



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

LAIS GONÇALVES DA COSTA

**SELEÇÃO DE FUNGOS COM CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DE TOCOS DE
Eucalyptus spp. PARA UTILIZAÇÃO NA DESTOCA BIOLÓGICA**

JERÔNIMO MONTEIRO - ES

2014

LAIS GONÇALVES DA COSTA

**SELEÇÃO DE FUNGOS COM CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DE TOCOS DE
Eucalyptus spp. PARA UTILIZAÇÃO NA DESTOCA BIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais.

Orientador: Prof. Dr. Waldir Cintra de Jesus Junior

Coorientador: Prof. Dr. Juarez Benigno Paes

JERÔNIMO MONTEIRO - ES

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

C837s Costa, Lais Gonçalves da, 1989-
Seleção de fungos com capacidade de degradação de tocos de *Eucalyptus* spp. para utilização na destoca biológica / Lais Gonçalves da Costa. – 2014.
69 f. : il.

Orientador: Waldir Cintra de Jesus Junior.

Coorientador: Juarez Benigno Paes.

Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Eucalipto. 2. Madeira - Deterioração. 3. Fungos apodrecedores de madeira 4. Madeira - Química. I. Jesus Junior, Waldir Cintra de. II. Paes, Juarez Benigno. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. IV. Título.

CDU: 630

**SELEÇÃO DE FUNGOS COM CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DE TOCOS
DE *Eucalyptus* spp. PARA UTILIZAÇÃO NA DESTOCA BIOLÓGICA**

Lais Gonçalves da Costa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Florestais na Área de Concentração Ciências Florestais.

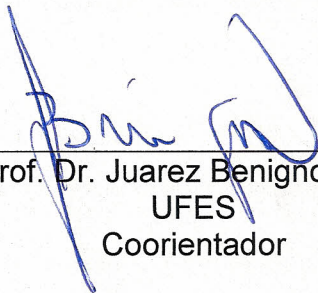
Aprovada em 25 de novembro de 2014.



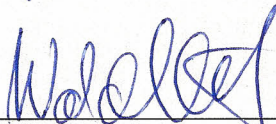
Prof. Dr. Willian Bucker Moraes
UFES
Examinador Externo



Prof. Dr. Edson Luiz Furtado
UNESP
Examinador Externo



Prof. Dr. Juarez Benigno Paes
UFES
Coorientador



Prof. Dr. Waldir Cintra de Jesus Junior
UFSCAR
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por abençoar, iluminar e guiar meu caminho em todas as etapas da minha vida.

A minha família, meus pais Jairo e Ana, por todos os esforços realizados para que esta etapa se concluísse e pela educação transmitida. A minha irmã Lara pelo apoio e amizade durante a vida.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, pelo suporte para a realização deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e a Fibría pela concessão da bolsa.

A FAPES pela concessão da bolsa para realização do Estágio Técnico Científico na Universidade de Córdoba, Espanha.

Ao Professor Waldir Cintra de Jesus Junior, pela orientação, disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Juarez Benigno Paes, pela orientação, amizade, troca de informações e por toda colaboração para que este estudo pudesse ser realizado.

Ao meu namorado Victor, pela amizade, carinho, companheirismo e incentivo em momentos que precisei e pela imensa contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Professor Onofre Dardengo (Nequinha), por permitir a realização do experimento de campo em seu sítio e pela ajuda e apoio prestados na realização deste.

A todos os colegas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e pelos bons momentos de convivência em especial, Dercílio, Pedro Nicó, Vinícius Tinti, Brunela e José Geraldo.

Ao técnico do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira Gilson, e aos funcionários Elecy e Gilberto, pelo auxílio no preparo e análises das amostras.

Aos professores do Departamento de Ciências Florestais e da Madeira e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais pelos conhecimentos acadêmicos transmitidos.

Agradeço também a todos aqueles que mesmo não mencionados aqui, que de forma direta ou indireta, colaboraram para que mais esta etapa fosse concluída.

Enfim, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

COSTA, Lais Gonçalves. **Seleção de fungos com capacidade de degradação de tocos de *Eucalyptus* spp. para utilização na destoca biológica.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES. Orientador: Prof. Dr. Waldir Cintra de Jesus Junior. Coorientador: Prof. Dr. Juarez Benigno Paes.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar, por meio do isolamento e seleção de fungos, o potencial degradador dos mesmos em tocos de *Eucalyptus* spp., a fim de desenvolver uma alternativa para o processo convencional da retirada de tocos em povoamentos de *Eucalyptus* spp. Para tanto, foram coletados discos de tocos deteriorados de eucalipto no campo, e a partir destes foram isolados os fungos. A fim de verificar o potencial de degradação de madeira dos fungos isolados, estes foram testados no experimento de pré-seleção. Foi realizada a identificação molecular dos isolados que apresentaram potencial de degradação no experimento de pré-seleção. Os fungos selecionados como potencial degradadores da madeira foram avaliados em ensaio de apodrecimento acelerado para detectar a real capacidade de deterioração. Após este ensaio, foi realizada a análise química da madeira deteriorada para verificar quais constituintes da madeira foram deteriorados pelos fungos. O potencial de degradação em tocos no campo pelos fungos selecionados foi avaliado com o auxílio de um penetrômetro de impacto e por meio da velocidade de propagação das ondas de tensão (Stress wave timer), após quatro meses da inoculação. O isolamento de fungos a partir de tocos no campo permitiu a obtenção de 7 fungos com potencial de degradação de madeira de eucalipto. Os fungos identificados foram *Resinicium confertum*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Trichoderma citrinoviride*. A análise química determinou, de maneira geral, a maior preferência pela lignina na posição da madeira mais consumida. Foi observada a presença dos fungos nos tocos inoculados após o término do ensaio de campo, porém a degradação teve pouca variação em relação aos tocos não inoculados.

Palavras-chave: Deterioração de tocos, Fungos xilófagos, Stress wave timer, Química da madeira.

ABSTRACT

COSTA, Lais Gonçalves. **Selection of fungi with capacity of degradation in stumps of *Eucalyptus* spp. for use in biological stump removal.** 2014. Dissertation (Master's degree in Forest Sciences) – Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, ES, Advisor: Prof. Dr. Waldir Cintra de Jesus Junior. Co-advisor: Prof. Dr. Juarez Benigno Paes.

The present work aimed to evaluate, through the isolating and selection of fungi, the degradation potential thereof in stumps of *Eucalyptus* spp., in order to develop an alternative to the conventional process of stumps removal in *Eucalyptus* spp. Therefore, were collected discs in decayed eucalyptus stumps in the field, and from these were isolated fungi. In order to verify the potential degradation of wood fungi isolated, these were tested in the pre-selection experiment. Was performed molecular identification of isolates exhibiting degradation potential in the pre-selection experiment. Fungi selected as degrading potential of wood were evaluated in accelerated decay test to detect the actual capacity of deterioration. After this test, was performed a chemical analysis of the decayed wood to verify which wood constituents were damaged by the fungi. The stumps degradation potential in the field by the selected fungi was evaluated with the aid of a penetrometer of impact and through the speed of propagation of stress waves, after four months of inoculation. Isolation of fungi from the field stumps afforded 7 fungi with degradation potential of eucalyptus wood. The identified fungi were *Resinicium confertum*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Trichoderma citrinoviride*. Chemical analysis of the wood determined, in generally, most preferably of lignin in the most consumed position of the wood. It was observed the presence of fungi in the inoculated stumps after the field test, but the degradation had little variation in relation to non-inoculated stumps.

Keywords: Stumps deterioration, Wood decay fungi, Stress wave timer, Wood chemistry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVOS	11
1.1.1 Objetivo geral	11
1.1.2 Objetivos específicos.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 O GÊNERO <i>Eucalyptus</i>	12
2.2 DECOMPOSIÇÃO DA MADEIRA POR FUNGOS XILÓFAGOS.....	13
2.2.1 Podridão branca	14
2.2.2 Podridão parda	15
2.2.3 Podridão mole	16
2.3 DESTOCA MECÂNICA VERSUS DESTOCA BIOLÓGICA.....	17
2.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MADEIRA.....	19
2.4.1 Celulose	19
2.4.2 Hemiceluloses	20
2.4.3 Lignina.....	20
2.4.4 Extrativos	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 OBTENÇÃO DE FUNGOS XILÓFAGOS EM TOCOS DE <i>Eucalyptus</i> spp.	23
3.1.1 Descrição da área de coleta dos tocos de <i>Eucalyptus</i> sp. e do material coletado.....	23
3.1.2 Armazenamento e processamento do material coletado	24
3.1.3 Isolamento dos fungos	25
3.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DETERIORAÇÃO EM EXPERIMENTO DE PRÉ-SELEÇÃO DOS FUNGOS.....	25
3.2.1 Espécie de madeira e preparação dos corpos de prova.....	26
3.2.2 Fungos selecionados.....	26
3.2.3 Montagem do experimento	27
3.2.4 Avaliação e análise dos resultados	28
3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO.....	29
3.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DETERIORAÇÃO EM EXPERIMENTO DE APODRECIMENTO ACELERADO EM LABORATÓRIO	30
3.4.1 Espécie de madeira e preparo dos corpos de prova.....	30
3.4.2 Fungos selecionados.....	31
3.4.3 Montagem do experimento.....	31
3.4.4 Avaliação e análise dos resultados	32

3.5 ANÁLISE QUÍMICA DA MADEIRA.....	33
3.6 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO POR FUNGOS EM TOCOS NO CAMPO	34
3.6.1 Localização e montagem do experimento	34
3.6.2 Avaliação e análise dos resultados	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 FUNGOS ISOLADOS A PARTIR DOS TOCOS COLETADAS NO CAMPO.....	39
4.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DETERIORAÇÃO EM EXPERIMENTO DE PRÉ-SELEÇÃO DE FUNGOS.....	39
4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO.....	43
4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DETERIORAÇÃO EM EXPERIMENTO DE APODRECIMENTO ACELERADO EM LABORATÓRIO	44
4.5 ANÁLISE QUÍMICA DA MADEIRA.....	48
4.6 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO POR FUNGOS EM TOCOS NO CAMPO	52
4.6.1 Avaliação da degradação com penetrômetro de impacto	52
4.6.2 Avaliação da degradação com Stress Wave Timer	54
5 CONCLUSÕES	58
6 REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICES	65

1 INTRODUÇÃO

Os plantios florestais de *Eucalyptus* spp. no Brasil tiveram grande crescimento nos últimos anos. Segundo dados da Indústria Brasileira de Árvores – IBÁ (2014), em 2013, o setor brasileiro de árvores plantadas adicionou ao produto interno bruto (PIB) brasileiro (R\$ 4,8 trilhões) cerca de R\$ 56 bilhões, representando 1,2% de toda a riqueza gerada no País. Os plantios de árvores de eucalipto representam 72,0% da área total de árvores plantadas e as árvores de pinus, 20,7%, acácia, teca, seringueira e paricá estão entre as outras espécies plantadas no Brasil que correspondem a 7,3%.

Para efeito de comparação cada hectare com árvores plantadas no Brasil adicionou ao PIB nacional em 2013 cerca de R\$ 7,4 mil/ano, enquanto a soja adicionou R\$ 4,8 mil/ano por hectare plantado (IBÁ, 2014).

O uso múltiplo da madeira de eucalipto é um dos fatores que contribuíram para esse crescimento, a qual pode ser usada para diversas finalidades, como construção civil, indústria moveleira, produção de polpa celulósica e papel e produção de carvão. Segundo Andrade et al. (2012), a espécie se consolidou como uma fonte de suprimento de madeira por ter um curto ciclo de corte e rápido crescimento.

Assim, com o crescente desenvolvimento do setor florestal torna-se necessário a atualização das técnicas empregadas durante a exploração das espécies do gênero *Eucalyptus* e afins, para produzir alternativas menos onerosas e mais sustentáveis ao meio ambiente.

A retirada dos tocos de *Eucalyptus* spp. após o corte da madeira é realizada por meio do processo de destoca mecânica. De acordo com Dedecek e Gava (2005) e Alonso et al. (2007) esse processo é de elevado custo; gera danos ao meio ambiente como a compactação do solo; danifica a estrutura do solo durante o deslocamento da manta orgânica que se acumulou na superfície; e, além disso, pode causar danos a pneus e partes de máquinas e implementos utilizados no preparo do solo.

Deste modo a destoca biológica surge como uma alternativa promissora para a substituição do processo de destoca mecânica. No entanto, segundo Onofre

et al. (2001), o processo de degradação biológica natural de tocos de *Eucalyptus* spp. no campo é demorado, assim durante muitos anos tal material permanece inalterado, se tornando inviável a utilização desse processo.

Visando à substituição do emprego da destoca mecânica na retirada de tocos de *Eucalyptus* spp. e a aceleração do processo de degradação biológica natural, tem-se como alternativa promissora o emprego de fungos apodrecedores selecionados.

Os fungos degradadores da madeira não patogênicos causam várias mudanças nas propriedades da mesma em decorrência da degradação dos polímeros das paredes das células e são conhecidos como fungos de podridão mole, que causam a degradação da celulose na madeira sob baixa disponibilidade de oxigênio; fungos de podridão parda, que provocam a degradação das hemiceluloses e celulose da madeira; e fungos de podridão branca, que alteram os compostos químicos da madeira, principalmente lignina (OLIVEIRA et al., 1986; TIAN et al., 2010; RYSS et al., 2011).

Portanto, de acordo com Andrade et al. (2012), a utilização de fungos selecionados aumenta expressivamente a decomposição de tocos de *Eucalyptus* sp. em campo. Além disso, tem-se uma redução da exportação de nutrientes da área, manutenção da microbiota e redução dos impactos causados no solo, contribuindo desta forma, para a maior sustentabilidade das florestas plantadas (ALONSO et al., 2007).

Em função dos fatores supracitados, a seleção de fungos que aceleram o processo de degradação natural dos tocos remanescentes da extração florestal em povoamentos de eucaliptos tem grande importância.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O trabalho teve por objetivo avaliar, por meio do isolamento e seleção de fungos, o potencial degradador dos mesmos em tocos de *Eucalyptus* sp., a fim de desenvolver uma alternativa para a destoca mecânica de tocos em povoamentos de *Eucalyptus* spp.

1.1.2 Objetivos específicos

Promover o isolamento de fungos a partir de fragmentos de tocos de eucaliptos deteriorados coletados no campo, visando à obtenção de culturas puras.

Avaliar o poder de degradação dos fungos selecionados em experimento de pré-seleção de fungos com capacidade de deterioração em laboratório.

Realizar a identificação molecular dos fungos selecionados com maior poder de degradação por meio da extração do DNA (*Deoxyribonucleic Acid*) genômico.

Verificar o poder de degradação dos fungos selecionados em experimento de apodrecimento acelerado em laboratório.

Realizar a análise química da madeira deteriorada a fim de verificar quais constituintes da madeira serão deteriorados pelos fungos.

Avaliar o poder de degradação dos fungos selecionados em tocos de *Eucalyptus* sp. no campo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO *Eucalyptus*

O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, e é originário da Austrália ocorrendo ainda, na Papua Nova Guiné, Indonésia e Filipinas, com mais de 600 espécies descritas. É um gênero de grande plasticidade e de dispersão mundial, cresce satisfatoriamente em grande amplitude edafoclimática, e pode ser encontrado em diversas regiões do globo (LIMA, 1996).

No Brasil, assim como em outros países, o gênero *Eucalyptus* teve boa adaptação e ampla aceitação no mercado. Rápido crescimento, adaptação a vários tipos de solo, topografia, clima e baixo custo de produção, são alguns fatores que justificam tal fato.

A cultura do eucalipto foi introduzida no Brasil em 1903 por Edmundo Navarro de Andrade, para fornecer carvão e dormentes às locomotivas da Companhia Paulista de Estradas de Ferro, e reflorestar as áreas de florestas nativas exploradas (MARTINI, 2004). Na década de 1940, os plantios de eucaliptos em escala comercial tiveram grande impulso, na região da Bacia do Rio Doce, Minas Gerais, nos locais em que havia mineração de ferro para a siderurgia. Seu uso era em forma de carvão vegetal para substituir o coque nos processos de beneficiamento do minério de ferro (CHANDLER e HANSON, 1998).

Segundo dados da IBÁ (2014), no cenário mundial, o Brasil atualmente é o país com a maior produção de folhosas e coníferas, produzindo 38,1 e 31,3 m³ ha⁻¹ ano⁻¹ respectivamente, e a Nova Zelândia é detentora do segundo lugar, com produção de 18,8 e 27,5 m³ ha⁻¹ ano⁻¹, respectivamente. Os principais estados produtores de eucalipto no Brasil são: Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Bahia, Rio Grande do Sul e Espírito Santo, a porcentagem de plantio de eucalipto em cada estado é de 25,6; 18,4; 12,7; 11,4; 5,7 e 4,0%; respectivamente em relação à área plantada de eucalipto do Brasil.

Em 2013, a área ocupada por plantios florestais de *Eucalyptus* spp. no Brasil totalizou 5,47 milhões de ha, representando crescimento de 3,1% (170.000 ha)

frente ao indicador de 2012. O principal fator que alavancou esse crescimento foi o estabelecimento de novos plantios frente à demanda futura dos projetos industriais do segmento de celulose. O setor de celulose é o que mais utiliza a madeira de *Eucalyptus* spp., sendo 41% utilizada neste setor (IBÁ, 2014).

A madeira de eucalipto produzida no Brasil tem usos múltiplos, além do uso na produção de celulose, é possível citar como exemplo produtos finais diversos, sendo estes: lenha, carvão, madeira para serraria, celulose, óleos essenciais, dormentes, estacaria para edificações, postes, moirões e painéis aglomerados.

As principais espécies do gênero *Eucalyptus* plantadas em climas tropicais e subtropicais são: *E. grandis*, *E. globulus*, *E. saligna* e *E. urophylla*. Em regiões de clima temperado são plantados o *E. cloezina*, *E. dunnii* e *E. viminalis* (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA – SBS, 2006).

No Brasil grande parte das plantações de eucalipto é realizada com híbridos clonais. O melhoramento de plantas consiste basicamente em modificar seu patrimônio genético, com a finalidade de obter plantas capazes de apresentar maior rendimento, com produtos de alta qualidade e capazes de se adaptar às condições de determinado ambiente, além de ser resistente às principais pragas e doenças (CRISTINA, 2004; SANTOS, 2005).

O híbrido clonal de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, é um dos mais utilizados em reflorestamentos no Brasil. Com o objetivo de melhorar a produção de celulose, este híbrido desenvolvido no Brasil, aliou características desejáveis como rápido crescimento, alta densidade da madeira e propriedades físicas de celulose, tornando-o assim um material com maior rendimento para produção de celulose (QUILHÓ; MIRANDA; PEREIRA, 2006).

2.2 DECOMPOSIÇÃO DA MADEIRA POR FUNGOS XILÓFAGOS

Os fungos xilófagos são organismos responsáveis pelas maiores perdas causadas a estruturas de madeira, como postes, dormentes e moirões (PAES; MORAIS; LIMA, 2005). De acordo com Clausen (2010), os fungos xilófagos podem

ser classificados em função do tipo de ataque à madeira em: fungos emboloradores ou manchadores e os fungos apodrecedores.

Os fungos emboloradores ou manchadores são responsáveis por alterações na superfície da madeira sendo as propriedades mecânicas das madeiras atacadas por esses fungos pouco alteradas (CLAUSEN, 2010).

Ao contrário dos fungos emboloradores, os fungos apodrecedores causam profundas alterações nas propriedades físicas e mecânicas das madeiras, por meio das progressivas deteriorações das moléculas que constituem a parede celular, e são classificados em podridão branca, podridão parda e podridão mole (CLAUSEN, 2010).

2.2.1 Podridão branca

Esse tipo de apodrecimento é causado por alguns fungos da classe Basidiomicetos, sendo exemplos às espécies *Polyporus fumosus*, *Trametes versicolor* e *Polyporus sanguineus* (OLIVEIRA et al., 1986).

A podridão branca, normalmente, pode ser observada nos estágios iniciais, em que a madeira torna-se clara ou descolorida. Isto ocorre por causa da maior porcentagem de holocelulose existente na madeira, pois esta, quando atacada, adquire coloração clara, apresentando progressiva perda de massa e propriedades mecânicas (KIRK; COWLING, 1984; MENDES; ALVES, 1988; CLAUSEN, 2010).

As hifas desses fungos colonizam os lumes das células, assim como os de podridão parda, penetrando, em coníferas, primeiro de uma célula para outra via pontuações. Em folhosas as hifas colonizam os raios e vasos, penetrando nas fibras (KIRK; COWLING, 1984; OLIVEIRA et al., 1986). Os fungos de podridão branca atuam na superfície da parede celular. A ação restrita do sistema enzimático proporciona a formação de fendas ou orifícios nos quais os fungos se fixam. No decorrer do ataque, estas fendas vão se juntando, provocando uma vagarosa e total erosão da parede celular a partir do lume. Estes fungos decompõem,

proporcionalmente, tanto a celulose e hemicelulose quanto a lignina (OLIVEIRA et al., 1986).

Na literatura é possível verificar o potencial degradador dos fungos causadores da podridão branca. Em alguns trabalhos pode-se encontrar perda de massa superior a 25% (MODES et al., 2012; MOTTA et al., 2013). Segundo a *American Society for Testing and Materials – ASTM D - 2017 (2005)* a madeira com tal perda de massa não pode ser classificada como resistente a fungos xilófagos.

2.2.2 Podridão parda

Da mesma forma que a podridão branca, esse tipo de apodrecimento é causado por alguns fungos da classe Basidiomicetos, sendo exemplos às espécies *Postia placenta*, *Neolentinus lepideus* e *Gloeophyllum trabeum* (OLIVEIRA et al., 1986).

Em coníferas, os fungos causadores de podridão parda colonizam a madeira através dos raios e se propagam, por meio de microhifas, no tecido longitudinal pelas pontoações, e crescem dentro do lume celular (SCHMIDT, 2006).

Nas folhosas, a distribuição inicial das hifas é mais uniforme. Em algumas espécies, a colonização pelos vasos é maior que pelos raios. As hifas destes fungos permanecem no lume das células na superfície da camada S3, que não é atacada. As enzimas celulolíticas, por difusão, avançam na camada S2 e posteriormente a camada S1 e lamela média, degradando completamente os carboidratos (OLIVEIRA et al., 1986; SCHMIDT, 2006).

Estes fungos degradam a celulose e as hemiceluloses, transformando-as em substâncias solúveis facilmente assimiladas e digeridas. A lignina, de coloração escura, fica praticamente intacta, conferindo à madeira um aspecto pardo-escuro (KIRK; COWLING, 1984; MENDES; ALVES, 1988; CLAUSEN, 2010).

A podridão parda, muitas vezes, não é perceptível durante os estágios iniciais, mas a madeira torna-se rapidamente frágil. Com o avanço da deterioração a parede celular pode contrair e entrar em colapso (KIRK; COWLING, 1984). A

destruição dos elementos estruturais que se encontram nas paredes celulares provoca uma rápida perda da resistência mecânica da madeira (MENDES; ALVES, 1988). Segundo Oliveira et al. (1986) a resistência ao impacto é a propriedade da madeira mais rapidamente afetada.

Segundo Winandy e Morell (1993), os fungos causadores de podridão parda foram responsáveis pela redução das propriedades mecânicas da madeira de Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). O módulo de elasticidade (MOE) e o módulo de ruptura (MOR) foram algumas das propriedades mecânicas afetadas pelos fungos testados. Houve uma redução de 45,25% no MOE e 60,11% no MOR, após 177 dias de incubação submetido ao fungo *P. placenta*. A redução do MOE e MOR foi maior para o fungo *G. Trabeum* no mesmo período de incubação, sendo de 60,11 e 69,8%, respectivamente.

2.2.3 Podridão mole

Os fungos responsáveis pela podridão mole são pertencentes às classes Ascomicetos e Deuteromicetos (OLIVEIRA et al., 1986). A degradação por fungos de podridão mole normalmente afeta principalmente a superfície externa da madeira, apresentando rachaduras transversais na superfície (OLIVEIRA et al., 1986).

O ataque é favorecido por situações em que a madeira se encontra úmida, sendo caracterizado por um amolecimento da madeira e por conferir a mesma uma coloração que varia de cinza a marrom (KIRK; COWLING, 1984; CLAUSEN, 2010). A degradação produzida por estes fungos é de ação lenta quando comparada com a atividade da podridão branca e parda (MENDES; ALVES, 1988).

Os fungos causadores de podridão mole se diferenciam daqueles de podridão branca e parda por crescerem principalmente dentro da parede celular. Tanto em coníferas, como em folhosas, a madeira é inicialmente colonizada pelo parênquima radial (OLIVEIRA et al., 1986).

Nas coníferas, a penetração do fungo ocorre a partir do lume dos traqueídeos, por meio de hifas de perfuração fina, com menos de 0,5 μm de

espessura, que penetram a camada S3 e, em seguida, reorientam e penetram suas hifas na camada S2, depois de uma ramificação em forma de “T”, fornecendo dois ramos finos que são emitidos ao longo das microfibrilas (OLIVEIRA et al., 1986).

Nas Folhosas as hifas existentes no lume produzem uma ramificação fina que penetra obliquamente na parede celular, provocando a lise da camada S3 e desenvolvendo-se na camada S2, produzindo uma chamada ramificação em “V” (OLIVEIRA et al., 1986).

Dentro da parede celular, os fungos de podridão mole degradam a celulose e hemiceluloses. Comparado com os fungos da podridão parda, os agentes da difusão enzimática não conseguem atingir tão profundamente a parede celular, em função dessa limitação, permanecem nas imediações das hifas. Pelo menos na fase inicial do ataque, a lignina não é, ou é pouco atacada, de modo que a podridão mole em relação a este fato se assemelha a podridão parda (OLIVEIRA et al., 1986; SCHMIDT, 2006).

2.3 DESTOCA MECÂNICA VERSUS DESTOCA BIOLÓGICA

Em algumas empresas florestais o sistema silvicultural adotado para o manejo e condução das plantações de eucaliptos, é o de talhadia, que consiste no primeiro corte da árvore de eucalipto aproximadamente aos sete anos de idade e condução da brotação dos tocos, seguido de dois ciclos de colheita subsequentes, da primeira e segunda brotação dos tocos, totalizando um ciclo total de vinte e um anos, quando, então os plantios são reformados. Como resultado da adoção deste sistema, é possível encontrar extensas áreas onde a presença de tocos na área dificulta o preparo da mesma para um novo plantio (COUTO et al., 2013).

Geralmente, a operação de destoca, realizada por tratores de esteiras, consiste em remover a parte aérea do toco e de suas raízes, facilitando o trabalho das máquinas de preparo do solo e sementeira. Porém, segundo Krag (2010) na atividade de destoca os impactos gerados são de valor negativo, pois há uma relação de causa e efeito imediata. A execução desta atividade afeta em ordem

direta o ar, pela utilização de maquinarias que contribui para o aumento de gases e partículas sólidas; o solo, com a movimentação das máquinas contribuindo para compactação do mesmo; a microfauna terrestre por meio da destruição e ocupação de hábitat, atingindo ainda o banco de propágulos no solo pela utilização dos implementos na área.

De acordo com o trabalho de Simões e Schmitz (2000), a destoca mecânica acarreta ainda outros inconvenientes, como o decréscimo dos teores de matéria orgânica no solo, além de ser uma atividade onerosa.

Segundo Pavan, Alves e Souza (2010), dentre as atividades envolvidas no processo de produção de eucalipto a destoca mecânica é a que representa o maior custo, seguida do plantio, tratos culturais e preparo do terreno.

A destoca biológica é uma alternativa de substituição da mecânica. A destoca biológica ocorre por meio da utilização de fungos apodrecedores da madeira aliado as condições ideais para que acelerem a degradação biológica dos tocos. Em geral, temperaturas mais elevadas propiciam as atividades enzimáticas dos fungos apodrecedores, sendo a temperatura ideal situada entre 30-40 °C (CHEN et al., 2000).

O processo de destoca biológica pode apresentar variações de acordo com a espécie de fungo utilizada, com o método de inoculação e a estação do ano (ANDRADE, 2003). Segundo Negrão (2011), os fungos mais promissores para a degradação dos tocos são aqueles naturalmente presentes nos povoamentos de eucalipto, os quais já estão adaptados ao tipo de substrato, clima e local.

É importante salientar que se deve ter atenção para a não utilização de fungos fitopatogênicos na área de interesse. Assim, se usada de forma correta, a destoca biológica pode-se tornar uma alternativa promissora, contribuindo para a maior sustentabilidade das florestas plantadas (ALONSO et al., 2007).

2.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MADEIRA

A madeira é composta majoritariamente de polímeros de celulose, hemicelulose e lignina, e estes são responsáveis pela maioria das propriedades físicas e químicas da madeira (LEPAGE, 1986). Na madeira de eucalipto, por exemplo, estes polímeros estão distribuídos na seguinte proporção: 40-62% de celulose, 12-22% de hemiceluloses e 15-25% de lignina (HILLIS; BROWN, 1978). Além desses polímeros também estão presentes, em menor quantidade, os extrativos e materiais inorgânicos (cinzas) (LEPAGE, 1986).

A proporção desses componentes varia em madeiras de coníferas e folhosas, nas espécies de um mesmo gênero, e até mesmo entre as mesmas espécies, sendo esta última influenciada pelo local de crescimento da árvore (PEREIRA, 1988).

2.4.1 Celulose

A celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ é um polímero constituído por centenas de unidades de glicoses que forma cadeias muito estáveis de alta massa molecular, é insolúvel em água e é o polissacarídeo de maior abundância no planeta, além de ser o principal componente da parede celular dos vegetais (MILTON, 1995; MULLER et al., 2006). A celulose pode ser encontrada na natureza em vários materiais como: algodão, rami, bambu, madeira e casca.

A celulose é o principal constituinte químico presente nas madeiras e seu teor pode variar de acordo com os dois grandes grupos vegetais produtores de madeira. Nas coníferas o teor de celulose varia entre 45-50%, enquanto nas folhosas varia entre 40-50% (BIERMANN, 1996). Em função das fortes ligações entre e intra molécula de glicose, a celulose é responsável por conferir resistência mecânica à madeira.

2.4.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses, também conhecidas como polioses, juntamente com a celulose formam a fração da madeira denominada holocelulose. As hemiceluloses são polissacarídeos associados à celulose e lignina em tecidos vegetais, e a sua principal diferença em relação a celulose é a presença de diversos tipos de unidades de açúcares (LEPAGE, 1986; SANTOS; REIS; MOREIRA, 2001).

As unidades de açúcares que compõem as hemiceluloses são: as pertencentes ao grupo das hexoses, glucoses, manose e galactose e as pertencentes ao grupo das pentoses, xilose e arabinose (KLOCK et al., 2005).

As hemiceluloses são o segundo maior componente da madeira, nas folhosas o teor de hemiceluloses é maior quando comparado com as coníferas. A madeira de folhosas possuem de 25-35% de hemiceluloses enquanto as de coníferas 25-29% (MILTON, 1995; KLOCK et al., 2005).

2.4.3 Lignina

A lignina, polímero tridimensional, é o terceiro componente da madeira, e sua composição química é considerada complexa. Ao contrário da celulose e das hemiceluloses, a lignina não pode ser descrita como uma combinação simples de algumas unidades monoméricas. Esse polímero natural pode ser definido como sendo uma classe de diferentes compostos, que contém hidrocarbonetos poliméricos complexos, formados por grupos alifáticos e aromáticos (MILTON, 1995).

Sua presença ocorre ao longo da parede da célula unindo as fibras e microfibrilas da celulose, conferindo rigidez à parede das células vegetais. O que difere as plantas lignificadas das que não contêm lignina, como gramíneas, é a rigidez conferida por esta, possibilitando o crescimento em altura. Além disso, a presença da lignina nos vegetais age como uma barreira física à degradação

enzimática da parede celular, podendo esta ser rompida mecanicamente por insetos e brocas marinhas, bioquimicamente por fungos de podridão branca e mole e, possivelmente, por pequenas nanoenzimas catalisadoras no caso de fungos de podridão parda (KIRK; COWLING, 1984).

Nas madeiras de coníferas a lignina está presente em maior quantidade, tendo em média 26-30% deste elemento, já nas madeiras de folhosas possui de 16-24%. Tal fato pode afetar a decomposição da madeira para determinados fungos xilófagos, assim como o tipo de lignina presente na madeira de coníferas (OLIVEIRA et al., 1986; CARVALHO et al., 2009).

2.4.4 Extrativos

Os extrativos são compostos extracelulares e de baixo peso molecular que não fazem parte da composição estrutural da madeira e podem ser encontrados nas paredes celulares e lúmenes de células (MILTON, 1995).

O teor de extrativos na madeira varia em média de 2 a 15%. As madeiras de coníferas, em geral, possuem mais extrativos do que as de folhosas. Os extrativos estão localizados em sua maioria no cerne da madeira, no alburno a quantidade de extrativos é baixa, e isto pode explicar a maior durabilidade natural da madeira do cerne em relação à de alburno (ROWELL et al., 2005).

Os extrativos influenciam nas propriedades físicas da madeira, cheiro, cor, resistência a microrganismos, densidade, higroscopicidade, e inflamabilidade. Os extrativos são também denominados de componentes acidentais e podem ser removidos da madeira por água fria ou quente e por solventes orgânicos tais como, etanol, tolueno, acetona e dicloreto de metano (HILLIS, 1971; MILTON, 1995). De acordo com Sjöström e Westermarck (1999), os principais tipos de extrativos são: terpenoides e esteróides, gorduras, ceras e substâncias fenólicas incluindo estilbenos, lignanas, taninos e flavonoides.

Além de alterar as características da madeira, os extrativos podem ser utilizados em escala comercial e tem notável importância industrial, um exemplo são

os extrativos obtidos a partir da resinação da madeira de pinus que são denominados de terebintina e breu. A terebintina tem aplicações diversas no campo químico e farmacêutico, sendo utilizada como solvente de tintas e vernizes, cânfora sintética, além da composição em fungicidas, bactericidas e germicidas. O breu é normalmente utilizado na fabricação de colas para papel, vernizes e tintas, borracha e adesivos (BRITO; BARRICHELO; GUTIERREZ, 1980).

A durabilidade natural da madeira é uma das propriedades que determina sua susceptibilidade ao ataque de organismos xilófagos e está na maioria das vezes associada à quantidade e qualidade dos extrativos. Em uma mesma espécie as variações nos teores desses componentes é evidentemente maior no cerne recém-formado do que no cerne interno. Em relação ao tipo de extrativos capazes de conferir resistência a organismos xilófagos, esses também são amplamente variáveis e inerentes a cada espécie (OLIVEIRA et al., 2005).

Oliveira et al. (2005) testaram a influência dos extrativos em seis diferentes espécies de madeira, em ensaio de apodrecimento acelerado. Para a madeira de candeia, cedro, cerejeira, jacarandá-caviúna, *Corymbia citriodora* e *Eucalyptus gummifera*, a perda de massa causada pelo fungo de podridão parda, *Gloeophyllum trabeum*, foi de 0,33; 0,82; 1,11; 0,58; 1,34; 1,10%, respectivamente. Porém para essas mesmas madeiras quando totalmente livre de extrativos a perda de massa foi de 32,50; 4,06; 30,74; 36,68; 38,70; 19,50%, respectivamente, indicando que a madeira livre dos extrativos perdeu parte de sua resistência ao fungo xilófago testado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE FUNGOS XILÓFAGOS EM TOCOS DE *Eucalyptus* spp.

3.1.1 Descrição da área de coleta dos tocos de *Eucalyptus* sp. e do material coletado

As coletas foram realizadas em três áreas de municípios do sul no estado do Espírito Santo, sendo estes: Jerônimo Monteiro, Cachoeiro de Itapemirim e São José do Calçado. A seleção das áreas foi realizada em localidades com diferentes níveis de altitude (baixa, média e alta), com intuito de analisar o efeito do microclima e da altitude das áreas na diversidade e atividade dos fungos coletados.

Pelo método de Köppen, essas regiões são caracterizadas pelo tipo climático Cwa - descrito como: C = mesotérmico, w = chuvas nos verões e seca no inverno; e a = temperatura média do mês mais quente é superior a 22 °C.

A Fazenda Bananal do Sul, localizada em Pacotuba, distrito de Cachoeiro de Itapemirim, possui altitudes que variam entre 70 e 130 metros; localiza-se nas seguintes coordenadas geográficas 20°46'19" S e 41°18'07" W; e o solo predominante, segundo o mapa geral de solos do Espírito Santo, baseado no mapa exploratório de solos do Projeto RADAMBRASIL (LANI, 2008), é o podzólico eutrófico.

O Sítio Cachoeira Bonita, localizado em Alto Calçado, distrito de São José do Calçado, tem altitudes variando entre 530 a 650 metros; localiza-se nas seguintes coordenadas geográficas 20°55'47.1" S 41°37'46.9" W; e o solo predominante nessa região é o latossolo vermelho-amarelo (LANI, 2008).

O Sítio Providência, localizado na Zona Rural no município de Jerônimo Monteiro, possui altitudes que variam entre 700 a 900 metros; localiza-se nas seguintes coordenadas geográficas 20°51'43" S e 41°27'32" W; e o solo predominante nessa região é o latossolo vermelho-amarelo (LANI, 2008).

Nas áreas citadas, foram selecionadas tocos de eucaliptos em estado de decomposição por fungos. Nestes tocos selecionados foram retirados discos de madeira com auxílio de motosserra, os quais foram devidamente identificados (Figura 1).

Figura 1 – Foto ilustrativa da coleta dos tocos de eucalipto deteriorados no campo.



3.1.2 Armazenamento e processamento do material coletado

Os discos coletados foram armazenados em sacos de papel poroso devidamente identificado e transportados para o Laboratório de Biodeterioração da Madeira (LBDM), localizado no Departamento de Ciências Florestais e da Madeira (DCFM) pertencente ao Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Jerônimo Monteiro, estado do Espírito Santo.

O preparo dos corpos de prova foi realizado manualmente com auxílio de um martelo e uma faca, que consistiu na transformação dos discos em corpos de prova com dimensões de aproximadamente 1,0 x 1,0 x 3,0 cm (radial x tangencial x longitudinal). Esses corpos de prova foram retirados na área de transição, localizada entre a porção sadia e aquela em decomposição, estando nessa região à presença

dos fungos decompositores. Os corpos de prova foram utilizados para a realização do isolamento dos fungos.

3.1.3 Isolamento dos fungos

Seguindo a metodologia de Alfenas (2007), o isolamento indireto dos fungos foi realizado em câmara de fluxo laminar, onde os corpos de prova foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio doméstico com concentração de 2% por 15 segundos, lavados em água destilada esterilizada, passados rapidamente pela chama de fogo e transferidos assepticamente para placas de Petri contendo meio de cultura malte:ágar (20:15 g/L), na quantidade de um corpo de prova por placa de Petri.

As placas de Petri foram mantidas em sala climatizada, com temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de $65 \pm 5\%$, embaladas em folhas de papel para evitar o contato com a luz, até a observação de crescimento micelial dos fungos, para em seguida ser realizado o um novo isolamento para obtenção das culturas puras.

O isolamento para obtenção das culturas puras foi realizado, pela transferência, com o auxílio de um estilete, de estruturas do patógeno (esporos e hifas) para meio de cultura malte:ágar contido em placas de Petri. As placas de Petri contendo o inóculo dos fungos foram mantidas nas mesmas condições citadas anteriormente.

3.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DETERIORAÇÃO EM EXPERIMENTO DE PRÉ-SELEÇÃO DOS FUNGOS

As avaliações dos fungos com potencial degradador de madeira de *Eucalyptus* sp. foram realizadas no Laboratório de Biodeterioração da Madeira (LBDM).

Estes experimentos tiveram como finalidade testar o potencial de deterioração de cada fungo e ao final selecionar os fungos com maior potencial de deterioração da madeira.

3.2.1 Espécie de madeira e preparação dos corpos de prova

Na condução do experimento foi utilizada a madeira de árvores sadias do clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, adquiridas no comércio local. Foram obtidos a partir desta madeira corpos de prova do alburno da madeira, confeccionados nas dimensões de 1 x 1 x 1 cm (radial x tangencial x longitudinal).

3.2.2 Fungos selecionados

Foram utilizados os isolados provenientes do isolamento indireto dos fungos e três fungos disponíveis no LBDM, com reconhecida capacidade de deterioração, sendo estes o *Postia placenta* (Fr.) Cook (podridão parda), *Trametes versicolor* (L.: Fries) Pilát (podridão branca) e *Gloeophyllum trabeum* (Pers.:Fr.) Murrill (podridão parda).

Estes fungos foram empregados como padrão de comparação aos fungos que foram selecionados e isolados dos tocos de eucalipto provenientes das três regiões citadas anteriormente. Adicionalmente foram utilizados os dois fungos isolados por Silva et al. (2014) com boa capacidade de deterioração.

3.2.3 Montagem do experimento

Para a montagem do experimento foram utilizadas placas de Petri contendo o meio de cultura malte-ágar, e em câmara de fluxo laminar foram inoculados os fungos obtidos do isolamento indireto dos tocos deterioradas de eucaliptos.

Os corpos de prova foram secos em estufa a 103 ± 2 °C por 48 horas e pesados, para obter a massa seca antes do período de exposição ao ataque dos fungos.

Após 15 dias, tempo necessário para o crescimento micelial do fungo em toda a placa de Petri, os corpos de prova foram adicionados. Antes dos corpos de prova serem adicionados na placa de Petri, estes foram rapidamente umedecidos em água destilada esterilizada para criar condições adequadas de desenvolvimento dos fungos nos mesmos. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar (Figura 2). Foram utilizados 10 corpos de prova em cada placa de Petri e para cada isolado foram utilizadas cinco placas de Petri.

Figura 2 – Corpos de prova de madeira umedecidos sendo adicionados na placa de Petri.



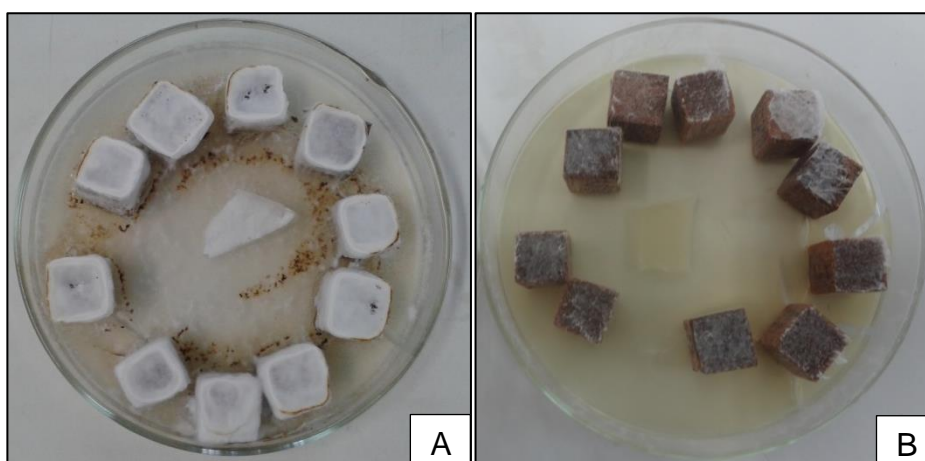
Após a montagem do experimento as placas de Petri foram embaladas em folhas de papel para evitar o contato com a luz e mantidas em sala climatizada (25 ± 2 °C e 65 ± 5 % de umidade relativa). O experimento teve duração de 20 semanas

sendo avaliado a cada, quatro, oito, 12, 16 e 20 semanas após a montagem do experimento.

3.2.4 Avaliação e análise dos resultados

Decorrido o período de ensaio, os corpos de prova foram retirados das placas de Petri, higienizados, secos em estufa a 103 ± 2 °C por 48 horas, e pesados, para obter suas massas após o período de exposição ao ataque dos fungos (Figura 3A-B).

Figura 3 – Corpos de prova submetidos à degradação pelo isolado 3 (A) e 2 (B).



O potencial de degradação dos fungos isolados foi avaliado em função da perda de massa dos corpos de prova. Para tanto, foi empregado delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial em que foram analisados o efeito do potencial de degradação dos isolados e do tempo de exposição na perda de massa. Foi empregado o teste de Scott-Knott, em nível de 5% de significância para os fatores e interação detectados como significativos pelo teste de F.

3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO

Os fungos que apresentaram potencial de degradação no experimento de pré-seleção foram enviados para o Laboratório de Patologia de Sementes e de Pós-Colheita, no Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Viçosa, para identificação molecular.

Os isolados foram cultivados em batata dextrose ágar (BDA), e mantidos em sala climatizada à $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e umidade relativa de $65 \pm 5\%$ por até quatro semanas, dependendo da taxa de crescimento do isolado e dessa forma foram enviados para Laboratório de Patologia de Sementes e de Pós- Colheita.

O micélio do isolado foi removido com auxílio de um escalpelo e colocado em microtubos de 1,5 mL. A extração de DNA genômico foi realizada utilizando o Kit de purificação de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) conforme Pinho et al. (2012).

Os primers ITS1 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS4 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') foram utilizados para amplificar a região espaçadora interna transcrita (Internal Transcribed Spacer-ITS) do rDNA (WHITE et al., 1990). As reações de PCR foram preparadas utilizando os seguintes reagentes para cada reação de 25 μL : 12,5 μL de Dream Taq TM PCR Master Mix 2X (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1 μL de cada primer (10 μM) sintetizado por Invitrogen (Carlsbad, EUA), 2 μL de DNA genômico (25 ng/ μL) e 2,5 μL de água livre de nuclease para completar o volume total.

A amplificação foi realizada com uma desnaturação inicial de 94 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 52 °C por 30 s, extensão inicial a 72 °C por 30 s e uma extensão final de 5 min a 72 °C . O produto de PCR (amplicon) foi visualizado em gel de agarose a 1 % para verificar a pureza e o tamanho do fragmento. Os amplicons foram purificados e sequenciados por Macrogen, Coreia do Sul.

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software CodonCode Aligner. Todas sequências foram analisadas e o arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-

senso. Os isolados foram previamente identificados pela análise das sequências ITS no banco de dados UNITE (NILSSON et al. 2014).

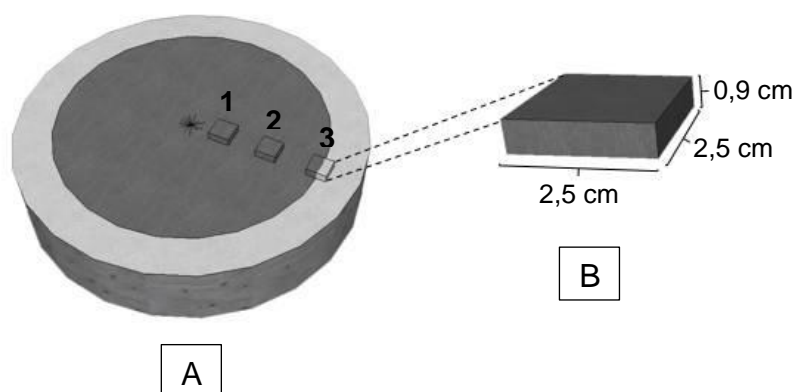
3.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DETERIORAÇÃO EM EXPERIMENTO DE APODRECIMENTO ACELERADO EM LABORATÓRIO

3.4.1 Espécie de madeira e preparo dos corpos de prova

Na condução do experimento foi utilizada a madeira de árvores sadias do clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*, obtidas no povoamento onde foi realizado o experimento de avaliação da capacidade de deterioração em campo.

Para o ensaio, foram confeccionados corpos de prova de madeira com dimensões de 2,5 x 2,5 x 0,9 cm (radial x tangencial x longitudinal). Os corpos de prova foram confeccionados em três posições diferentes, sendo estas: região de transição entre alburno e cerne, cerne intermediário e cerne interno (Figura 4A-B).

Figura 4 – Posições da madeira em que foram obtidos os corpos de prova (A) e o corpo de prova com suas respectivas dimensões (B).



Legenda: 1- corpo de prova na região de transição entre alburno e cerne, 2- corpo de prova na região do cerne intermediário e 3- corpo de prova na região do cerne interno.

3.4.2 Fungos selecionados

Para realização deste experimento foram selecionados os fungos que apresentaram melhores porcentuais de degradação no experimento da pré-seleção de fungos com capacidade de deterioração. Para tanto, os fungos selecionados foram testados nas três posições da madeira dos corpos de prova (transição entre albarno e cerne, cerne intermediário e cerne interno), a fim de comprovar o potencial degradador destes conforme metodologia descrita pela ASTM D - 2017 (2005).

Os corpos de prova foram também submetidos à ação dos fungos *Gloeophyllum trabeum* (podridão parda), *Polyporus fumosus* (podridão-branca) e *Postia placenta* (podridão parda), os quais foram utilizados como controle em função da reconhecida capacidade de deterioração dos mesmos.

3.4.3 Montagem do experimento

O ensaio foi montado em frascos de 600 mL, preenchidos com 300 g de solo com pH 7,2 e capacidade de retenção de água de 25,71%, conforme recomendado pela ASTM D - 2017 (2005). O solo de cada frasco foi umedecido com 74 mL de água destilada, conforme capacidade de retenção de água, e foram adicionados dois alimentadores de madeira de *Pinus* sp. Os frascos foram levemente tampados e esterilizados em autoclave a 121 ± 2 °C, por 30 minutos.

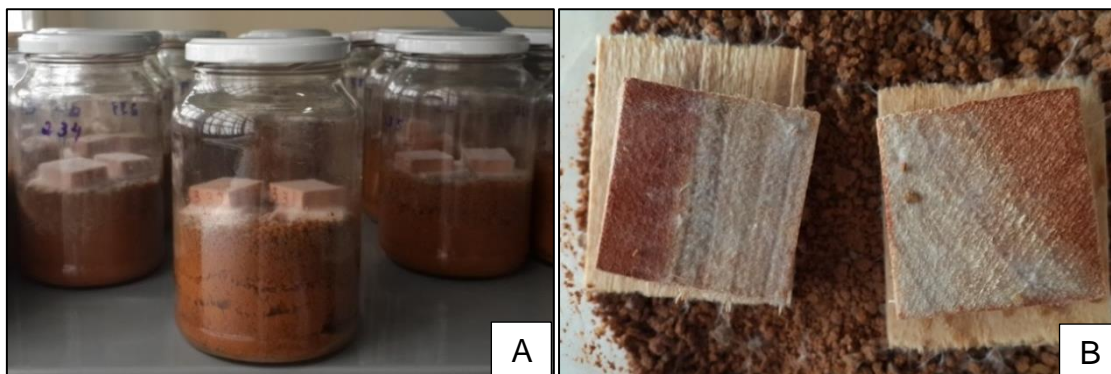
Posteriormente ao resfriamento dos frascos, na câmara de fluxo laminar, os fragmentos obtidos de culturas puras dos isolados dos fungos selecionados foram inoculados nos alimentadores.

Os corpos de prova foram secos em estufa a 103 ± 2 °C por 48 horas e pesados, para obter as massas antes do período de exposição ao ataque dos fungos.

Após o desenvolvimento do fungo nos alimentadores e a colonização no solo, que levou em média 15 dias, foram adicionados os corpos de prova, à razão de duas

amostras por frasco e 10 repetições para cada tratamento. O ensaio foi mantido em sala climatizada (25 ± 2 °C e 65 ± 5 % de umidade relativa) por 12 semanas (Figura 5).

Figura 5 – Frascos com corpos de prova (A) e corpos de prova com a presença de hifas (B).



3.4.4 Avaliação e análise dos resultados

Decorrido o período de 12 semanas os corpos de prova foram limpos, a fim de se retirar as hifas que colonizaram os mesmos, e estes foram secos em estufa a 103 ± 2 °C por 48 horas e pesados. O potencial de degradação dos fungos selecionados foi avaliado em função da perda de massa dos corpos de prova, com base na massa seca dos mesmos, tomada antes e após o ensaio. A perda de massa foi avaliada ao comparar os valores obtidos com os apresentados pela ASTM D - 2017 (2005), Tabela 1.

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial em que foram avaliados os fungos selecionados (10 níveis) e as posições da madeira testadas (três níveis). Foi empregado o teste de Scott-Knott a nível de 5% de significância para os fatores em interação detectados como significativos pelo teste F.

Tabela 1 – Classes de degradação de fungos xilófagos

Perda de Massa (%)	Massa Residual (%)	Classe de Degradação
0 – 10	90 - 100	Pouco degradante
11 - 24	76 - 89	Moderadamente degradante
25 - 44	56 - 75	Degradante
≥ 45	≤ 55	Altamente degradante

Fonte: Adaptada da ASTM D - 2017 (2005).

3.5 ANÁLISE QUÍMICA DA MADEIRA

Foram utilizados os corpos de prova que não foram submetidos ao ataque dos fungos, como padrão de comparação, e os corpos de prova em que os fungos isolados do campo causaram a maior perda de massa. Estes foram transformadas em serragem em moinho tipo Willey, sendo selecionada para o estudo a serragem que passou pela peneira de 40 e ficou retida na de 60 mesh, conforme a norma *Technical Association of Pulp and Paper Industry – TAPPI 257 om-92 (1992)*.

A determinação dos extrativos foi realizada segundo a norma TAPPI 264 om-88 (1992), sendo selecionada uma amostra de 2,0 gramas de serragem seca que foi submetida a três extrações em diferentes solventes. A primeira extração foi realizada com a mistura de etanol:tolueno na proporção 2:1 por 5 horas, posteriormente o material foi submetido à extração em etanol por 4 horas, e por último realizada a extração em água quente por uma hora. Finalizadas as extrações, o material foi levado a estufa e depois de seco, a massa foi determinada, sendo obtido o teor de extrativos por diferença de massa.

O procedimento descrito por Gomide e Demuner (1986) foi utilizado para a determinação da lignina insolúvel, sendo empregados 0,3 g do material do qual foi realizada a remoção dos extrativos. O material foi transferido para um tubo de ensaio e foram adicionados 3 mL de ácido sulfúrico (72%), e o conjunto foi posto em banho maria na temperatura de $30 \pm 0,2$ °C, durante uma hora, sendo agitados com frequência. Cada amostra foi diluída em 84 mL de água destilada e transferida para

um frasco hermeticamente fechado, que foi transferido para autoclave a 118 °C no período de uma hora.

As amostras foram filtradas em filtros de vidro, nos quais foi disposta uma camada de óxido de alumínio em fibras para aumentar a qualidade da filtração, lavadas com água destilada e postas em estufa para a secagem. A diferença entre a massa após disposição em estufa do filtro com o óxido de alumínio antes e depois de filtrada a amostra foi utilizada para a determinação do teor de lignina insolúvel em ácido a 72%.

Para determinação da fração solúvel de lignina o filtrado obtido foi diluído em um litro de água destilada e esta solução foi analisada em espectrofotômetro, conforme metodologia descrita por Goldshimid (1971). A fração total de lignina constitui a soma dos teores solúvel e insolúvel desta, e a porcentagem de holocelulose (celulose e hemicelulose) foi obtida por diferença em função dos valores de extrativos e lignina total.

3.6 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO POR FUNGOS EM TOCOS NO CAMPO

3.6.1 Localização e montagem do experimento

O experimento foi realizado no campo, em um povoamento de clone de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* localizado no Sítio Providência, zona rural do município de Jerônimo Monteiro – ES, e as descrições deste local estão contidas no item 3.1.1.

Para verificar o potencial degradador dos fungos selecionados foram utilizados os tocos remanescentes da primeira colheita do eucalipto sem sinais visuais de colonização fúngica. As árvores dos tocos remanescentes utilizadas haviam sido cortadas há 10 dias e os tocos tinham 7 anos de idade. No local de montagem do experimento havia sombreamento ocasionado pelas árvores do povoamento de eucalipto ao redor.

Os fungos utilizados neste experimento foram aqueles que apresentaram o melhor potencial degradador na avaliação da perda de massa no experimento da pré-seleção de fungos em laboratório.

As soluções dos fungos selecionados para o ensaio de campo foi preparada em câmara de fluxo laminar ao utilizar meio de cultura líquido de malte (20 g de malte em 1 litro de água destilada e esterilizada). Para cada solução foram adicionados 50 mL de cada fungo desenvolvido no meio de cultura sólido de malte-ágar. As soluções contendo os fungos ficaram armazenadas em sala climatizada (25 ± 2 °C e 65 ± 5 % de umidade relativa) por um período de 15 dias para haver o crescimento micelial do fungo na solução. Após o crescimento dos fungos nas soluções, as mesmas foram homogeneizadas em um agitador magnético e levadas ao campo. Foram utilizados 25 mL de solução em cada toco.

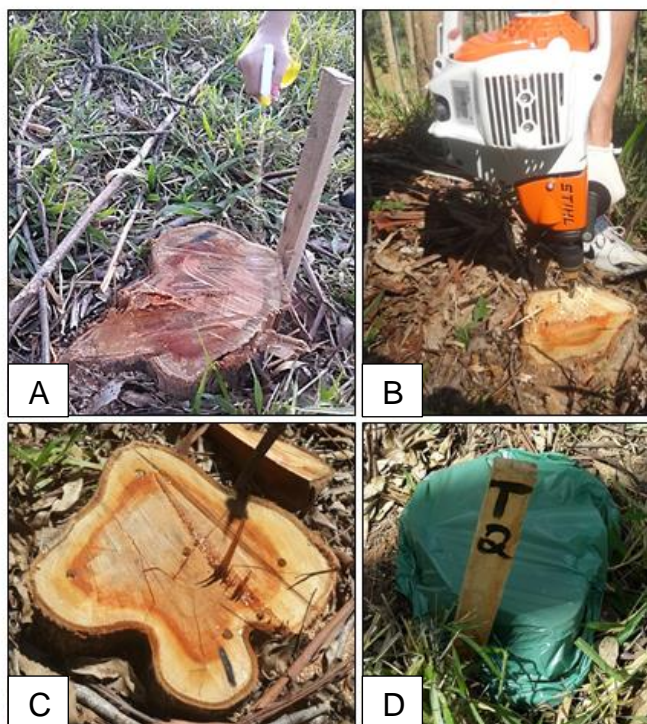
Foram testadas duas metodologias de inoculação do fungo, sendo estas realizadas por meio da pulverização dos fungos e a inoculação dos fungos em perfurações nos tocos. Além destas duas situações testadas, foram utilizados tocos cobertas e não cobertas com sacolas plásticas escuras, a fim de verificar o efeito da cobertura na perda de umidade e nas interferências externas do meio ambiente com o desenvolvimento do fungo (Figura 6D).

Para a inoculação dos fungos nos tocos, por meio da pulverização dos fungos, foi utilizado um borrifador e a solução dos fungos, em que foi pulverizada 25 mL desta solução em cada toco (Figura 6A).

Para a inoculação dos fungos, por meio das perfurações nos tocos, foi utilizado um perfurador de madeira (Figura 6B). A inoculação do fungo em perfurações nos tocos foi realizada ao perfurar cinco vezes o toco, sendo quatro orifícios distribuídos perpendicularmente no limiar entre o cerne e o alburno e um na porção central (Figura 6C). Em cada perfuração foi introduzida, com auxílio de uma seringa, 5 mL de solução com o fungo, totalizando 25 mL por toco.

Sendo assim, para cada fungo foram inoculadas 16 tocos, sendo oito tocos em cada metodologia de inoculação, as quais, quatro foram cobertas com sacola plástica e as outras quatro não foram cobertas. Na amostra controle foram utilizados oito tocos, sendo quatro não perfurados e quatro perfurados. E, desses quatro, dois tocos foram cobertos em cada situação citada.

Figura 6 – Etapas da montagem do experimento em campo, pulverização da solução fúngica nos tocos (A), perfuração do toco com auxílio do perfurador de madeira (B), toco perfurado (C) e tocos cobertos com sacola plástica (D).



3.6.2 Avaliação e análise dos resultados

Após quatro meses da inoculação, a degradação dos tocos foi avaliada com o auxílio de um penetrômetro de impacto (ANDRADE et al., 2012). Foi utilizado como parâmetro de degradação a resistência da madeira a penetração. Para tanto, foi medida a profundidade (cm) que a haste do penetrômetro perfurou no toco em função de um impacto realizado. Esta avaliação foi realizada em quatro pontos na superfície do toco, sendo três pontos distribuídos na região do limiar entre o cerne e albarno e um na porção central (Figura 7).

Figura 7 – Avaliação da profundidade de penetração utilizando o equipamento penetrômetro de impacto



Após quatro meses da inoculação, a deterioração dos tocos também foi avaliada por meio da velocidade de propagação das ondas de tensão, com um equipamento denominado Stress Wave Timer, que irá fornecer o tempo necessário para uma onda de tensão percorrer o toco.

Para a avaliação dos tocos foi utilizado o método de impacto com o martelo e o transdutor de chegada para aplicação das ondas de tensão. Efetuou-se a medição do tempo de propagação das ondas de tensão em diagonal (Figura 8).

Foram efetuadas seis medidas por árvore, sendo três em cada posição do martelo e do transdutor, para posterior cálculo da média. Ressalta-se que a casca foi retirada destes pontos para evitar interferência da mesma sobre a captação das ondas de tensão. A velocidade de propagação das ondas de tensão foi determinada por meio da Equação 1.

$$V = \frac{d}{t} \quad (1)$$

em que:

V: velocidade de propagação da onda de tensão (m/s);

d: distância entre o ponto de partida e o de chegada da onda de tensão (distância entre os transdutores) (m); e
t: tempo de propagação da onda de tensão (s).

Figura 8 – Avaliação da deterioração dos tocos utilizando o equipamento Stress wave timer.



Para avaliar a capacidade de deterioração dos fungos em campo por meio das metodologias testadas (pulverização, perfuração, tocos cobertos com sacolas plásticas e não cobertos) foi empregado delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial, em que foram avaliados os fungos testados (8 níveis) e as duas metodologias de inoculação e as duas condições de cobertura dos tocos testadas (4 níveis). Foi empregado o teste de Scott-Knott, em nível de 5% de significância para os fatores detectados como significativos pelo teste F.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FUNGOS ISOLADOS A PARTIR DOS TOCOS COLETADAS NO CAMPO

Os tocos deterioradas de eucalipto que foram coletadas no campo resultaram no isolamento de 66 culturas puras, sendo 26 originários da Fazenda Bananal do Sul, 25 do Sítio Cachoeira Bonita e 15 do Sítio Providência. Estes isolados foram avaliados quanto ao seu potencial degradador por meio do experimento de pré-seleção de fungos em laboratório.

4.2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DETERIORAÇÃO EM EXPERIMENTO DE PRÉ-SELEÇÃO DE FUNGOS

Das 66 culturas puras isoladas a partir dos tocos deterioradas de eucalipto 28 foram utilizadas para análise dos dados, por terem apresentado capacidade de deterioração, que foi avaliada em função da perda de massa dos corpos de prova. Dos 28 isolados, sete foram selecionados por serem os que causaram maior perda de massa, e dessa forma foram considerados potencialmente degradantes.

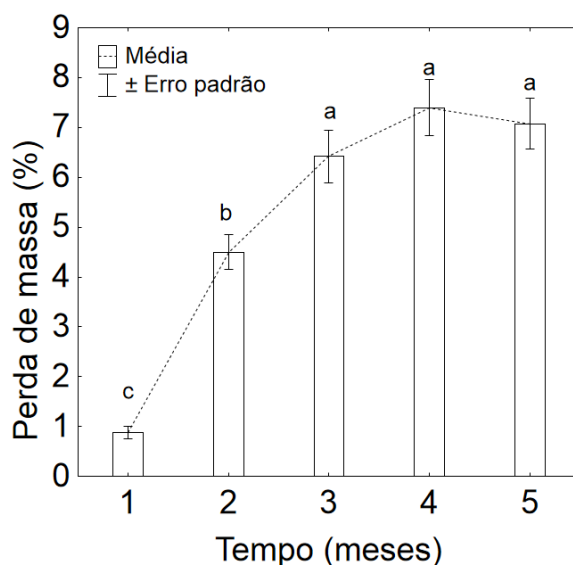
Os sete isolados selecionados foram provenientes das seguintes regiões: isolados 1 e 2 do Sítio Cachoeira Bonita; isolado 3 foi o obtido por Silva et al. (2014) na Fazenda São Sebastião, Córrego do Patrimônio distrito de Guaçuí, e foi citado pelos referidos autores como Basidiomiceto 1; isolado 4 do Sítio Providência; e isolados 5, 6 e 7 da Fazenda Bananal do Sul.

Com base nos resultados obtidos verifica-se que houve diferença significativa entre fungo, tempo e a interação fungo x tempo (Apêndice A, Tabela 1A).

Na Figura 9 observa-se o comportamento geral da perda de massa em cada mês de exposição ao ataque dos fungos. Pode-se observar, de forma geral, que

houve um aumento da perda de massa até o terceiro mês, e a partir deste, não houve diferença significativa em relação ao quarto e quinto mês. O decréscimo da perda de massa quinto mês se comparado com o quarto mês é explicado pelo fato das amostras que deram origem as médias de perda de massa de cada mês serem amostras montadas em diferentes placas de Petri, sendo assim esta redução pode ter sido influenciada pela variação do ataque de cada fungo em cada amostra.

Figura 9 – Perda de massa (%) em função dos meses de exposição ao ataque dos fungos.



A interação entre fungo e tempo foi desdobrada e a comparação entre as médias de perda de massa (%) realizada. A perda de massa observada no primeiro mês foi estatisticamente igual para todos os fungos, exceto para o fungo *P. placenta* e o fungo 7, em que foram obtidas as menores médias (Tabela 2).

Para o segundo mês o *G. trabeum* foi o fungo que obteve a melhor média, diferindo estatisticamente dos demais. Ainda em relação ao segundo mês, dentre os isolados obtidos no campo, os isolados 4 e 1 foram os que atingiram o segundo melhor desempenho, não diferindo estatisticamente do fungo *T. versicolor*, que obteve uma perda de massa 50% menor em relação ao *G. trabeum* (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação entre as médias da perda de massa dos corpos de prova em função do tempo e do fungo testado.

Fungo	Perda de massa (%)				
	Tempo (meses)				
	1	2	3	4	5
<i>T. versicolor</i>	1,72 aD	4,90 bC	15,45 aA	12,13 aB	10,11 bB
<i>G. trabeum</i>	0,66 aD	9,87 aB	12,62 aA	14,59 aA	6,57 cC
<i>P. placenta</i>	0,01 bD	2,73 cC	4,68 cC	11,79 aB	17,23 aA
1	1,22 aB	6,37 bA	6,31 bA	7,62 bA	9,06 bA
2	1,41 aC	3,29 cB	6,12 bA	3,70 cB	6,25 cA
3	0,50 aC	2,84 cB	5,60 bA	5,72 bA	5,48 cA
4	0,80 aB	7,07 bA	0,85 eB	5,98 bA	5,02 cA
5	0,93 aC	4,01 cB	6,35 bA	2,80 cB	3,11 dB
6	1,13 aD	2,58 cC	3,70 cB	8,14 bA	0,94 eD
7	0.39 bC	1.33 dC	2.49 dB	1.62 dB	6.88 cA

As médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$)

Nos terceiro e quarto meses os fungos *G. trabeum* e *T. versicolor* causaram maior perda de massa, diferindo estatisticamente dos demais. Ainda no quarto mês, o fungo *P. placenta* não diferiu dos fungos citados anteriormente. Neste mês, dentre os fungos que apresentaram estatisticamente o segundo melhor desempenho, o isolado 6 obteve a melhor média de perda de massa, que foi 44% menor em relação ao *G. trabeum* (Tabela 2).

No quinto mês foi possível constatar que o fungo *P. placenta* obteve a maior média de perda de massa, diferindo estatisticamente dos demais. Em relação aos isolados provenientes do campo, o fungo 1 se destacou em relação aos demais no quinto mês, não diferindo estatisticamente do fungo *T. versicolor* (Tabela 2).

Ao se analisar a perda de massa para cada fungo em função dos meses, foi possível notar que para o fungo *T. versicolor* a maior perda de massa alcançada foi no terceiro mês, diferindo estatisticamente dos demais meses subsequentes, em que foram obtidas as segundas maiores perda de massa, as quais resultaram numa redução da perda de massa, em relação ao terceiro mês, de 21,48 e 34,56% respectivamente. Este fato pode ser explicado em função do ensaio ter sido

desmontado em etapas, ao longo de cada mês, ou seja, as amostras que deram origem as médias de perda de massa de cada mês foram amostras montadas em diferentes placas de Petri, sendo assim esta redução pode ter sido influenciada pela variação do ataque de cada fungo nas repetições utilizadas (Tabela 2).

O fungo *G. trabeum* causou maior perda de massa no quarto mês, a qual foi estatisticamente igual ao observado no terceiro mês, sendo a perda de massa neste mês 13,5% menor em relação ao quarto mês. Em relação ao fungo *P. placenta* é possível observar o aumento da perda de massa em cada mês, atingindo um aumento 84,15% se comparado o segundo mês com o quinto mês. Contudo, no segundo e no terceiro mês as médias da perda de massa não diferiram estatisticamente entre si. Ainda em relação ao fungo *P. placenta*, a média alcançada no quinto mês foi a maior, em relação a todos os fungos e a todos os meses de exposição aos fungos (Tabela 2).

Ao analisar a perda de massa dos fungos isolados em função dos meses, observa-se que para o isolado 1 a maior média foi atingida no quinto mês, o qual não diferiu estatisticamente das médias do segundo, terceiro e quarto meses, e estas foram 29,69%; 30,35%; 18,89%, respectivamente, menores em relação ao quinto mês. O isolado 2 causou maior média de perda de massa no quinto mês, e não diferiu estatisticamente da perda de massa no terceiro mês, sendo esta 2,08% menor em relação ao quinto mês. O comportamento do isolado 3 em função da perda de massa foi homogêneo durante os três últimos meses, não diferindo estatisticamente entre si (Tabela 2).

Monteiro e Freitas (1997) e Andrade et al. (2012) testaram de forma similar, em placa de Petri e meio de cultura. No estudo de Andrade et al. (2012), foi avaliada a capacidade de deterioração de fungos isolados a partir de tocos de eucaliptos no campo. Os corpos de prova apresentavam dimensões de 8 x 8 x 2 mm e foram retirados da linha de intersecção alburno / cerne. Os fungos isolados do campo, *Polyporus guianensis*, *Pycnoporus sanguineus* e *Ganoderma applanatum*, causaram degradação de 0,03; 29 e 34%, respectivamente, após oito semanas de exposição.

No trabalho de Monteiro e Freitas (1997), foi testada a resistência da madeira de aroeira, angico-preto, jatobá, peróba-rosa e pinho-do-paraná ao fungo *Gloeophyllum trabeum*. Após oito semanas de exposição dos corpos de prova ao

fungo, estes tiveram uma perda de massa de 3,94; 4,24; 3,40; 3,82; 24,91% para as madeiras de aroeira, angico-preto, jatobá, peroba-rosa e pinho-do-paraná, respectivamente.

É possível afirmar, com base no trabalho desenvolvido e nos trabalhos citados anteriormente, que este método alternativo de apodrecimento acelerado proporcionou resultados confiáveis para a pré-seleção dos isolados testados, além de ser uma metodologia mais rápida se comparada com os outros métodos, permitindo assim que os fungos selecionados sejam testados em metodologias de eficácia comprovada como a da ASTM D-2017 (2005).

4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO

Os isolados 2, 4 e 7 foram identificados como *Resinicium confertum*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Trichoderma citrinoviride*, respectivamente, e os demais isolados estão em processo de identificação.

O fungo *Resinicium confertum*, pertencente ao filo Basidiomycota, possui poucos registros na literatura quanto ao potencial de degradação de madeira. O fungo *Resinicium bicolor*, pertencente ao mesmo gênero do fungo identificado, é citado por causar podridão branca na madeira (NAKASONE, 2007; TOLJANDER; HOLMER; HÖGBERG, 2006).

O fungo *Phanerochaete chrysosporium*, pertencente ao filo Basidiomycota, é classificado como fungo de podridão branca, sendo caracterizado pela seletividade a lignina na madeira, promovendo sua despolimerização (DUTTON et al., 1993; PANDEY; PITMAN, 2003; SINGH; CHEN, 2008).

O fungo *Trichoderma citrinoviride* pertence ao filo Ascomycota e o gênero *Trichoderma* é classificado como causador de podridão (KOYANI; SANGHVI; RAJPUT, 2011). Este gênero é comumente encontrado no solo e em madeira em decomposição (JELENÍ et al., 2013). De acordo com Shrestha et al. (2009), os fungos deste gênero são referenciados por causar podridão mole na madeira, e

possuem limitado potencial de degradação na madeira quando não utilizados em situações de elevada umidade. Segundo Koyani, Sanghvi e Rajput (2011) a madeira de *Azadirachta indica* teve 43% de perda de massa após 120 dias de exposição ao fungo *Trichoderma harzianum*.

4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DETERIORAÇÃO EM EXPERIMENTO DE APODRECIMENTO ACELERADO EM LABORATÓRIO

No experimento de pré-seleção sete isolados apresentaram potencial de degradação e estes isolados foram utilizados no experimento de apodrecimento acelerado em laboratório a fim de comprovar a degradação por meio de um experimento com comprovada eficiência e norma reconhecida.

Com base nos resultados obtidos na análise de variância dos fatores, observa-se que houve diferença significativa entre fungo, posição da madeira e a interação fungo x posição da madeira (Apêndice B, Tabela 2B). Posteriormente, a interação foi desdobrada e realizada a comparação entre as médias de perda de massa (%) (Tabela 3).

Quando se compara a perda de massa de cada fungo entre as posições testadas, os fungos *Gloeophyllum trabeum*, *Postia placenta*, *Polyporus fumosus* e *Phanerochaete chrysosporium* não diferiram estatisticamente entre as posições da madeira, indicando que as diferentes posições não influenciaram a degradação por estes fungos (Tabela 3). No entanto, para o isolado 3 todas as posições da madeira influenciaram na degradação pelo fungo, sendo a posição de transição entre cerne e alburno a que obteve maior perda de massa, seguida das demais posições, cerne intermediário e interno, tendo estas uma redução da degradação de 44,31% e 57,88% em relação a posição de transição entre cerne e alburno (Figura 10).

Tabela 3 – Comparação entre as médias da perda de massa em função da posição na madeira e do fungo testado e as suas respectivas classes de degradação.

Fungo	Perda de massa (%)					
	Posição na madeira					
	Transição Cerne/alburno	Classe degrad.	Cerne Intermediário	Classe degrad.	Cerne interno	Classe degrad.
<i>G. trabeum</i>	32,62 aA	D	31,84 aA	D	37,02 aA	D
<i>P. placenta</i>	32,77 aA	D	33,46 aA	D	34,63 aA	D
<i>P. fumosus</i>	20,25 bA	MD	17,31 bA	MD	19,76 bA	MD
3	28,52 aA	D	15,88 bB	MD	12,01 cC	MD
<i>P. chrysosporium</i>	11,30 cA	MD	10,31 cA	PD	11,14 cA	MD
5	10,20 cA	PD	2,57 dB	PD	3,06 dB	PD
<i>T. citrinoviride</i>	7,41 dA	PD	2,67 dB	PD	2,10 dB	PD
<i>R. confertum</i>	5,73 dA	PD	2,48 dB	PD	2,62 dB	PD
6	0,69 eA	PD	0,97 eA	PD	0,41 eA	PD
1	0,55 eA	PD	0,27 eA	PD	0,79 eA	PD

As médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$). Em que: PD - Pouco Degradante; MD - Moderadamente Degradante; D – Degradante, de acordo com a Tabela 1.

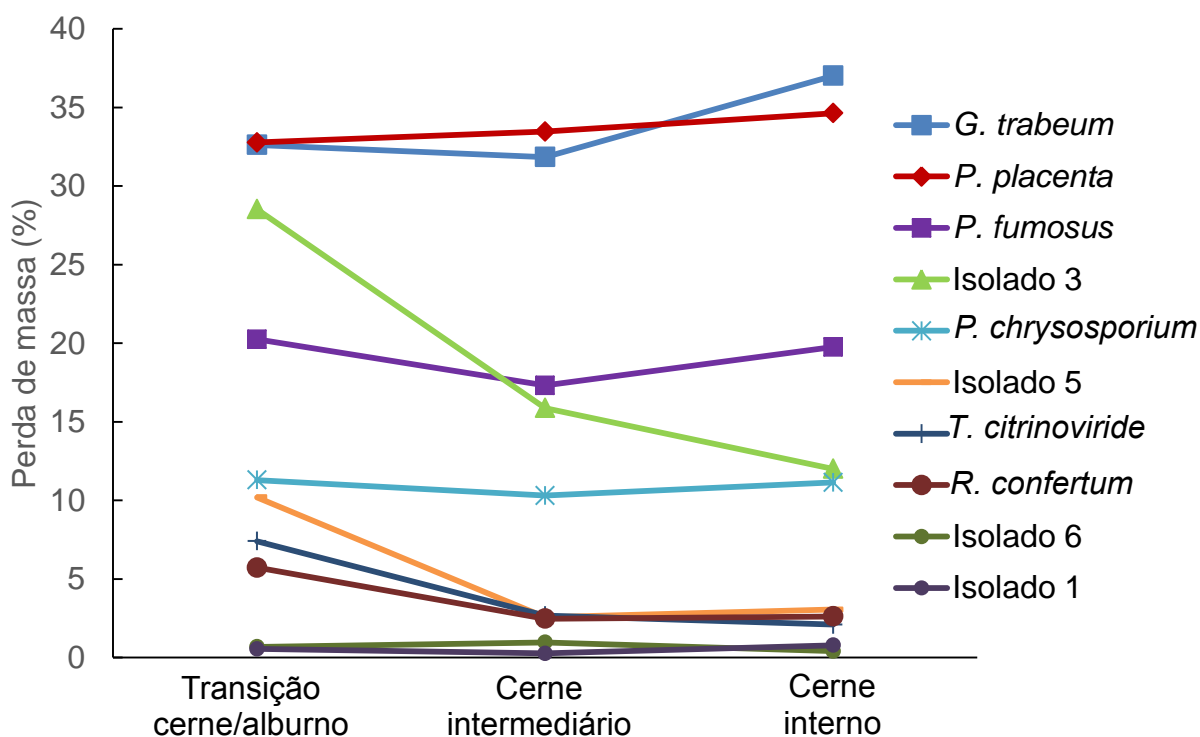
Os fungos 5, *Trichoderma citrinoviride*, *Resinicium confertum* apresentaram diferença estatística entre a posição de transição entre cerne e alburno e as demais posições (Figura 10). Porém, as posições cerne intermediário e interno não diferiram para estes fungos (Tabela 3).

Nos trabalhos realizados por Paes (2002) e Paes, Melo e Lima (2007), notou-se a influência da posição da madeira na degradação pelo fungo. De acordo com estes autores é possível afirmar, de forma geral, que a degradação por fungos xilófagos é maior nas partes mais externas da madeira, que contem alburno.

Ao analisar a perda de massa na posição de transição entre cerne e alburno, é possível observar que esta foi estatisticamente igual para os fungos *Gloeophyllum trabeum*, *Postia placenta* e o fungo 3 isolado no campo por Silva et al. (2014) (Tabela 3). A perda de massa causada pelo fungo 3 torna-o um fungo promissor na degradação de tocos no campo, pelo fato deste ter causado perda de massa semelhante aos fungos que tem seu potencial degradante reconhecidos, como *G. trabeum*, *P. placenta*. No trabalho de Silva et al. (2014) a perda de massa média alcançada pelo fungo 3 para as madeiras de alburno testadas foi de 28,43%, sendo este valor semelhante ao encontrado neste trabalho.

Ainda nesta posição o fungo *Polyporus fumosus* (20,25%) obteve o segundo melhor desempenho com a quarta maior perda de massa, diferindo estatisticamente dos fungos citados anteriormente e dos demais. Entre os isolados neste estudo, os fungos *Phanerochaete chrysosporium* e 5 foram os que obtiveram o melhor desempenho e não diferiram estatisticamente entre si, tendo a perda de massa destes sido 65,51% e 68,87% menor quando comparada com a perda de massa provocada pelo *P. placenta* (Tabela 3).

Figura 10 – Variação das médias da perda de massa em função da posição na madeira e do fungo testado



Ao analisar a perda de massa na posição cerne intermediário, é possível observar que os fungos *G. trabeum* e *P. placenta* mais uma vez causaram a maior perda de massa, diferindo dos demais. O fungo *P. fumosus* e o isolado 3 não diferiram entre si, porém diferiram da perda de massa provocada pelo isolado *P. chrysosporium*. Comparando-se a perda de massa do isolado 3 com o fungo *P. chrysosporium*, tem-se uma redução 35,07% no potencial de degradação. A perda de massa provocada pelo *P. fumosus* e o isolado 3 foi em média 50% menor se comparada com o fungo *P. placenta* (Tabela 3).

Na posição cerne interno da madeira, os fungos *G. trabeum* e *P. placenta* causaram as melhores médias, seguido pelo fungo *P. fumosus*, e este diferiu estatisticamente dos que foram citados anteriormente. A perda de massa dos fungos 3 e *P. chrysosporium* isolados a partir de tocos do campo, não diferiram entre si, sendo a média do isolado *P. chrysosporium* apenas 7,24% menor se confrontada com o isolado 3 (Tabela 3). A perda de massa média alcançada pelo fungo 3 por Silva et al. (2014), para as madeiras de cerne testadas, foi de 5,48%, sendo este um valor abaixo do encontrado neste trabalho.

Assim como o isolado 3, o fungo *P. chrysosporium* também possui potencial de degradação, pelo fato das médias da perda de massa não terem grandes variações entre as diferentes posições das madeiras. Como citado anteriormente, a perda de massa na posição cerne interno foi estatisticamente igual ao fungo 3 (Tabela 3).

Verificou-se ainda que os fungos *P. placenta* e *G. trabeum* foram classificados como degradante em todas as posições da madeira. O isolado 3, só foi considerado degradante na posição de transição entre cerne e alburno, sendo nas outras posições classificado como moderadamente degradante. O fungo *P. fumosus* foi classificado em todas as posições como moderadamente degradante, e o fungo *P. chrysosporium* também obteve tal classificação para a posição de transição entre cerne e alburno e no cerne interno, tendo recebido a classificação de pouco degradante na posição no cerne intermediário. O fungo *Trichoderma citrinoviride* e os demais isolados foram classificados como pouco degradante (Tabela 3). A pouca degradação causada pelo fungo *T. citrinoviride* pode ser explicada pelo fato do ensaio que foi realizado ser específico para fungos de podridão parda e branca, porém os fungos deste gênero são relatados na literatura como fungo de podridão mole (SHRESTHA et al., 2009). Assim, seria necessário realizar um ensaio específico para fungos de podridão mole a fim de obter a real capacidade de degradação deste fungo.

4.5 ANÁLISE QUÍMICA DA MADEIRA

Os resultados da análise química realizada com os corpos de prova deteriorados e que causaram a maior perda de massa pelos fungos, no experimento de apodrecimento acelerado em laboratório, indicaram que houve alteração da composição química em função dos fungos e das posições da madeira testadas (Tabela 4).

Nas amostras controle, a maior proporção de extrativos foi obtido na posição da madeira de transição entre cerne e alburno, isto está de acordo com Hillis (1971), que afirma que a maior quantidade de extrativos é encontrada na zona de transição entre cerne e alburno em razão da recente alteração bioquímica das substâncias de reserva nesta zona (Tabela 4).

É possível observar um aumento dos extrativos totais nas amostras atacadas pelos fungos 3, *P. chrysosporium* e 5, na posição da madeira de transição entre cerne e alburno, quando comparado à amostra controle (Figura 11). O aumento da proporção de extrativos totais de, em média 24,3%, pode ser justificado em função dos fungos terem sido os que causaram a maior perda de massa nos corpos de prova, ocasionando maior quebra nos constituintes da madeira, elevando assim a solubilidade dos componentes principais da madeira.

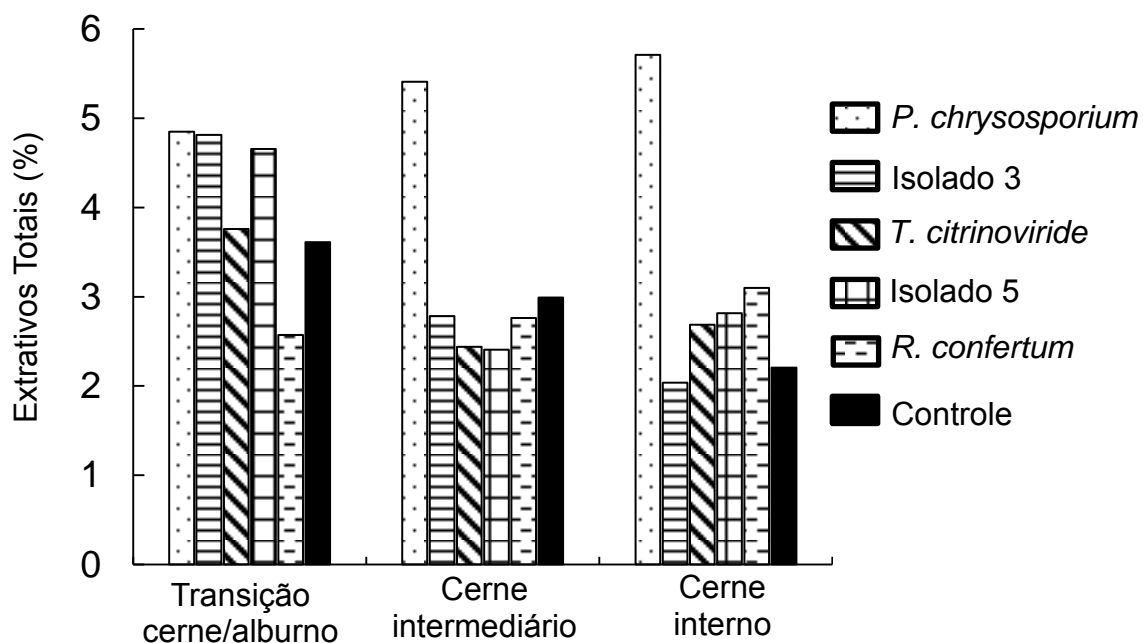
De acordo com Guilmo, Auer e Barrichelo (1993; 1998), a degradação biológica da madeira, além de produzir alterações na constituição primária da madeira, pode ter como consequência a elevação do teor de extrativos solúveis em função do aumento de açúcares livres, ocasionado pela ação enzimática na hemicelulose pelos fungos. De acordo com os autores, este aumento pode variar com o nível de deterioração alcançada e os tipos de fungos testados. Silva et al. (2014) também encontraram aumento dos extrativos da madeira em função do ataque fúngico e atribuiu este fato a quebra nos constituintes da parede celular tornando maior a solubilidade dos extrativos nos reagentes empregados.

Tabela 4 – Composição química dos corpos de prova após ataque dos fungos em ensaio de apodrecimento acelerado em laboratório.

Fungo	Posição na madeira	Perda de Massa (%)	Extrativos Totais (%)	Lignina Total (%)	Holocelulose (%)
<i>Resinicium confertum</i>	Transição Cerne/alburno	5,73	2,57 (0,02)*	28,37 (0,39)	70,34 (1,43)
	Cerne intermediário	2,48	2,76 (0,05)	32,18 (2,06)	65,06 (2,10)
	Cerne interno	2,62	3,10 (0,03)	32,47 (0,28)	64,43 (0,31)
3	Transição Cerne/alburno	28,52	4,82 (0,67)	28,48 (0,33)	66,71 (1,00)
	Cerne intermediário	15,88	2,78 (0,03)	32,08 (0,18)	65,14 (0,15)
	Cerne interno	12,01	2,04 (0,30)	30,67 (0,30)	67,30 (0,61)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Transição Cerne/alburno	11,30	4,85 (0,42)	27,65 (0,47)	67,50 (0,05)
	Cerne intermediário	10,31	5,41 (0,56)	29,92 (1,75)	64,67 (2,22)
	Cerne interno	11,14	5,71 (0,42)	30,97 (0,18)	63,32 (0,38)
5	Transição Cerne/alburno	10,20	4,66 (0,07)	30,06 (1,13)	65,28 (1,20)
	Cerne intermediário	2,57	2,41 (0,49)	32,61 (0,65)	64,98 (0,16)
	Cerne interno	3,06	2,81 (0,22)	31,57 (0,28)	65,61 (0,49)
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	Transição Cerne/alburno	7,41	3,76 (0,04)	29,31 (0,23)	66,93 (0,20)
	Cerne intermediário	2,67	2,44 (0,40)	34,06 (1,31)	63,50 (1,70)
	Cerne interno	2,10	2,69 (0,49)	32,73 (1,89)	64,58 (2,38)
Controle	Transição Cerne/alburno	—	3,61 (0,67)	31,86 (1,96)	64,53 (2,62)
	Cerne intermediário	—	2,99 (0,15)	31,71 (0,89)	65,30 (0,75)
	Cerne interno	—	2,21 (0,19)	33,03 (0,03)	64,63 (0,02)

* Números entre parênteses representam o desvio padrão da média.

Figura 11 – Teor de extrativos totais nos corpos de prova de madeira após ataque dos fungos.

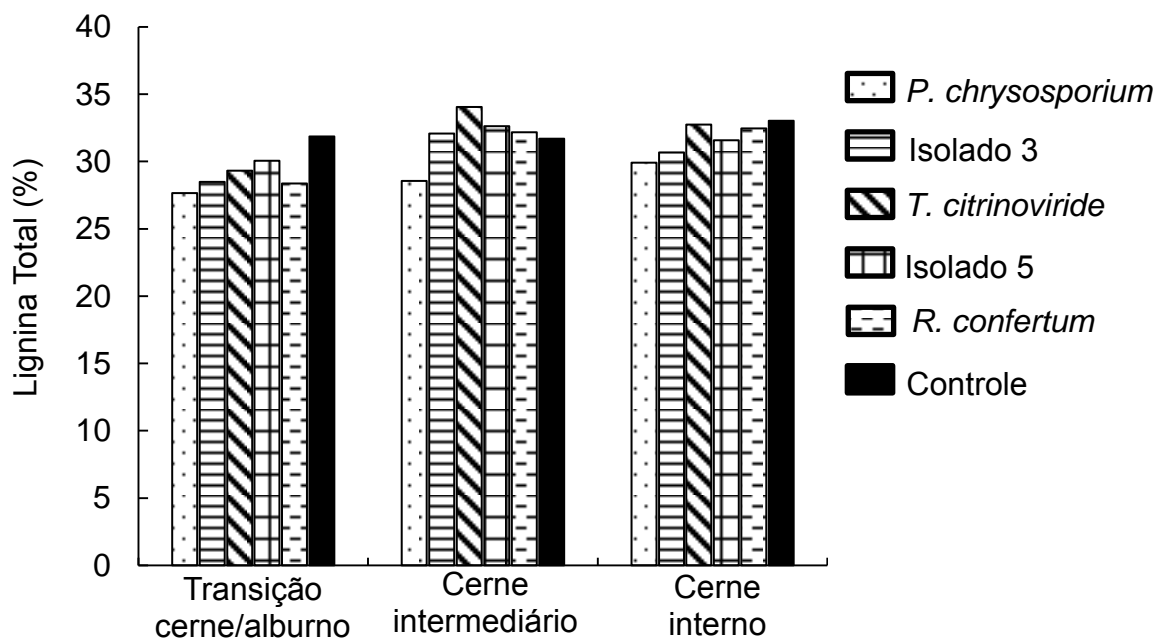


Nas posições cerne intermediário e interno as alterações dos extrativos totais provocadas pelos fungos foram menores quando comparadas com a amostra controle, tal fato pode ser justificado em razão destas posições, de modo geral, terem as menores perda de massas, com exceção do fungo *P. chrysosporium* que provocou aumento no teor de extrativos nessas posições (Tabela 4). Como foi apresentado na Tabela 3, onde constam os resultados do experimento de apodrecimento acelerado em laboratório, o fungo *P. chrysosporium* foi o único em que as diferentes posições não influenciaram a degradação, portanto pode-se afirmar que o comportamento no fungo *P. chrysosporium* com relação aos extrativos, foi semelhante nas diferentes posições testadas.

Em relação à lignina total não houve variação entre as posições testadas na amostra controle. Para as madeiras atacadas pelos fungos, de modo geral, houve uma diminuição da lignina total na região de transição entre cerne e alburno, em razão da maior perda de massa ocorrida nesta região (Figura 12). Os menores valores do teor de lignina total foram encontrados para as amostras atacadas pelos fungos *Resinicium confertum*; 3; e *P. chrysosporium*, com reduções de 10,95; 10,61; e 13,21% respectivamente, quando comparado as amostras controle. Já os fungos 5

e *Trichoderma citrinoviride* produziram reduções de 5,70 e 7,81% no teor da lignina das amostras (Tabela 4).

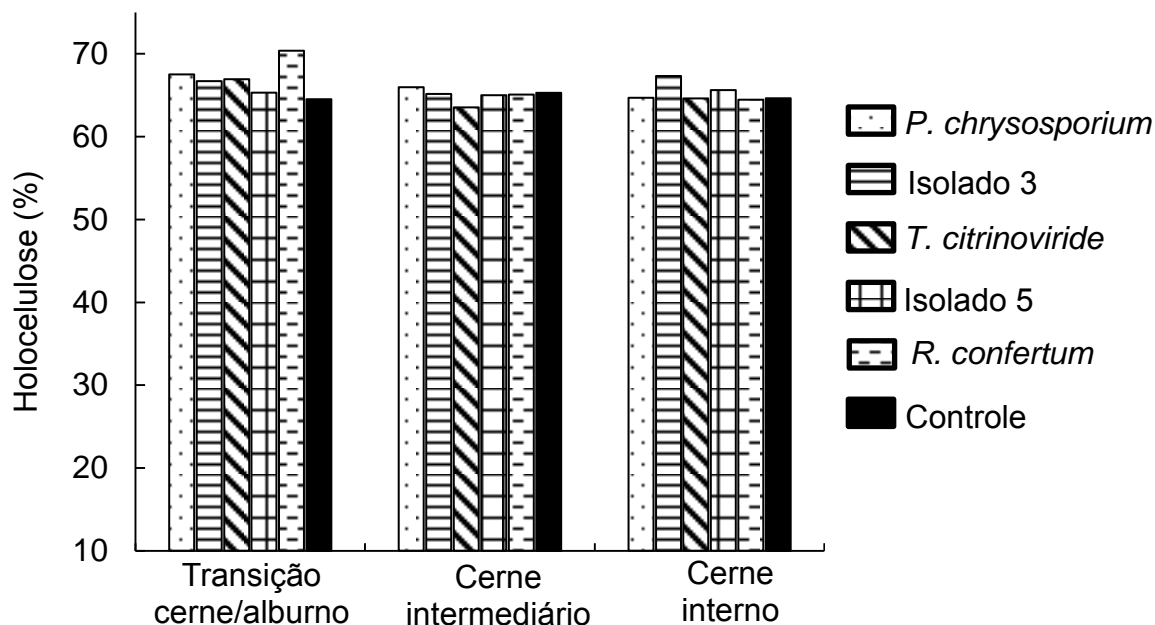
Figura 12 – Teor de lignina total nos corpos de prova de madeira após ataque dos fungos.



No estudo realizado por Silva et al. (2014), foi avaliada a análise da influência de dois basidiomicetos isolados de tocos deterioradas no campo. Estes fungos foram testados em madeira do clone de *E. grandis* x *E. urophylla* com idade variando entre 5 e 6 anos, nesta madeira a redução de lignina foi de, aproximadamente, 10% para a região do alburno e 2% para a região do cerne.

Não foram observadas reduções no teor de holocelulose em comparação com as amostras controle, indicando a seletividade ou preferência dos fungos isolados pela lignina (Figura 13). De acordo com Ferraz et al. (2007), fungos com essa preferência podem ser usados na biopolpação, que consiste em submeter os cavacos de madeira, utilizados na indústria de celulose, à biodegradação por um fungo seletivo a degradação de lignina. Este pré-tratamento biológico, aumenta a susceptibilidade da lignina à solubilização pelos licores de polpação, facilita o desfibramento e refino da polpa, resultando em economia de reagentes e,ou, energia.

Figura 13 – Teor de holocelulose nos corpos de prova após ataque dos fungos.



4.6 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO POR FUNGOS EM TOCOS NO CAMPO

4.6.1 Avaliação da degradação com penetrômetro de impacto

É possível observar na análise de variância que houve diferença significativa apenas para os fungos testados e a interação fungo x tratamento (Apêndice C, Tabela 3C). A interação foi desdobrada e realizada a comparação entre as médias da penetração (cm) produzida pelo penetrômetro de impacto (Tabela 5).

Na comparação entre as médias da penetração alcançada entre os fungos testados é possível observar que para o tratamento em que os fungos foram inoculados nos tocos perfuradas e com cobertura, somente os fungos 3, 5 e *Trichoderma citrinoviride*, proporcionaram médias de penetração significativamente superiores às da amostra controle, não diferindo entre si. Para estes fungos a penetração alcançada nos tocos foi 5, 10 e 10% superior aos tocos sem a inoculação de fungos (Tabela 5).

Tabela 5 – Comparação entre as médias da penetração em função dos fungos testados e dos tratamentos.

Fungo	Penetração (cm)			
	Tratamentos			
	Inoculação dos fungos por perfuração		Inoculação dos fungos por pulverização	
	Com cobertura	Sem cobertura	Com cobertura	Sem cobertura
1	1,11 bB	1,05 bB	1,25 aA	1,26 aA
<i>R. confertum</i>	1,18 bA	1,11 bA	1,26 aA	1,18 aA
3	1,23 aA	1,30 aA	1,26 aA	1,20 aA
<i>P. chrysosporium</i>	1,15 bB	1,15 bB	1,34 aA	1,25 aA
5	1,30 aA	1,21 aB	1,14 bB	1,18 aB
6	1,21 bA	1,21 aA	1,10 bA	1,12 aA
<i>T. citrinoviride</i>	1,30 aA	1,17 aB	1,06 bB	1,27 aA
Controle	1,17 bA	1,21 aA	1,27 aA	1,26 aA

As médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p > 0,05$).

Já para o mesmo tratamento citado anteriormente, porém sem a utilização de cobertura nos tocos, a maior profundidade alcançada pelo penetrômetro foi nos tocos inoculadas com o fungo 3. Apesar de não diferir significativamente da amostra controle, a profundidade alcançada foi 6,92% superior. Semelhante a observação anterior, nos tratamentos em que os fungos foram inoculados nos tocos por pulverização, para as situações com ou sem cobertura, as maiores médias de penetração para os fungos testados não diferiram das amostras controle (Tabela 5).

Na comparação entre as médias da penetração alcançada para cada fungo com os tratamentos empregados é possível observar que para os fungos 1 e *P. chrysosporium* as maiores médias alcançadas foram no tratamento de inoculação nos tocos por pulverização, sendo estas semelhantes estatisticamente. Estas médias foram aproximadamente de 13,94% (fungo 1) e 11,19% (*P. chrysosporium*) maiores quando comparadas às médias do tratamento de inoculação por perfuração (Tabela 5). Uma possibilidade para ocorrência de tal fato pode ser explicada pela solução fúngica pulverizada ter abrangido maior área de contato nos tocos, enquanto a solução fúngica inoculada em perfurações ficou concentrada próxima aos orifícios.

Ainda nesta mesma comparação, para os fungos *Resinicium confertum*, 3, 6 e a amostra controle não houve diferença estatística entre os tratamentos testados.

Para o fungo 5 o tratamento de inoculação nos tocos por perfurações com cobertura obteve a maior média diferindo dos demais tratamentos empregados, sendo este em média 9,48% maior que os demais. Em relação ao fungo *T. citrinoviride*, os tratamentos de inoculação nos tocos por perfurações com cobertura e a inoculação por pulverização sem cobertura foram estatisticamente iguais e diferiram dos outros tratamentos (Tabela 5).

Esperava-se que independente do tratamento, houvesse menor resistência ao impacto, em comparação com a amostra controle, para as situações em que os tocos foram cobertos, pelo fato da cobertura proporcionar uma condição com menos interferências com o meio ambiente, facilitando o desenvolvimento dos fungos. No entanto este fato só foi observado em tocos perfurados e inoculados com os fungos 3, 5 e *T. citrinoviride*.

Andrade et al. (2012) ao utilizarem fungos isolados para avaliar a deterioração dos tocos no campo por meio da utilização do penetrômetro de impacto, observaram que os tocos inoculadas com o fungo *Pycnoporus sanguineus*, reconhecido pela sua capacidade de degradação, apresentaram resultados semelhantes aos tocos controle. Porém, quando foi utilizada cobertura nos tocos, este fungo e os demais utilizados foram capazes de reduzir a resistência dos tocos ao impacto provocado, indicando que a utilização da cobertura proporcionou um ambiente favorável ao desenvolvimento dos fungos.

4.6.2 Avaliação da degradação com Stress Wave Timer

É possível observar na análise de variância que não houve diferença significativa entre fungo, tratamento e a interação fungo x tratamento (Apêndice D, Tabela 4D). Na Tabela 6 constam os valores das médias da velocidade da propagação das ondas (m/s) produzidas pelo Stress Wave Timer.

Tabela 6 – Comparação entre as médias da velocidade da propagação das ondas em função dos fungos e dos tratamentos testados.

Fungo	Velocidade (m/s)			
	Tratamentos			
	Inoculação dos fungos por perfuração		Inoculação dos fungos por pulverização	
	Com cobertura	Sem cobertura	Com cobertura	Sem cobertura
1	348,34 (27,55)	310,69 (61,62)	347,46 (10,74)	310,80 (55,50)
<i>R. confertum</i>	295,72 (62,81)	346,98 (88,56)	302,30 (19,45)	324,97 (36,18)
3	304,90 (15,75)	320,63 (25,47)	308,72 (25,40)	337,66 (19,14)
<i>P. chrysosporium</i>	319,32 (6,89)	342,69 (59,50)	289,85 (38,47)	313,24 (95,06)
5	365,73 (54,97)	377,99 (68,08)	364,50 (43,47)	301,48 (33,25)
6	279,57 (23,47)	292,63 (22,73)	291,85 (16,48)	332,22 (66,21)
<i>T. citrinoviride</i>	321,58 (34,87)	295,55 (28,68)	360,35 (61,92)	292,75 (46,34)
Controle	374,27 (25,39)	287,73 (2,40)	364,70 (92,66)	340,06 (40,66)

* Números entre parênteses representam o desvio padrão da média.

De modo geral, apesar da presença da colonização dos fungos nos tocos (Figura 14), as alterações provocadas, em função dos tratamentos testados, variaram pouco com as alterações provocadas nos tocos controle. Esperava-se que a deterioração dos tocos inoculados fossem superiores a deterioração dos tocos controle após os quatro meses de exposição aos fungos, e que esta degradação fosse confirmada pela maior velocidade de propagação das ondas tensão produzida pelo Stress Wave Timer (Figura 15).

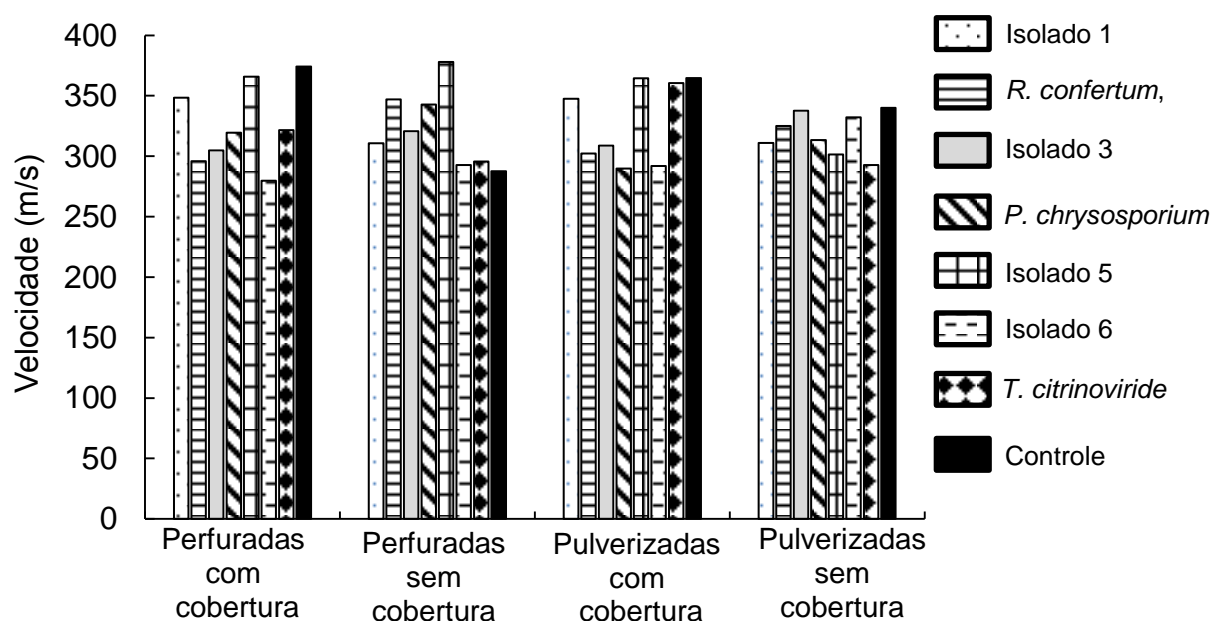
De acordo com Teles (2014), o método de ondas de tensão é capaz de detectar as alterações sensíveis provocadas na madeira em função da deterioração causada por fungos apodrecedores.

A velocidade de propagação das ondas na madeira atacada tende a ser superior ao observado em madeiras sadias, pois ao se propagar pela madeira, esta se move ao longo do tecido deteriorado e nos espaços vazios da madeira, determinando sua condição interna. Deste modo, o aumento da velocidade de propagação reflete diretamente na diminuição da resistência mecânica da madeira, indicando o aumento da deterioração (ZABEL; MORRELL, 1992; TELES, 2014).

Figura 14 – Sinais de colonização fúngica nos tocos inoculadas.



Figura 15 – Comparação entre as médias da velocidade de propagação das ondas em função dos fungos e dos tratamentos.



Segundo Reis e Reis (1997) e Coder (2003), o toco remanescente por ser um material biológico está sujeita a variação de suas propriedades de resistência à deterioração, variando em função das condições edafoclimáticas e características da madeira. A mortalidade dos tocos tem fundamental importância no seu processo de deterioração, e pode estar ligada ao período de exploração florestal. Os autores enfatizam que em solos mais pobres e períodos de seca a redução do vigor dos tocos remanescentes é mais intenso.

Reis e Reis (1997) destacam ainda que, o vigor dos tocos pode perdurar após a derrubada da árvore e desta forma a atividade fisiológica permanece nos tocos, induzindo o processo de brotação. Durante a atividade fisiológica ainda estão presentes uma série de mecanismos de defesa que podem atuar e retardar a surgimento de pragas e o avanço da deterioração até redução do vigor fisiológico dos tocos (CODER, 2003).

Pôde-se observar que durante o período de duração do experimento, independente dos tratamentos testados, a presença de brotação em alguns tocos, indicando o vigor fisiológico dos mesmos. Em função dos fatos expostos acima, isto pode ter comprometido o desenvolvimento e o avanço da deterioração das mesmas, sendo necessário um maior tempo do empregado nesta pesquisa para que houvesse a redução do vigor dos tocos e o avanço da deterioração.

5 CONCLUSÕES

O isolamento de fungos a partir de tocos no campo permitiu isolar fungos com potencial de degradação nas madeiras testadas e os que causaram maior degradação na madeira foram os fungos 3, *P. chrysosporium* e 5.

O método adotado no ensaio de pré-seleção de fungos em placas de Petri possibilitou, de forma mais simples, selecionar os fungos com maior potencial de degradação de madeira, a serem utilizados no ensaio de apodrecimento acelerado e ensaio de degradação de tocos no campo.

No ensaio de apodrecimento acelerado os fungos selecionados promoveram maior degradação da madeira do que no ensaio de pré-seleção de fungos, indicando sua real capacidade de degradação em função das diferentes posições testadas. Neste ensaio as posições da madeira causaram influencia na degradação dos fungos e a posição da madeira mais degradada foi a região de transição entre cerne e alburno.

Na análise química da madeira deteriorada foi determinado, de maneira geral, a maior preferência dos fungos pela lignina na posição da madeira mais consumida (transição entre cerne e alburno), indicando a preferência dos fungos por este constituinte.

Após o tempo de exposição aos fungos, no ensaio de degradação de tocos no campo foi possível verificar a presença de fungos na madeira, porém a degradação por estes teve pouca variação em relação aos tocos que não foram inoculados. Como sugestão para futuros trabalhos recomenda-se a aplicação de um produto químico que seja capaz de cessar a atividade fisiológica dos tocos para que sejam posteriormente inoculados os fungos, assim como maior tempo de exposição dos tocos ao fungo inoculado para avaliar a deterioração

6 REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 382 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.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – **ASTM D-2017**: standard method of accelerated laboratory test of natural decay resistance of woods. Annual Book of ASTM Standard, Philadelphia, 2005, 5p.

ANDRADE, F. A. **Degradação de tocos de *Eucalyptus grandis* por fungos**. 2003. 76 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2003.

ANDRADE, F. A. et al. Selection of fungi for accelerated decay in stumps of *Eucalyptus* spp. **Bioresource Technology**, Raleigh, v. 110, p. 456–461, 2012.

BIERMANN, C. J. **Handbook of pulping and papermaking**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1996. 764 p.

BRITO, J. O.; BARRICHELO, L. E. G.; GUTIERREZ, L. E. Qualidade do breu e terebintina de pinheiros tropicais. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Piracicaba, n.21, p.55-63, 1980.

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.

CHANDLER, D.; HANSON, R. **Brazilian experiences in production of *Eucalyptus* for energy**. Brasília: Winrock International, 1998. 148 p.

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.

CLAUSEN, C. A. Biodeterioration of wood. In: ROSS, R.J. **Wood handbook: wood as an engineering material**. 100.ed. Madison: USDA, 2010. p.312-327.

CODER, K. D. **Accelerating stump decay processes**. Urban forestry south. 2003. Disponível em:
<http://www.urbanforestrysouth.org/resources/library/citations/Citation.2004-05-28.1315/fss_get/file>. Acesso em: 25 out. 2014.

COUTO, L. et al. **Tyrex inova colheita de tocos de eucalipto para a produção de biomassa no Brasil...** 2º Anuário Brasileiro das Indústrias de Biomassa e Energias Renováveis, 2013/2014. Disponível em: <http://issuu.com/anuariobiomassa/docs/anuario_biomassa_e_energias_renovav/99>. Acesso em: 4 dez. 2014.

CRISTINA, K. Melhoria de essências florestais. **Revista da madeira**. 2004 Disponível em: <http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=598> Acesso em: 25 jul. 2014.

DEDECEK, R. A.; GAVA, J. L. Influência da compactação do solo na produtividade da rebrota de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.3, p.383-390, 2005.

DUTTON, M. V. et al. Oxalate production by Basidiomycetes, including the white-rot species *Coriolus versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v. 39, n. 1, p. 5-10, 1993.

FERRAZ, A. et al. Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v. 43, n. 2, p. 178-185, 2008.

GOLDSHIMID, O. Ultraviolet spectra. In: SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. **Lignins: occurrence, formation, structure and reactions**. New York: J. Wiley, 1971, p. 241 -298.

GOMIDE, J. L.; DEMUNER, B.J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método Klarson modificado. **O papel**, São Paulo, v.47, n.8, p. 36-38, 1986.

GUILMO, S. M. P.; AUER, C. G.; BARRICHELO, L. E. G. Efeito de fungos termófilos sobre madeira de *Eucalyptus saligna*. III. a população fúngica. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 37, p. 89-95, 1998.

GUILMO, S. M. P.; AUER, C. G.; BARRICHELO, L. E. G. Efeito de fungos termófilos sobre madeira de *Eucalyptus saligna* Sm.II. *Aspergillus* sp., *Dactylomyces thermophilus* Sopp., *Penicillium bacillisporum* Swift, *Rhizomucor* sp. e *Sporotrichum* sp. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 26/27, p.29-34, 1993.

HILLIS, W. E. Distribution, properties and formation of some wood extractives. **Wood Science and Technology**, Berlin, v. 5, p. 272-289, 1971.

HILLIS, W. E.; BROWN, A. G. **Eucalypts for wood production**. Melbourne: CSIRO, 1978.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES – **IBÁ**. Brasília: Studio 113. 100 p. Disponível em: <http://www.iba.org/shared/iba_2014_pt.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2014.

JELEŃ, H. et al. Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. **Mycological Progress**, Tubingen, v. 13, p. 589–600, 2014.

KIRK, T. K.; COWLING, E. B. Biological decomposition of solid wood. In: Rowell, R. M. (Ed.). **The chemistry of solid wood: Advances in Chemistry series 207**. Washington D.C.: American Chemical Society, p. 455–487, 1984.

KLOCK, U. et al. **Química da madeira**. Universidade Federal do Paraná. 2005. Disponível em: <<http://www.madeira.ufpr.br/disciplinasklock/quimicadamadeira/quimicadamadeira.pdf>>. Acesso em: 3 nov. 2014.

KOYANI, R. D.; SANGHVI, G. V.; RAJPUT, K. S. Comparative study on the delignification of *Azadirachta indica* (L) Del., wood by *Chrysosporium asperatum* and *Trichoderma harzianum*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 65, p. 179-184, 2011.

KRAG, M. N. **Avaliação quali-quantitativa de impactos ambientais aplicada em áreas de reflorestamento no nordeste paraense**. 2010. 143 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Amazônia, 2010.

LANI, J. L. (Coord.). **Atlas de ecossistemas do Espírito Santo**. Vitória: SEMA; Viçosa, MG: UFV, 2008. 504 p.

LEPAGE, E. S. Química da madeira. In: _____. (Coord.). **Manual de preservação de madeiras**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, 1986. v. 1, p. 69–97.

LIMA, W. P. **Impacto ambiental do eucalipto**. 2. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1996. 301 p.

MARTINI, A. J. **O plantador de eucaliptos: a questão da preservação florestal no Brasil e o resgate documental do legado de Edmundo Navarro de Andrade**. 2004. 320 f. Dissertação (Mestrado em História Social) - Faculdade de Filosofia, História e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MENDES, A. S.; ALVES, M. V. S. **A degradação da madeira e sua preservação**. Serviço Florestal Brasileiro. 1988. Disponível em : <<http://www.florestal.gov.br/publicacoes/tecnico-cientifico-lpf/a-degradacao-da-madeira-e-sua-preservacao>> Acesso em: 15 jun. 2014.

MILTON, F. T. **The preservation of wood: a self study manual for wood treaters**. Saint. Paul: Minnesota Extension Service, 1995. 110 p.

MODES, K. S. et al. Resistência natural das madeiras de sete espécies florestais ao fungo *Pycnoporus sanguineus* causador da podridão-branca. **Cerne**, Lavras, v. 18, n. 3, p. 407-411, 2012.

MOTTA, J. P. et al. Resistência natural da madeira de *Tectona grandis* em ensaio de laboratório. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.8, p.1393-1398, 2013.

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.

MULLER, F. A. et al. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, Surrey, v.27, n.21, p.3955-3963, 2006

NAKASONE, K. K. Morphological and molecular studies on *Resinicium* s. str. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 85, p. 420-436, 2007.

NEGRÃO, D. R. **Seleção de fungos degradadores de madeira para uso na destoca biológica de *Eucalyptus* spp.** 2011. 108f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2011.

NILSSON, R. H. et al. Improving ITS sequence data for identification of plant pathogenic fungi. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 67, p. 11-19, 2014.

OLIVEIRA, A. M. F. et al. Agentes destruidores da madeira. In: LEPAGE, E.S. (Coord.). **Manual de preservação de madeiras**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, 1986. v. 1, p. 99–256.

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

ONOFRE, F. F. et al. Modelo de degradação de tocos remanescentes em povoamentos de eucalipto. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 2001, Bauru. **Anais...** Bauru: UNESP, 2001. p. 308-308.

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.; 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.

PAES, J. B.; MORAIS, V. M.; LIMA, C. R. Resistência natural de nove madeiras do semi-árido brasileiro a fungos causadores da podridão-mole. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.3, p. 365-371, 2005.

PANDEY, K. K; PITMAN, A. J. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 52, n. 3, p. 151-160, 2003.

- PAVAN, J. A.; ALVES, T. W.; SOUZA, M. A. Viabilidade Econômica da Produção de Eucaliptos no Rio Grande do Sul. **ABCustos**, São Leopoldo, v. 5, n. 1, p. 78-109, 2010.
- PEREIRA, H., Variability in the chemical composition of plantation eucalypts (*Eucalyptus globulus* Labill.). **Wood and Fiber Science**, Madison, v. 1, n. 20, p. 82-90, 1988.
- PINHO, D. B. et al. An efficient protocol for DNA extraction from Meliolales and the description of *Meliola centellae* sp. nov. **Mycotaxon**, Portland, v. 122, p. 333-345, 2012.
- QUILHÓ, T.; MIRANDA, I.; PEREIRA, H. Within-tree variation in wood fibre biometry and basic density of the urograndis eucalypt hybrid (*Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*). **IAWA Journal**, Leiden, v. 27, p. 243-254, 2006.
- REIS, M. G. F.; REIS, G. G. Fisiologia da brotação de eucalipto com ênfase nas suas relações hídricas. **Série técnica – IPEF**, Piracicaba, v. 11, n. 30, p. 9-22, 1997.
- ROWELL, R. M. **Handbook of wood chemistry and wood composites**. Boca Raton: CRC Press, 2005. 487 p.
- RYSS, A. Y., KULINICH, O. A., SUTHERLAND, J. R. Pine wilt disease: a short review of worldwide research. **Forestry Studies in China**, Pequim, v. 13, n. 2, p. 132–138, 2011.
- SANTOS, S.R. **Influência da qualidade da madeira de híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* e do processo kraft de polpação na qualidade da polpa branqueada**. 2005. 159 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- SANTOS, C. P.; REIS, I. N.; MOREIRA, J. E. B.; BRASILEIRO, L. B. Papel: como se fabrica? **Química Nova na Escola**, São Paulo, n.14, p. 3-7, 2001.
- SCHMIDT, O. **Wood and tree fungi: biology, damage, protection and use**. Hidelberg: Springer, 2006. 334p.
- SHRESTHA, P. et al. Enzyme production by wood-rot and soft-rot fungi cultivated on corn fiber followed by simultaneous saccharification and fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, v. 57, n. 10, p. 4156-4161, 2009.
- SILVA, L. F. et al. Deterioração da madeira de *Eucalyptus* spp. por fungos xilófagos. **Cerne**, Lavras, v. 20, n. 3, p. 393-400, 2014.
- SIMÕES, A.; SCHMITZ, H. Intensificação de sistemas de produção através da mecanização na região da Transamazônica: limites e possibilidades. **Novos Cadernos Naea**, Belém, v. 3, n. 2, p. 145-176, 2000.

SINGH, D.; CHEN, S. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v. 81, n. 3, p. 399-417, 2008.

SJÖSTRÖM, E.; WESTERMARK, U. Chemical composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. In: SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. (Ed.). **Analytical methods in wood chemistry, pulping, and papermaking**. Berlin: Springer-Verlag, 1998. p. 1-19.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA - SBS. **Fatos e números do Brasil Florestal**. 2006. Disponível em:
< <http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/SBS-2005.pdf> >. Acesso em: 28 ago. 2014.

Technical Association of the Pulp and Paper Industry - TAPPI. **TAPPI test methods T 257 om-92**: sampling and preparing wood for analysis. Atlanta: Tappi Technology Park, v.1, 1992.

Technical Association of the Pulp and Paper Industry - TAPPI. **TAPPI test methods T 264 om-88**: preparation of wood for chemical analysis. Atlanta: Tappi Technology Park, v.1, 1992.

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**, Oxford, v. 26, p. 233–240, 2010.

TELES, R. F. **Ensaio não destrutivo para avaliar o desempenho de madeiras amazônicas tratadas quimicamente**. 2014. 195 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

TOLJANDER, Y. K.; HOLMER, B. D. L. L.; HÖGBERG, N. O. S. Environmental fluctuations facilitate species co-existence and increase decomposition in communities of wood decay fungi. **Oecologia**, Berlin, v.148, p.625-631, 2006.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Eds). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–322.

WINANDY, J. E.; MORRELL, J. J. Relationship between incipient decay, chemical composition, and properties of Douglas fir. **Wood and Fiber Science**, Madison, v. 25, n. 3, p. 278-288, 1993.

ZABEL, R. A.; MORRELL, F. L. **Wood microbiology**: decay and its prevention. San Diego: Academic Press, 1992. 476p.

APÊNDICES

Apêndice A - Resumo da análise de variância dos resultados de perda de massa da madeira submetida aos fungos testados no experimento de pré-seleção de fungos com capacidade de deterioração.

Tabela 1A – Resumo da análise de variância dos resultados de perda de massa da madeira submetida aos fungos testados. Dados transformados em $\arcsen \sqrt{(PM_{\%}/100)}$

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Fungo	30	0.27717	73.5114 **
Tempo	4	0.34144	90.5582 **
Fungo x Tempo	120	0.03583	9.5032 **
Resíduo	1395	0.00377	
Total	1549		
CV = 56.75%			

** significativo a 1%.

Apêndice B - Resumo da análise de variância dos resultados de perda de massa da madeira submetida aos fungos testados no experimento de apodrecimento acelerado em laboratório.

Tabela 2B – Análise de variância dos resultados de perda de massa da madeira submetida aos fungos testados. Dados transformados em $\arcsen \sqrt{(PM_{\%}/100)}$

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Fungo	9	1.25896	317.2261**
Posição da madeira	2	0.11439	28.8241 **
Fungo x Posição da madeira	18	0.02474	6.2338 **
Resíduo	270	0.00397	
Total	299		
CV = 19.85%			

** significativo a 1%.

Apêndice C - Resumo da análise de variância dos resultados da penetração produzida pelo penetrômetro de impacto no experimento de avaliação da degradação por fungos em tocos no campo.

Tabela 3C – Análise de variância dos resultados da penetração nos tocos submetidas aos fungos testados.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Fungo	7	0.01510	2.1681 *
Tratamento	3	0.00952	1.3674 ns
Fungo x Tratamento	21	0.02520	3.6189 **
Resíduo	96	0.00696	
Total	127		
CV = 6.92%			

** significativo a 1%; * significativo a 5% de probabilidade; ns – não significativo a 5% de probabilidade.

Apêndice D - Resumo da análise de variância dos resultados da velocidade da propagação das ondas produzidas pelo Stress Wave Timer no experimento de avaliação da degradação por fungos em tocos no campo.

Tabela 4D – Análise de variância dos resultados da velocidade da propagação das ondas submetidas aos fungos testados.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Fungo	7	4458.77	1.9671 ns
Tratamento	3	587.51	0.2592 ns
Fungo x Tratamento	21	3282.52	1.4482 ns
Resíduo	96	2266.70	
Total	127		
CV = 14.70%			

ns – não significativo a 5% de probabilidade.