e, embora as condições de umidade não fossem favoráveis, houve aumento da degradação na madeira com o decorrer das avaliações, mostrando que os fungos tiveram alta capacidade de adaptação ao substrato e às condições prevalentes. Aos 120 dias, a diferença percentual da perda de massa entre *L. bertieri* e *P. sanguineus* foi de apenas 5%; entre *L. bertieri* e *Xylaria* sp. foi de 69% e entre *L. bertieri* e *L. edodes* foi de 15%.

*P. sanguineus*, *L. bertieri* e *L. edodes* foram os principais degradadores da madeira de eucalipto urograndis na umidade 50% (Tabela 8). Aos 60 dias, observou-se que a perda de massa da madeira não foi crescente em relação aos 30 dias, para os fungos *P. sanguineus*, *L. bertieri* e *Xylaria* sp. e também para a Testemunha (Tabela 8). É provável que

essa diferença tenha ocorrido em virtude de os corpos-de-prova, escolhidos aleatoriamente para as avaliações, não terem sido colonizados completamente, apresentando micélio até a metade, ou ainda, pequenas porções nos cantos. Isso pode explicar o decréscimo de 15 e 23% na perda de massa dos corpos-de-prova inoculados com *P. sanguineus* e *L. bertieri*, respectivamente.

No entanto, houve recuperação da atividade lignocelulolítica, provocando aumento das perdas de massa da primeira para a última avaliação em 64 e 63%, para *P. sanguineus* e *L. bertieri*, respectivamente. Já as perdas de massa causadas por *P. sanguineus*, *L. bertieri* e *L. edodes*, foram crescentes apenas nas duas últimas avaliações, ficando evidente somente aos 120 dias após a inoculação, na umidade de 50% (Tabela 8).

No presente estudo, a perda de massa causada por *Xylaria* sp. não foi expressiva, nas duas condições de umidades empregadas. Verificou-se que as perdas de massa causadas *Xylaria* sp não foram diferentes nas duas umidades empregadas, aos 120 dias após a inoculação.

**Tabela 8.** Perda de massa (%) de corpos-de-prova de eucalipto urograndis em condições de 50 e 100% de umidade no solo, pela ação de *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Xylaria* sp. e *Lentinula edodes*, após 120 dias de incubação.

Tratamentos	Tempo (dias)							
	30		60		90		120	
	Umidade do solo (%)							
	50	100	50	100	50	100	50	100
<i>P. sanguineus</i>	2,61 Bb	10,38 Ac	2,23 Bb	22,09Ab	3,23 Bb	25,02Ab	8,83 Ba	49,90Aa
<i>L. bertieri</i>	2,92 Bc	8,93 Abc	2,25 Bb	15,07Abc	3,60 Bb	20,77Ab	9,33 Ba	29,11Aa
<i>Xylaria</i> sp.	2,62 Aa	3,00 Aab	1,30Ab	1,96 Ab	1,97 Bb	4,50 Aa	2,93 Aa	3,74 Aa
<i>L. edodes</i>	2,52 b	-	2,90 b	-	3,85 b	-	7,90 a	10,56
Testemunhas	2,38 Aa	2,49 Aa	0,57 Ac	1,00 Ac	1,39 Bb	2,41 Aa	1,44 Bb	1,83 Ab

Letras minúsculas comparam médias na vertical e letras maiúsculas na horizontal. Média de oito repetições.

Isso demonstra que a degradação causada por esse fungo não é totalmente dependente de água, como visto com os demais. Alguns autores afirmam que o gênero *Xylaria* têm maiores chances de sobreviver em locais com baixa disponibilidade de água (BLANCHETTE, 1985; MAGAN, 2008).

Observou-se que alguns corpos-de-prova não ficaram totalmente colonizados em sua superfície, comportamento curioso observado em praticamente todos os corpos-de-prova inoculados com *Xylaria* sp., o qual apresentava um micélio branco com zonas negras. Segundo Klein *et al.* (2004), os fungos mantêm seu micélio apenas se tiverem nutrientes disponíveis para tal e, se não forem capazes de mantê-los, rapidamente são formados esporos sexuais ou assexuais. A madeira colonizada por *Xylaria* sp. apresentou estruturas de reprodução em vários corpos-de-prova, observados durante todo o ensaio. Isso demonstra que a madeira de eucalipto urograndis não é um substrato natural para esse fungo, pelo menos na forma apresentada pelos corpos-de-prova.

Ao retirar o micélio de *Xylaria* sp. da superfície dos corpos-de-prova, observaram-se pequenas manchas escurecidas aderidas à madeira mesmo após a lavagem e escovação dos mesmos. Resultado diferente foi visto por Poiting *et al.* (2003), que relataram zonas brancas na superfície da madeira de *Fagus* sp. (folhosa) quando degradada por *Xylaria* sp.

No presente estudo, zonas esbranquiçadas foram observadas somente na madeira colonizada por *P. sanguineus*, *L. bertieri* e *L. edodes*, nas duas umidades empregadas. Esses fungos formaram uma capa de micélio vigoroso, denso e compacto, o qual mantinha a umidade da madeira em condições ideais. Mesmo colonizando alguns corpos-de-prova até a metade, abaixo desse micélio a madeira geralmente ficava com aparência quebradiça e mais clara.

Segundo Conceição *et al.* (2005), cepas fúngicas que possuem pigmentação escura, ou fungos dematiáceos, produzem melanina, a qual que fica depositada em suas paredes celulares. A melanina, dentre outras funções, está associada à oxidação de compostos fenólicos pelas fenoloxidasas, e a lacase, detectada em meio de cultura neste estudo, é uma fenoloxidase, ligada à degradação da lignina e outros compostos presentes nos extrativos. Porém, mesmo produzindo lacases, a *Xylaria* sp. não causou perda significativa de massa.

Resultados similares, quanto à baixa perda de massa causada por fungos em eucalipto, foram observados por Oliveira *et al.* (2005), que avaliaram a resistência de sete

espécies de eucalipto, dentre elas o *E. urophylla* e o *E. grandis*, com o basidiomicota *Gloeophyllum trabeum*. Sob condições similares ao presente estudo, os autores verificaram perdas de massa inferiores a 10%, para todas as espécies estudadas.

#### 5.4.1.2. Perdas de massa a 100% de umidade

Na umidade 100%, houve rápida colonização fúngica após as inoculações nos alimentadores e nos corpos-de-prova. Neste tratamento, *P. sanguineus*, *L. bertieri* e *L. edodes* colonizaram a madeira e posteriormente o solo, enquanto que *Xylaria* sp. colonizou somente o alimentador.

Grande parte dos alimentadores inoculados com *L. edodes* não foi colonizada, acarretando inúmeras perdas de repetições para as avaliações. Isso pode ter ocorrido em função do excesso de umidade e do tipo da madeira do alimentador, além de outras interferências decorrentes do próprio metabolismo fúngico. Como já detectado nos ensaios de crescimento micelial, este fungo apresentou atividade mais lenta que os demais fungos. Por esse motivo, não foram realizadas as avaliações aos 30, 60 e 90 dias da perda de massa da madeira inoculada com *L. edodes*, na umidade 100%. Assim, a avaliação da perda de massa dos corpos-de-prova deste tratamento ocorreu somente aos 120 dias, realizando-se também as análises químicas da madeira degradada.

Nos tratamentos que tiveram 100% de umidade, o sucesso da colonização e consumo dos componentes da madeira ficou evidente com as perdas de massa significativas já na primeira avaliação (30 dias) com *P. sanguineus* e *L. bertieri* (Tabela 8), sendo similares e até superiores àquelas obtidas aos 120 dias nos tratamentos com 50% de umidade. A quantidade de massa consumida foi crescente até o último período de avaliação, ou seja, o tempo influenciou a degradação.

A perda de massa causada por *Xylaria* sp. não foi crescente entre as avaliações, mas aos 120 dias, a degradação da madeira foi em torno de 22% a mais, em relação ao mesmo período na umidade de 50% (Tabela 8). Com base nesses resultados, é possível afirmar que *Xylaria* sp. tem preferência à locais com maior umidade, contrariando, neste caso, algumas constatações de que fungos deste gênero preferem locais mais secos (BLANCHETTE, 1985).

*Xylaria* sp. é um fungo com pouca capacidade de degradação, principalmente de madeira intacta. Segundo Tanesaka (1993) e Poiting *et al.* (2003), fungos tropicais do gênero *Xylaria* podem ter importante função ecológica como decompositores de restos vegetais como folhas. Com base nessas características, é provável que este gênero também seja importante decompositor do húmus gerado pelos fungos de podridão branca. Apesar disso, segundo os autores, esses fungos podem ser hábeis degradadores em condições secas, uma vez que são conhecidos por suportarem potenciais de água menores.

Embora conhecida a capacidade de *L. edodes* em colonizar a madeira, pouca perda de massa nos corpos-de-prova de eucalipto urograndis foi observada aos 120 dias. Contudo, a perda de massa na madeira na umidade de 100% foi 25% maior do que os valores observados na menor umidade. Além da madeira de eucalipto, Osono e Takeda (2003) observaram que *L. edodes* também demonstrou preferência a materiais lignocelulósicos mais simples, como àqueles a base de folhas, e também a temperaturas amenas (20°C), causando perdas de massa próximas a 58% nessas condições avaliadas.

Como já constatado, a água em maior quantidade contribuiu para melhor crescimento micelial dos fungos sobre os corpos-de-prova, na umidade 100%. As perdas de massa de *P. sanguineus* e *L. bertieri* foram próximas a 49% e 26,2%, respectivamente. Esses fungos foram inquestionavelmente os melhores degradadores avaliados neste ensaio.

Neste estudo, ficou evidente a importância da água na degradação da madeira, sendo assim, é necessário o planejamento da época de inoculação dos fungos no povoamento de eucalipto. Deste modo, é importante considerar as épocas ou estações do ano de maior precipitação, favorecendo assim, a colonização dos fungos no substrato e, conseqüentemente, a degradação dos cepos e raízes.

Luna *et al.* (2004) inocularam *P. sanguineus* em madeira de *Populus deltoides*, e verificaram taxas de perdas de massa de 59% após 150 dias. Os autores também observaram, através de estudos anatômicos, que *P. sanguineus* causou degradação seletiva da lignina. Resultados similares foram obtidos por Alonso *et al.* (2007), que verificaram a degradação de vários fungos coletados de campos de reflorestamento de eucalipto, dentre eles, *P. sanguineus*, *Ganoderma* sp. e *Pestalotiopsis* sp. A degradação de *P. sanguineus* na madeira de *E. saligna* por ficou próximo a 24%, após 90 dias de incubação. Esses autores também pesquisaram os fungos com a possibilidade de uso na destoca microbiológica.

É provável que a madeira de *Eucalyptus* sp. tenha diferentes níveis de resistência às diversas espécies de fungos apodrecedores existentes na natureza. Porém, são mais suscetíveis aos fungos de podridão branca quando comparados aos fungos de podridão marrom, conforme verificado por Oliveira *et al.* (2005). Silva *et al.* (2007) também observaram que a capacidade de degradação de *P. sanguineus* foi diferente conforme a espécie de madeira. Para a madeira de *Tilia vulgaris* (folhosa), este fungo causou 80% de perda de massa, após 70 dias de incubação, enquanto que o mesmo não degradou a madeira de pau-brasil.

Apesar de muito evidente, com vários estudos trabalhos mostrando a capacidade de degradação do *P. sanguineus* a folhosas e até coníferas (POITING *et al.*, 2003), Schmutzer *et al.* (2008) classificaram *P. sanguineus* como sendo “lento” na degradação de *Picea abies*.

#### **5.4.2. Análise química da madeira degradada**

Através das análises químicas da madeira, após 120 dias de incubação, verificou-se que o consumo dos componentes da madeira foi diferente para cada fungo avaliado e dentro de cada umidade empregada. No presente estudo, três fungos classificados como sendo de podridão branca (*P. sanguineus*, *L. bertieri* e *L. edodes*) e um de podridão mole (*Xylaria* sp.) foram utilizados. Foi possível também identificar quais componentes (celulose, hemicelulose e lignina) foram preferencialmente consumidos e, desta forma, descobriu-se algumas de suas características nutricionais. As análises indicaram também que a Testemunha 0 (sem ação de fungos) sofreu pequenas perdas de seus constituintes, e como já mencionado, provavelmente causado pelo processo de autoclavagem.

Os teores da madeira analisados (lignina, celulose e hemicelulose), obtidos dos tratamentos Testemunhas (50 e 100), serviram para comparar (e confirmar) as perdas de massa decorrentes do processo de esterilização dos corpos-de-prova (autoclavagem), devido à volatilização e/ou perdas, de alguns compostos presentes na madeira, como os extrativos e açúcares solúveis.

Além desses dados, analisaram-se também os teores da madeira da Testemunha 0 (que não sofreu processos químicos ou físicos de esterilização), que serviram para verificar os reais teores dos componentes presentes na madeira de eucalipto urograndis. Desta

forma, os teores totais dos constituintes da madeira intacta (Testemunha 0) foram usados para se obter os valores reais dos constituintes da madeira, que restaram após a degradação. Os aqui dados discutidos foram então obtidos da subtração dos teores dos tratamentos Testemunhas correspondentes, 50 e 100.

### **Teor de celulose total**

A Tabela 9 ilustra a degradação da celulose nos tratamentos com 50% e 100% de umidade, em relação à madeira não autoclavada (Testemunha 0) e às testemunhas autoclavadas (Testemunhas 50 e 100).

Verificou-se que, na umidade 50%, o consumo de celulose foi semelhante na madeira degradada por *P. sanguineus* (8,9%) e *L. bertieri* (8,1%). As baixas perdas de massa causadas por *Xylaria* sp. (2,6%) e *L. edodes* (3,7%), foram também refletidas nos baixos consumos de celulose, sendo inferiores ao *P. sanguineus* em 70,6 e 58,8%, respectivamente.

Nos tratamentos com 100% de umidade, *P. sanguineus* e *L. bertieri* tiveram alta capacidade celulolítica, com perdas de 46,5% e 30,7%, respectivamente. *L. edodes* consumiu apenas 5% de celulose e *Xylaria* sp. consumiu apenas 5,3% de celulose, porém foi 30,7% a mais, comparado ao tratamento com 50% de umidade. Os teores totais de celulose obtidos do tratamento Testemunha 50, foi de 0,26%, enquanto que na Testemunha 100, observou-se acréscimo em 1% do peso, quando comparado ao teor obtido da Testemunha 0 (38,1%).

### **Teor de hemicelulose total**

Nos tratamentos com 50% de umidade, os maiores consumidores de hemicelulose foram *L. edodes* (8%), *L. bertieri* (6,3%) e *P. sanguineus* (4,1%). Os teores de hemicelulose perdidos da madeira da Testemunha 50 foi de 7,7%, e da Testemunha 100 foi de 10,2% (Tabela 9).

As análises químicas da madeira degradada por *Xylaria* sp. acusaram aumento dos teores de hemicelulose, tanto a 50% de umidade (acrécimo de 1,4%) quanto a 100% (acrécimo de 3,9%), quando comparado às testemunhas correspondentes, e tomando como base a testemunha 0. Na umidade 100%, *P. sanguineus* e *L. bertieri* consumiram 40,2 e 23,1% da hemicelulose, respectivamente. Nesse caso, a umidade influenciou perdas significativas

superiores a 80 e 72,7%, em relação aos tratamentos com 50% de umidade. *L. edodes* aumentou o consumo de hemicelulose em 44,4%, em relação à umidade 50%. Assim, sugere-se que o crescimento e metabolismo de *L. edodes* sofreram influência não somente pela presença da água, mas também pelo tipo de substrato utilizado, dentre outros fatores.

### Teor de lignina total

Em relação à madeira não degradada, a ordem decrescente de consumo da lignina, nos tratamentos com 50% de umidade, foi composta por *P. sanguineus* (6,4%), *L. edodes* (4,7%), *L. bertieri* (3,8). Assim como observado nos teores de hemicelulose, a madeira que sofreu ataque da *Xylaria* sp. teve acréscimo em 2,57%, em relação à Testemunha 0.

**Tabela 9:** Média dos teores totais (%) dos componentes químicos da madeira degradada de eucalipto urograndis, por *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Xylaria* sp. e *Lentinula edodes*, e das Testemunhas, submetidas às umidades de 50 e 100%, após 120 dias de degradação.

Tratamentos	Extrativos	Lignina	Celulose	Hemicelulose
<i>Pycnoporus sanguineus</i> 50 <sup>a</sup>	5,4 <sup>c</sup>	21,1	34,6	32,0
<i>Pycnoporus sanguineus</i> 100 <sup>b</sup>	4,2	12,2	20,0	18,0
<i>Lentinus bertieri</i> 50	6,3	21,7	34,9	31,2
<i>Lentinus bertieri</i> 100	5,8	16,4	26,0	24,2
<i>Xylaria</i> sp. 50	5,2	23,9	37,0	34,0
<i>Xylaria</i> sp. 100	4,8	22,8	35,7	32,8
<i>Lentinula edodes</i> 50	6,5	21,5	36,6	30,6
<i>Lentinula edodes</i> 100	6,4	20,7	35,8	29,9
<b>Testemunha 0</b>	<b>4,8</b>	<b>23,3</b>	<b>38,1</b>	<b>36,3</b>
Testemunha 50	5,2	22,6	38,0	33,5
Testemunha 100	4,8	23,7	38,5	32,6

Legendas: a, b = Umidades de 50 e 100 %, respectivamente. c = média da o em duplicata.

Nestas análises, observou-se também perda do teor da lignina pela Testemunha 50, em 3%. Já na Testemunha 100, observou-se acréscimo no teor de lignina total em 1,7%, quando comparado à Testemunha 0 (Tabela 9). Assim, na umidade 100%, para a comparação do teor de lignina total, utilizou-se o valor obtido pelas análises da Testemunha 0.

Na umidade 100%, a ordem decrescente de consumo da lignina foi composta por *P. sanguineus* (47,6%), *L. bertieri* (29,6%), *L. edodes* (11,1%) e *Xylaria* sp. (2,1%). O aumento das taxas de degradação entre os tratamentos 50 e 100% de umidade foram de 86,4% para *P. sanguineus*, 87,2% para *L. bertieri* e de 30,8% para *L. edodes*. Neste estudo, com base nos resultados obtidos dos teores totais de celulose, hemicelulose e lignina, dos tratamentos a 100% de umidade, considera-se *P. sanguineus* e *L. bertieri* como sendo fungos de degradação simultânea da madeira, ou seja, organismos capazes de degradar tais componentes em praticamente na mesma velocidade.

Através dos estudos sobre a capacidade ligninolítica do *P. sanguineus* e *L. bertieri*, é possível considerar a aplicação destes na destoca biológica, já que a lignina é o composto natural mais difícil de ser degradado na natureza. Já o *L. edodes* não mostrou boa capacidade ligninolítica nas condições avaliadas, apesar de ser conhecidamente bom degradador da madeira (ANDRADE, 2007; GUGLUIOTTA e CAPELARI, 1998). A *Xylaria* sp. mostrou-se pouco ligninolítica, tendo maior preferência pela hemicelulose (Tabela 9).

### **Teor de extrativos totais**

Observou-se que o único fungo a diminuir o teor de extrativos totais foi o *P. sanguineus*, na umidade 100%. Os demais, inclusive a Testemunha 50, apresentaram acréscimos nos teores de extrativos, devido ao metabolismo dos compostos solúveis em álcool e tolueno ((Tabela 9). Os fungos *L. bertieri* e *L. edodes* causaram, durante o processo de degradação nos tratamentos a 50% de umidade, aumento nos teores de extrativos em 32,1 e 35,4%, isso ocorreu provavelmente pelo metabolismo parcial de compostos solúveis.

No tratamento com 100% de umidade, *P. sanguineus* consumiu maior quantidade de massa da madeira, revelando também o metabolismo de compostos solúveis, como os extrativos. Deste modo, a quantidade de extrativos retirada da madeira foi menor, provavelmente devido à decomposição de vários polissacarídeos presentes no parênquima, na

lamela média e também de compostos fenólicos, presentes nos extrativos, não havendo, portanto, compostos solúveis que fossem retirados pelo álcool e tolueno, e também pela água quente.

O fato do aumento dos teores de extrativos totais dentro dos tratamentos pode ser devido à presença de açúcares e outros compostos, que foram parcialmente degradados e/ou modificados, mas ainda se encontravam nas paredes celulares da madeira. Dessa forma, e como consequência, maior quantidade de compostos solúveis em álcool/tolueno e água quente foram extraído, como também observado por Andrade (2007).

Extrativos totais podem ser extraídos da madeira de várias formas. Em água fria, geralmente são extraídas gomas, taninos, açúcares e corantes. Em água quente, os mesmos compostos, mais o amido são extraídos e outros compostos como ceras, gorduras, resinas, óleos são extraídos com álcool e tolueno (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Segundo Silverio *et al.* (2007), extrativos lipolíticos como ácidos graxos (ácido palmítico, linoléico) e esteróis (sitosterol) foram encontrados em quantidades similares na madeira de clones eucalipto urograndis. Sendo assim, a capacidade de metabolizar esses compostos está relacionada à secreção de enzimas específicas, como a lipase, produzida em meio de cultura por *P. sanguineus*, conforme já observado. No entanto, para saber algum fungo realmente consome compostos lipídicos, Gutiérrez *et al.* (1999), sugere que outras análises específicas de compostos extraíveis em solventes orgânicos devem ser feitas, e não simplesmente subestimar a diminuição da quantidade de extrativos totais. Alguns compostos, como ésteres e esteróis podem ser consumidos por fungos como *Phanerochaete chrysosporium*, porém, ao consumi-los, o fungo aumentou também a quantidade de triglicerídeos no meio, provavelmente, derivado do seu próprio metabolismo.

Alguns fungos, mesmo secretando enzimas oxidativas não degradam eficientemente a lignina. *Lentinus lepideus* não causou perdas de massa e de lignina durante 80 dias após a inoculação em alburno de *Fagus* sp. Já o *Pycnoporus coccineus*, consumiu 38,6% do peso total da madeira e 44% de lignina, resultados similares ao encontrado com *P. sanguineus* no presente estudo. Isso demonstra uma versatilidade ecológica e de consumo dos nutrientes dentro do gênero *Pycnoporus* e que, segundo Blanchette (2000), o consumo metabólico da lignina é único entre os basidiomicotas. Ademais, as espécies de fungos de podridão branca formam um grupo heterogêneo que podem degradar quantidades variáveis de um componente específico da parede celular.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

- ❖ *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinus bertieri*, *Xylaria* sp., *Lentinula edodes*, *Stereum ostrea* e o isolado Dut-1 não foram patogênicos às plantas de eucalipto urograndis.
- ❖ O crescimento micelial de *Xylaria* sp. *S. ostrea* e *L. edodes* foi influenciado pela temperatura; *P. sanguineus* e *L. bertieri* têm capacidade de crescimento em faixas de temperatura que variam de 23 a 31°C, com maior tendência de crescimento em temperatura mais elevadas.
- ❖ A presença de água no solo influenciou a redução da massa da madeira de eucalipto urograndis, sendo que a taxa de degradação no tratamento a 50% de umidade foi menor que 10% para todos os fungos avaliados; a taxa de perda de massa da madeira no tratamento a 100% de umidade foi de até 48,9 %.
- ❖ De acordo com as análises químicas e de degradação, *P. sanguineus* e *L. bertieri* foram classificados como fungos degradadores da madeira simultâneos, demonstrando potencial para serem usados na destoca biológica do eucalipto.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF. **Anuário Estatístico 2009**. Disponível em: <<http://www.abraflor.org.br>>. Acesso em: 12 abr. 2011.

ABREU, L. D. *et al.* Degradação da madeira em *Eucalyptus* sp. por basidiomicetos de podridão branca. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 4, p. 321-328, 2007.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**. Madrid, v. 6, n. 3, p. 191-199, 2003.

ASGHER, M.; BHATTI, H.N.; ASHRAF, M.; LEGGE, R.L. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, London, v. 19, p. 771-783, 2008.

AHO, P. E. *et al.* Distribution, enumeration, and identification of nitrogen-fixing bacteria associated with decay in living fir trees. **Phytopathology**, St. Paul, v. 64, p. 1413-1420, 1974.

ANDRADE, M.C.N. **Crescimento micelial, produção e características bromatológicas do shiitake em função de linhagens e de propriedades físicas e químicas de clones de eucalipto.** 2007. 195 f. Tese (Doutorado em Agronomia / Energia na Agricultura) –Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

ANDRADE, M.C.N *et al.* Mycelial growth of two *Lentinula edodes* strains in culture media prepared with sawdust extracts from seven eucalyptus species and three eucalyptus clones. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, n. 3, p. 333-337, 2008.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology.** 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996, 869 p.

ALONSO, S. K. *et al.* Isolamento e seleção de fungos causadores de podridão branca da madeira em florestas de *Eucalyptus* sp. com potencial de degradação de cepas e raízes. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 145-155, 2007.

ANAGNOST, S. E. Light microscopic diagnosis of wood decay. **IAWA Journal**, Leiden, v. 19, n. 2, p. 141-167, 1998.

ÂNGELO, R. S. Enzimas hidrolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Orgs.) **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul: Educus, 2010. p. 263-285.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM D-1413. Standard test method for wood preservatives by laboratory soil-block cultures. **Annual Book of ASTM Standard**, v.0410, p.119-121, 1994.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM D-2017. Standard method of accelerated laboratory test of natural decay resistance of wood. **Annual Book of ASTM Standard**, v.0410, p.324-328, 1994.

BADER, P.; JANSSON, S.; JONSSON, B. G. Wood-inhabiting fungi and substratum decline in selectively logged boreal spruce forests. **Biological Conservation**, Essex, v. 72, p. 355-362, 1995.

BALDRIAN, P. Enzymes of saprotrophic basidiomycetes. In: BODDY, L.; FRANKLAND, J.; WEST, P. V. 2. ed. **Ecology of saprotrophic basidiomycetes.** London: Academic Press, 2008<sup>a</sup>. p. 19-41.

BALDRIAN, P.; VALÁSKOVÁ, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 32, p. 501–521, 2008<sup>b</sup>.

BARRETO, P. A. B. *et al.* Atividade microbiana, carbono e nitrogênio da biomassa microbiana de plantações de eucalipto em sequência de idades. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 611-619, 2008.

BARRY, K.M.; PEARCE, R.B.; MOHAMED, C.M. Properties of reaction zones associated with decay from pruning wounds in plantation-growth *Eucalyptus nitens*. **Forest Pathology**, Berlin, n. 30, p. 233-245, 2000.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L. Efeito de sistemas de preparo e de cultura na dinâmica da matéria orgânica e na mitigação das emissões de CO<sub>2</sub>. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, p. 599-607, 2000.

BENDING, G. D.; FRILOUX, M.; WALKER, A. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 212, p. 59-63, 2002.

BLANCHETTE, R. A. Screening wood decayed by white rot fungi for preferential ligninolytic degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, St Paul, v. 48, n. 3, p. 647-653, 1984.

BLANCHETTE, R. A. Delignification by wood-decay fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 29, p. 381-398, 1991.

BLANCHETTE, R. A. Degradation of lignocellulose complex in wood. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, n. 1, p. 999-1010, 1995.

BLANCHETTE, R. A. A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 46, p. 189-204, 2000.

BLANCHETTE, R. A.; SHAW, G. Associations among bacteria, yeasts, and basidiomycetes during wood decay. **Ecology and Epidemiology**, St. Paul, v. 68, p. 631-637, 1978.

BRASIL <sup>a</sup>. Ministério do Meio Ambiente. **A biodiversidade brasileira**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=72&idMenu=2338>> . Acesso em: 12 abr. 2011.

BRASIL <sup>b</sup>. Ministério do Meio Ambiente. **A degradação da madeira e sua preservação**. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/223/arquivos/adegradacaodamadeira\\_v3sp\\_223.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/223/arquivos/adegradacaodamadeira_v3sp_223.pdf)> Acesso em: 12 abr. 2011.

BURDSALL JUNIOR, H.; DORWORTH, E. B. Preserving cultures of wood-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. **Mycologia**, New York, v. 86, n. 2, p 275-280, 1994.

BRAZOLIN, S.; TOMAZELLO FILHO, M. Alterações na estrutura anatômica de madeira de *Tabebuia* sp. (Ipê) de torre de resfriamento de água, por fungos de podridão mole. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n. 55, p. 97-105, 1999.

CALONEGO, F.W. Efeito da termorreificação nas propriedades físicas, mecânicas e na resistência a fungos deterioradores da madeira de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. 2009. 149 f. Tese (Doutorado em Agronomia / Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**. 2. ed. London: Academic Press, 2001. 588 p.

CARVALHO, W. *et al.* Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CASTELLANI, A. (1964). The “water cultivation” of pathogenic fungi. **Annales de la Societe Belge de Medicine Tropicale**, 44:217-220.

CASTRO, M.M.; MACHADO, S.R. Células e tecidos secretores. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. 2 ed. **Anatomia vegetal**. Editora UFV: Viçosa, 2006, p. 179-203.

CASTRO SILVA, J. *et al.* Influência da idade e da posição ao longo do tronco na composição química da madeira de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 455-460, 2005.

CHEN, H. *et al.* Effects of temperature and moisture on carbon respired from decomposing wood roots. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 138, n. 1/3, p. 51-64, 2000.

CHEN, S.F., *et al.* Characterization of Botryosphaeriaceae from plantation-grown *Eucalyptus* species in South China. **Plant Pathology**, Londres, v. 60, p. 1-13, 2011.

CLAUSE, C. A.; KENEALY, W.; LEBOW, P. K. Oxalate analysis methodology for decayed wood. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 62, p. 372-375, 2008.

CONCEIÇÃO, D. M. *et al.* Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 99-106, jan./mar. 2005.

CORRADI da SILVA, M. L. *et al.* Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.

COSTA, A. C. F. Ocorrência de fungos macroscópicos em povoamentos de eucalipto. **Acta Florestalis**, Aracaju, v. 1, n.1, ago. 2009.

CURLING, S. F.; CLAUSEN, C. A.; WINANDY, J. E. Experimental method quantify progressive stages of decay of wood by basidiomycete fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 49, p. 13-19, 2002.

DAMIAN, P.D.; BODDY, L. Development of mycelial systems of *Stropharia caerulea* and *Phanerochaete chrysosporium* on soil: effect of temperature and water potential. **Mycological Research**, London, n. 101, p.705-713, 1997.

DATTA, A.; BETTERMANN, A.; KIRK, T. K. Identification of a specific manganese peroxidase among lignolytic enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 57, n. 5, p. 1453-1460, 1991.

DAVIS, J. R.; SELLO, J. K. Regulation of genes in *Streptomyces* bacteria required for catabolism of lignin-derived aromatic compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Moscow, v. 86, n. 3, p. 921-929, 2010.

DEDECEK, R. A.; BELLOTE, A. F. J.; MENEGOL, O. Influence of residue management and soil tillage on second rotation *Eucalyptus* growth. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n. 74, p. 09-17, 2007.

DEFIORIO, G. *et al.* The influence of wound location on decay extent in plantation-grown *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 242, p. 353-362, 2007.

DIAS, D.M. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 545-552, 2005.

DONINI, L.P.; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J.S. Desenvolvimento in vitro de *Agaricus brasiliensis* em meios suplementados com diferentes farelos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.6, p.995-999, 2006.

DURÁN, N. Enzimas ligninolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Orgs.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2010. p. 245-260.

EJECHI, B. O. Biological of wood decay in an open tropical environmental with *Penicillium* sp. and *Trichoderma viride*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v. 39, n. 4, p. 295-299, 1997.

EJECHI, B. O. Microbial deterioration of partially submerged service timbers in a tropical intertidal zone. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 51, p. 115-118, 2003.

ELDRIDGE, K. *et al.* Eucalypt domestication and breeding. Oxford: New York: Oxford University Press, 1994, 312 p.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. 2. ed. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Orgs.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2010.

FERRAZ, A.; CÓRDOVA, A. M.; MACHUCA, A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 32, p. 59-65, 2003.

FERREIRA, F.A. Patologia florestal: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: UFV, SIF, 1989, 570 p.

FARIA, G. E. *et al.* Carbono orgânico total e frações da matéria orgânica em diferentes distâncias do tronco de eucalipto. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, v. 36, n. 80, p. 265-277, 2008.

FERREIRA, C. A. *et al.* Deposição de material orgânico e nutrientes em plantios de *Eucalyptus grandis* em diferentes regimes de adubação. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 43, p. 75-86, jul./dez. 2011.

FERNANDES, L. *et al.* *In vitro* wood decay of *Eucalyptus grandis* by the basidiomycete fungus *Phellinus flavomarginatus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 55, p. 187-193, 2005.

FRANSSON, A. M.; VALEUR, I.; WALLANDER, H. The wood-decaying fungus *Hygrophoropsis aurantiaca* increases P availability in acid forest humus soil, while N addition hampers this effect. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1699-1705, 2004.

GAMAUF, C.; METZ, B.; SEIBOTH, B. Degradation of plant cell wall polymers by fungi. In: ESSER, K. (Ed.). **The Mycota IV: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research**. 2. ed. Berlin: Springer, p. 323-340. 2007.

GELBRICH, J.; CARSTEN, M.; MILITZ, H. Chemical changes in wood degraded by bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 61, p. 24-32, 2008.

GLAESER, J. A.; LINDNER, D. L. Use of fungal biosystematics and molecular genetics in detection and identification of wood-decay fungi for improved forest management. **Forest Pathology**, Berlin, 2010.

GOMES-DA-COSTA, S.M.; COIMBRA, L.B.; SILVA, E.S. Crescimento micelial de dois isolados de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, em resíduos ligninocelulósicos. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 192-196, 2008.

GONÇALVES, J.L.M. Recomendações de Adubação para *Eucalyptus*, *Pinus* e Espécies Típicas da Mata Atlântica. IPEF, Documentos Florestais, Piracicaba, v. 15, p. 1-23, 1995.

GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. 2 ed. WILEY-LISS: New York, 1993, 458 p.

GRIFFIN, D. M. Water potential and wood-decay fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.15, p. 319-329, 1977.

GUGLIOTTA, A. M.; CAPELARI, M. Taxonomia de basidiomicetos. In: BONONI, V. L. R. **Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, 1998. p 68-102.

GUILMO, S.M.P.; AUER, C.G.; BARRICHELLO, L.E.G. Efeito de fungos termófilos sobre a madeira de *Eucalyptus saligna* Sm. II. *Aspergillus* sp., *Dactylomyces thermophilus* Sopp., *Penicillium bacillisporum* Swift, *Rhizomucor* sp. E *Sporotrichum* sp.

GUTIÉRREZ, A. Fungal degradation of lipophilic extractives in *Eucalyptus globulus* wood. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n. 4, p. 1367-1371, 1999.

GUTIÉRREZ, A. et al. Hyphal-sheath polysaccharides in fungal deterioration. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 167, p. 315-325, 1995.

HAMMEL, K. E.; KAPICH, A. N.; JENSEN, K. A.; RYAN, Z. C. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 30, p. 445-453, 2002.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, p. 597-605, 1975.

HIGA, R. C. V.; MORA, A. L.; HIGA, A. R. **Plantio de eucalipto na pequena propriedade rural**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000, 31 p. (Embrapa Florestas Documentos, 54).

HOADLEY, R. B. **Understanding wood: a craftman's guide to wood technology**. Newton: Tauton, 2000. 280 p.

HOPE, G. D. Changes in soil properties, tree growth, and nutrition over a period of 10 years after stump removal and scarification on moderately coarse soils in interior British Columbia. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 242, p. 625-635, 2007.

IEA. **Análises de indicadores do agronegócio**, São Paulo, v. 6, n. 2, 2011. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/arquivoAN.php?codTipo=2>>. Acesso em: 12 abr. 2011.

ISTEK, A. *et al.* Biodegradation of *Abies bormülleriana* (Mattf.) and *Fagus orientalis* (L.) by the rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 55, p. 63-67, 2005.

KACHLISHVILI, E. *et al.* Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, n. 4, p. 391-397, 2005.

KAYE, T. N.; SMITH, M. B.; THIES, W. G. Long-term effects of post-harvest stump removal and N-fertilization on understory vegetation in Western USA forests. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 256, p. 732-740, 2008.

KAWASE, K. Chemical components of wood decayed under natural conditions and their properties. **Journal of the Faculty of Agriculture**, Hokkaido Daigaku Sapporo, v. 52, p. 186-245, 1962.

KILE, G.A. Wood root rots of eucalypts. In: KEANE, P.J.; KILE, G.A.; PODGER, F.D.; BROWN, B.N. **Diseases and pathogens of eucalypts**. CSIRO: Queensland, 2000, p. 293-306.

KLEIN, D. A.; PASCHKE, M. W. Filamentous fungi: the indeterminate lifestyle and microbial ecology. **Microbial Ecology**, New York, v. 47, p. 224-235, 2004.

KLUCZEK-TURPEINEN, B. *et al.* Degradation and enzymatic activities of three *Paecilomyces inflatus* strains grown on diverse lignocellulosic substrates. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 59, p. 283-291, 2007.

KOGA, M.E.T. Matérias-primas fibrosas. In: PHILIPP, P.; D'ALMEIDA, M.L.O. (Orgs.) 2. ed. **Celulose e papel**, São Paulo: IPT, 1981. v. 1, p. 665-696.

KOKER, T. H. *et al.* Isolation and enzymatic characterization of South African white-rot fungi. **Mycological Research**, London, v. 104, n. 7, p. 820-824, 2000.

KUAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involves in the degradation of plant fiber cell walls. In: SCHEPER, T. (Ed.) **Advances in biochemical engineering biotechnology**, New York, v. 57, p. 45-125, 1997.

KÜES, U.; LIU, Y. Fruiting body production in basidiomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 54, p. 141-152, 2000.

LEATAHM, G.F.; STAHMANN, M.A. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. **Journal of General Microbiology**, London, v. 125, p. 147-157, 1981.

LEITE, B.; STANGARLIN, J.R. Fisiologia e bioquímica de doenças fúngicas. In: PASCHOLATI, S.F. et al. (Eds). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008, p. 115-150.

LEWIS, N. G; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 455-496, 1990.

LUNA, M. L. et al. Patterns of decay caused by *Pycnoporus sanguineus* e *Ganoderma lucidum* (Aphyllophorales) in popular wood. **IAWA Journal**, Leiden, v. 25, n. 4, p. 425-433, 2004.

LIERS, C. et al. Mineralization of  $^{14}\text{C}$ -labeled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. **Applied Microbial and Cell Physiology**, New York, v. 69, p. 573-579, 2006.

LINDBLAD, I. Wood-inhabiting fungi on fallen logs of Norway spruce: relations to Forest management and substrate quality. **Nordic Journal of Botany**, Malden, v. 18, n. 2, p. 243-255, 1998.

LOCONTE, C. O.; GARCIA, J. N.; LIMA, I. L. A problemática dos tocos na atividade florestal em pequenas propriedades rurais. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 18., 2010, São Paulo. **Anais...** São Paulo: USP, nov. 2010. 1 CD-ROM.

LONERGAN, G. T.; JONES, C. L.; MAINWARING, D. E. The effect of temperature and culture medium on the degradative activity of *Phanerochaete chrysosporium* evaluated using three qualitative screening methods. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 31, p. 107-114, 1993.

MACHUCA, A.; FERRAZ, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 29, n. 6/7, p. 386-391, 2001.

MAGAN, N. Ecophysiology: impact of environmental in growth, synthesis of compatible solutes and enzyme production. In: BODDY, L.; FRANKLAND, J.; WEST, P. V. **Ecology of saprotrophic basidiomycetes**. 2. ed. London: Academic Press, 2008. p. 63-78.

MARTÍNEZ, A.T. *et al.* Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, Barcelona, v. 8, p. 195-204, 2005.

MATHEUS, D. R.; OKINO, L. O. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: BONONI, V. L. R. **Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, 1998, p. 106-139.

MENT, D. The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisopliae* chlamydospores in tick eggs. **Fungal Biology**, Manchester, 114, p. 49-56, 201.

MENDHAM, D. S. *et al.* Residue management affects on soil carbon and nutrient contents and growth of second rotation eucalypts. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 181, p. 357-372, 2003.

MOHEBBY, B. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of white-rot decayed beech Wood. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 55, p. 247-251, 2005.

MONEY, N. P. On the origin and functions of hyphal walls and turgor pressure. **Mycological Research**, London, v. 103, p. 1360, 1999.

MONTEIRO, M. B. B; FREITAS, A. R. Método de ensaio acelerado para avaliação da durabilidade natural de madeiras. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 21, n. 4, p. 555-561, 1997.

MSWAKA, A.Y.; MAGAN, N. Wood degradation, and cellulase and ligninase production, by *Trametes* and other wood-inhabiting basidiomycetes from indigenous forests of Zimbabwe. **Mycological Research**, London, v. 102, n. 11, p. 1399-1404, 1998.

MUELLER, G.; BILLS, G. B.; FOSTER, M. S. **Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods**. Oxford: Elsevier. 2004. 777 p.

NASCIMENTO, H. J.; SILVA JUNIOR, E. J. H. Purification of lignin peroxidase isoforms from *Streptomyces viridosporus* T7A by hydrophobic based chromatographies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, n. 9, p. 1973-1975, 2008.

NELSON, E. E.; PEARCE, M. H.; MALAJCZUK, N. Effects of *Trichoderma* spp. and ammonium sulphamate on establishment of *Armillaria luteobubalina* on stumps of *Eucalyptus diversicolor*. **Mycological Research**, London, v. 99, n. 8, p. 957-962, 1995.

NIEMENMAA, O.; GALKIN, S.; HATAKKA, A. Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycetes fungi grown in liquid and solid culture conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 62, p. 125-134, 2008.

NILSSON, T; DANIEL, G. Chemistry and microscopy of wood decay by some higher ascomycetes. **Holzforschung**, Berlin, v. 43, n. 1, p. 11-18, 1989.

O'CONNELL, A. M. Microbial decomposition (respiration) of litter in Eucalyptus forests of south-western Australia: an empirical model based on laboratory incubations. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 22, p. 153-160, 1990.

OLIVEIRA, J. T.; TOMASELLO, M.; CASTRO SILVA, J. Resistência natural da madeira de sete espécies de eucalipto ao apodrecimento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 993-998, 2005a.

OLIVEIRA, J. T. *et al.* Influência dos extrativos na resistência ao apodrecimento de seis espécies de madeira. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 819-826, 2005b.

OLIVEIRA JÚNIOR, E. D.; SEIXAS, F. Análise energética de dois sistemas mecanizados a colheita do eucalipto. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n. 70, p. 49-57, 2006.

ORTH, A., B.; ROYSE, D. J.; TIEN, M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-decaying fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 59, n. 12, p. 4017-4023, 1993.

OSONO, T.; TAKEDA, H. Comparasion of litter decomposing ability among diverse fungi in a cool temperate deciduous forest in Japan. **Mycologia**, New York, v. 94, n.3, p. 421-427, 2003.

OTJEN, L.; BLANCHETTE, R. A. Selective delignification on aspen wood blocks in vitro by three white rot basidiomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, St Paul, v. 50, n. 3, p. 568-572, 1985.

PAES, J. B. Resistência natural da madeira de *Corymbia maculata* (Hook.) K. D.Hill & L. A. S. Johnson a fungos e cupins xilófagos, em condições de laboratório. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 6, p. 761-767, 2002.

PAES, J. B. Eficiência do tratamento preservativo na resistência da madeira de leucena (*Leucaena leucocephala* [Lam.] de Wit.) a organismos xilófagos. **Revista Florestal Venezuelana**, Mérida, v. 52, n. 1, p. 82-91, 2008.

PAES, J. B.; MELO, R. R.; LIMA, C. R. Resistência natural de sete madeiras a fungos e cupins xilófagos em condições de laboratório. **Cerne**, Lavras, v. 13, n. 2, p. 160-169, 2007.

PEARCE, R. B. Decay development and its restriction in trees. **Journal of Arboriculture**, Champaign, v. 26, n. 1, p. 1-11, 2000.

PEARCE, M.H.; NELSON, E.E.; MALAJCZUK, N. Effects of the cord-forming saprotrophs *Hypholoma australe* and *Phanerochaete filamentosa* and ammonium sulphamate on establishment of *Armillaria luteobubalina* on stumps of *Eucalyptus diversicolor*. **Mycological Research**, London, v. 99, n. 8, p. 951-956, 1995.

PÉRES, J. DORADO, M.; RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, Barcelona, v. 5, p. 53-63, 2002.

PEREIRA, R. P. W.; MONTEIRO, M. B. O.; ABREU, H. S. Os fitohormônios na formação da madeira. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 11, n. 2, p. 40-47, 2004.

PETERSSON, I.; MELIN, Y. Estimating the biomass and carbon pool of stump systems at a national scale. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 260, p. 466-471, 2010.

PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Macromolecular changes of humic substances induced by interactions with organics acids. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 319-328, 1996.

PLOU, F.J. *et al.* Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 3, p. 183-186, 1998.

POITING, S. B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 2, p. 17-33, 1999.

POITING, S. B.; PARUNGAO, M. M.; HYDE, K. D. Production of wood-decay enzymes, mass loss and lignin solubilization in wood by tropical *Xylariaceae*. **Mycological Research**, London, v. 107, n. 2, p. 231-235, 2003.

QUILHÓ, T.; MIRANDA, I., PEREIRA, H. Within-tree variation in wood fiber biometry and basic density of the urograndis eucalypti hybrid (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*). **IAWA Journal**, Leiden, v. 27, n. 3, p. 243-254, 2006.

RABINOVICH, M.L.; BOLOBOVA, A.V.; VASIL'CHENKO, L.G. Fungal decomposition of natural structures and xenobiotics: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow, v. 40, 1, p. 1-17, 2004.

RAEDER, U.; THOMPSON, W.; BRODA, P. Genetic factors influencing ligninolytic peroxidase activity on *P. chrysosporium* ME446: ligninolytic peroxidase genes occur in clusters. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 3, n. 7, p. 919-924, 1989.

RAY, F. E.; EICHHORN, S. E. **Esau's plant anatomy**: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function and development. 3. ed. Oxford: John Wiley & Sons, 2006. 624 p.

RAYNER, A. D. M. Fungal colonization of hardwood stumps from natural sources. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 69, n. 2, p. 291-302, 1977.

RAYNER, A. D. M.; BODDY, L. **Fungal decomposition**: its biology and ecology. Chippenham: John Wiley & Sons, 1988. 587 p.

ROSSI, I.H.; MONTEIRO, A.C.; MACHADO, J.O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato.

**Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 887-891, 2001.

ROUX, J.; VAN WYK, M.; HATTING, H.; WINGFIELD, M.J. Ceratocystis species infecting stem wounds on *Eucalyptus grandis* in South Africa. **Plant Pathology**, Londres, v. 53, p. 414-421, 2004.

SANTOS, C.R. **Métodos não-convencionais para a determinação de celulose como parâmetro de seleção de árvores matrizes visando a produção de polpa Kraft-AQ**. 2000. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Madeiras) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade De São Paulo, Piracicaba, 2000.

SHELLEY, A.W.; DEETH, H.C.; Mac ERA, I.C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. **Journal of Microbiological Methods**, v. 6, p. 123-127, 1987.

SHIGO, A.L.; HILLIS, W.E. Heartwood, discolored wood, and microorganisms in living trees. **Annual Review of Plant Pathology**, Palo Alto, v. 11, p. 197-222, 1973.

SHMUTZER, M. *et al.* Comparasion of methods to evaluate the potential of fungal growth on decay of spruce wood after short-time treatment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 61, p. 319-324, 2008.

SILVA, C. A. *et al.* Biodeterioration of brazilwood *Caesapinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesapinioideae) by rot fungi and termites. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 60, p. 285-292, 2007.

SILVA, G. A. *et al.* Avaliação do potencial de degradação de fungos causadores de podridão branca. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 2, p. 225-231, 2010.

SILVÉRIO, F.O. *et al.* Characterization of lipophilic wood extractives from clones of *Eucalyptus urograndis* cultivate in Brazil. **Bioresources**, v.2, n. 2, p. 157-168, 2007.

SOARES, E.S. **Microrganismos promissores para a degradação de compostos fenólicos presentes em bagaço-de-cana, lodo e águas residuárias de agroindústria sulcro-alcooleira.** 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências/Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2007.

SOUZA, H.Q.; OLIVEIRA, L.A.; ANDRADE, J.S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia**, Campinas, v. 28, p. 116-124, 2008.

STOKLANDA, J. KAUSERUD, H. *Phellinus nigrolimitatus* - a wood-decomposing fungus highly influenced by forestry. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 187, p. 333–343, 2004.

TANESAKA, E.; MASUDA, H.; KINUGAWA, K. Wood degrading ability of Basidiomycetes that are wood decomposers, litter decomposers, or mycorrhizal symbionts. **Mycologia**, New York, v. 85, n. 3, p. 347-354, 1993.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY – TAPPI.  
**Preparation of wood for chemical analysis** – Tappi – T 264 cm-07. Atlanta: Tappi Press, 1997.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY – TAPPI.  
**Solvent extractives of wood and pulp** – Tappi T 204 cm-07. Atlanta: Tappi Press, 1997.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY – TAPPI.  
**Acid-insoluble lignin in wood and pulp** – Tappi T 222 om-11. Atlanta: Tappi Press, 1999.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY – TAPPI.  
**Carbohydrate composition of extractive-free wood and wood pulp by gas-liquid chromatography** – Tappi T 249 cm-09. Atlanta: Tappi Press, 1999.

TIAN, B. Y. et al. Microbial community structure and diversity in a native forest wood-decomposed hollow-stump ecosystem. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 26, p. 233–240, 2010.

TOMAZELLO FILHO, M. Variação da densidade básica em estrutura anatômica da madeira de *Eucalyptus globulus*, *E. pellita* e *E. acmenioides*. **IPEF**, Piracicaba, n. 36, p. 35-42, ago. 1987.

TOILLIER, S.L. Controle de cretamento bacteriano comum (*xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em Feijoeiro induzidas por *Pycnoporus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.1, p.99-110, 2010.

TRIGO, A.; VALENCIA, A.; CASES, I. Systemic approaches to biodegradation. **FEMS Microbiological Reviews**, Amsterdam, v. 33, p. 98-108, 2009.

TUOMELA, M. *et al.* Biodegradation of ligninolítica in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 72, p. 169-183, 2000.

UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.2, p. 388-394, 2007.

VAN ZYL, L. M.; WINGFIELD, M. J. Wound response of *Eucalyptus* clones after inoculation with *Cryphonectria cubensis*. **European Journal of Forest Pathology**, Berlin, v. 29, p. 161-167, 1999.

VASILIAUSKAS, R. *et al.* Community of *Aphyllporales* and root rot in stumps of *Picea abies* on clear felled forest sites in Lithuania. **Scandinavian Journal of Forest Research**, Abingdon, v. 17, n. 5, p. 398-407, 2002.

VALISIAUSKAS, R. Damage to trees due to forestry operations and its pathological significance in temperate forests: a literature review. **Forestry**, Oxford, v. 74, p. 319-336, 2001.

VARGAS-GARCÍA, M. C. *et al.* *In vitro* studies on lignocellulose degradation by microbial strains isolated from composting processes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 59, p. 322-328, 2007.

WATANABE, T.; WATANABE, Y.; NAKAMURA, K. Biodegradation of wood in dual cultures of selected two fungi determined by chopstick method. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 95, n. 6, p. 623-626, 2003.

WILCOX, W. W. Anatomical changes in wood cell walls attacked by fungi and bacteria. **The Botanical Review**, Lancaster, v. 36, n. 1, p. 1-27, 1970.

WORRAL, J. J.; ANAGNOST, S. E.; ZABEL, R. A. Comparison of wood decay among diverse lignococcus fungi. **Mycologia**, New York, v. 89, n. 2, p. 199-219, 1997.

WRIGHT, P.J.; WALLIS, A.F.A. Rapid determination of cellulose in plantation eucalypt woods to predict Kraft pulps yields. **TAPPI Journal**, Atlanta, v. 81, n. 2, p. 126-130, 1998.

YUAN, Z.Q.; MOHAMMED, C. Lesion development in stems of rough and smooth-barked *Eucalyptus nitens* following artificial inoculations with canker fungi. **Forest Pathology**, Berlin, v. 31, p. 149-161, 2001.

ZABEL, R. A.; MORRELL, J. J. **Wood microbiology: decay and its prevention**. California: Academic Press, 1992, 476 p.

ZABOWSKI, D. *et al.* Long-term effects of stump removal to control root rot on forest soil bulk density, soil carbon and nitrogen content. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, n. 3/4, p. 720-727, 2008.