

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS CAUSADORES DA PODRIDÃO-BRANCA DA MADEIRA EM FLORESTAS DE *Eucalyptus* spp. COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE CEPAS E RAÍZES¹

Sandra Kunieda de Alonso², Aderlan Gomes da Silva³, Maria Catarina Megumi Kasuya⁴, Nairam Félix de Barros⁵, José Renato Pereira Cavallazzi⁶, Lina Bettucci⁷, Sandra Lupo⁷ e Acelino Couto Alfenas⁸

RESUMO – Este trabalho objetivou isolar fungos causadores da podridão-branca da madeira, a partir de basidiocarpos e de fragmentos de madeira de eucalipto coletados em várias regiões do país, bem como testar seu potencial de degradação de cepas e raízes mortas em plantios comerciais de eucalipto, após o corte raso. Para o isolamento dos fungos foi desenvolvido um meio de cultura de serragem de eucalipto-ágar. Dentre 292 isolados obtidos e submetidos ao teste de Bavendam, 144 foram classificados como causadores de podridão-branca, capazes de produzir fenoloxidasas. Dentre as nove relações C/N testadas, observou-se uma tendência de ocorrer maior degradação de cavacos naquelas iguais a 60 : 1, 200 : 1 e 300 : 1. Utilizando a relação C/N igual a 60 : 1, realizaram-se dois experimentos para avaliar a degradação de cavacos de *Eucalyptus saligna* por isolados fúngicos de podridão-branca. No primeiro experimento, avaliado aos 90 dias de incubação, foram selecionados sete isolados, que causaram perda de peso em cavacos superior ou igual à causada por *Trametes versicolor*, usado para comparação. No segundo experimento foram testados 46 isolados fúngicos. Dentre os mais eficientes estavam os sete isolados selecionados no primeiro teste, além de outros quatro isolados. Baseado na análise de DNA, seis isolados foram identificados, sendo três pertencentes à espécie *Pycnoporus sanguineus*, um ao gênero *Peniophora* sp., um ao gênero *Pestalotiopsis* sp. e um ao gênero *Ganoderma* sp.

Palavras chave: Destoca microbiológica, *Eucalyptus* e fungos da podridão-branca da madeira

ISOLATION AND SCREENING OF WOOD WHITE ROT FUNGI FROM *Eucalyptus* spp. FORESTS WITH POTENTIAL FOR USE IN DEGRADATION OF STUMPS AND ROOTS

ABSTRACT – The aim of this work was to isolate native wood white-rot fungi from fungal fruit-bodies and eucalyptus wood fragments from different regions of Brazil and to test their potential for degrading dead stumps and roots in *Eucalyptus* plantings after harvest. Fungi isolates were obtained in a culture medium composed by *Eucalyptus* sawdust and agar. Among 292 isolates submitted to the Bavendam test, 144 were classified as phenoloxidasas producing isolates. Among nine C/N ratios tested, it was observed a tendency of occurring larger chip decay in the C/N ratios equal to 60 : 1, 200 : 1 and 300 : 1. Two decay assays were performed in wood chips of *Eucalyptus saligna* using the C/N ratio 60 : 1 in order to verify which isolates

¹ Recebido em 04.04.2006 e aceito para publicação em 13.11.2006.

² Bolsista de DTI, CNPq.

³ Mestrado em Fitopatologia, UFV, bolsista do CNPq.

⁴ Professora do Departamento de Microbiologia, UFV.

⁵ Professor do Departamento de Solos, UFV.

⁶ Bolsista Recém Doutor, FAPEMIG.

⁷ Professora da Universidad de la República, Uruguai.

⁸ Professor do Departamento de Fitopatologia, UFV. E-mail: <aalfenas@ufv.br>.

were able to cause larger reduction of dry matter. In the first assay, which was evaluated at 90 days of incubation, seven isolates that stood out in relation to *Trametes versicolor* were selected. The second assay evaluated the capacity of 46 isolates in promoting decay. The isolates selected in the first assay were among the 11 most efficient in the second assay. Based on DNA analysis, six isolates were identified as *Pycnoporus sanguineus* (3 isolates), *Peniophora* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Ganoderma* sp.

Keywords: Microbiological decay of stumps, Eucalyptus and wood white rot fungi.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos apodrecedores de madeira têm sido objeto de estudo com diferentes aplicações, desde a proteção de artefatos de madeira contra a colonização e degradação, sua ação em ambientes naturais e atuação na decomposição de resíduos vegetais até o seu emprego ou de suas enzimas isoladamente em processos industriais, como a biopolpação, biobranqueamento e decomposição de xenobióticos (COSTA, 1993; BLANCHETTE, 2000; HYODO et al., 2000).

O acúmulo de materiais de difícil degradação tem preocupado diversos setores produtivos, inclusive o setor florestal, responsável pela geração de resíduos a partir do processo de fabricação de celulose e outros produtos da madeira. O uso desses resíduos como fonte de energia tem sido empregado, mas geram as cinzas como um novo resíduo que se acumula.

A destoca mecânica apresenta elevados custos financeiro e ambiental, e os tocos e raízes remanescentes, após o corte raso, podem causar danos a pneus e partes de máquinas e implementos utilizados no preparo do solo. A degradação natural de cepas e raízes é lenta em muitas regiões, permanecendo tal material praticamente inalterado por vários anos após o corte. Assim, o emprego de fungos degradadores pré-selecionados pode constituir uma alternativa para acelerar a degradação, visando reduzir ou eliminar a influência negativa dos tocos nas áreas de reforma e proporcionar menor exportação de nutrientes da área, contribuindo para a maior sustentabilidade das florestas plantadas.

A capacidade de degradação biológica dos componentes da madeira varia entre espécies e isolados fúngicos de mesma espécie. Essa variabilidade é função do complexo enzimático do fungo (MACHUCA e FERRAZ, 2001; MEYSAMI e BAHARI, 2003). Dependendo do processo e dos componentes da madeira, distinguem-

se três tipos de podridão (RAYNER e BODDY, 1988): mole, marrom e branca. Na podridão mole ocorre degradação seletiva da camada S2 da parede celular, atingindo apenas os polissacarídeos, deixando um resíduo lignolítico alterado. Na podridão branca, há degradação de todos os componentes primários da madeira, inclusive da lignina. E na podridão marrom acontece tanto a degradação da celulose quanto a da hemicelulose (BLANCHETTE, 2000). Dentre os vários grupos enzimáticos produzidos por fungos da podridão branca que atuam na degradação da lignina, o das lacases é encontrado com maior frequência (PELÁEZ et al., 1995).

A produção e atividade das enzimas que atuam na degradação da madeira são influenciadas pela composição química do material a ser degradado, sendo a relação carbono/nitrogênio um dos fatores de maior relevância. Alguns fungos têm seu complexo enzimático estimulado pela carência de nitrogênio, enquanto outros necessitam de maior proporção desse elemento (VANCE e CHAPIN III, 2001; ZAFAR et al., 1996).

A capacidade de degradação de fungos apodrecedores tem sido correlacionada com a quantidade e tipo de enzimas produzidas, mas uma forma direta de avaliar a capacidade de degradação é aferir a perda de peso de matéria seca da madeira por meio da inoculação de corpos de prova com o isolado a ser testado (RAYNER e BODDY, 1988).

Dessa forma, esse trabalho objetivou isolar e selecionar fungos da podridão-branca de madeira com maior potencial em degradar cepas e raízes de eucalipto em plantios comerciais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e isolamento de fungos decompositores

Amostras de tocos de eucalipto em decomposição e amostras de basidiocarpos foram coletadas em plantios comerciais de *Eucalyptus* spp. em Teixeira de Freitas

(BA), Aracruz (ES), Barra do Ribeiro (RS), Borebi (SP), Lençóis Paulista (SP), Luíz Antônio (SP), Pratânia (SP), Belo Oriente (MG), Guanhães (MG) e Viçosa (MG). As amostras foram acondicionadas em sacos de papel poroso e transportadas para o Laboratório de Patologia Florestal e Genética da Interação Planta-Patógeno (UFV), onde foi realizado o isolamento para obtenção de culturas axênicas de fungos.

Nesse sentido, objetivando o isolamento direto dos fungos a partir dos basidiocarpos, fragmentos de seu tecido interno foram transferidos assepticamente para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). Também, com o intuito de obter isolamento fúngico, porém de forma indireta, fragmentos de tecido de madeira retirados da área de transição, entre a porção sadia e aquela em decomposição, foram desinfestados em solução aquosa de etanol por 30 seg, seguindo-se de imersão em solução de hipoclorito de sódio 0,2% por 3 min, lavagem em água deionizada-esterilizada e, finalmente, secagem em papel-absorvente. Posteriormente, os fragmentos foram semeados em placas de Petri contendo meio de cultura constituído de 15 g de ágar, 20 g de serragem e 1.000 mL de água destilada. As placas de Petri foram mantidas em incubadora a 25 °C, no escuro, até a observação de crescimento micelial, quando as culturas eram sucessivamente repicadas para placas de Petri com meio de BDA até a obtenção de culturas axênicas. Finalmente, essas culturas foram transferidas para tubos de ensaio contendo BDA e armazenadas a 20 ± 2 °C, no escuro.

2.2. Determinação da capacidade dos isolados fúngicos em causar a podridão branca da madeira

A capacidade de causar podridão branca da madeira das culturas foi determinada pelo teste de Bavendamm (DAVIDSON et al., 1938), que permite distinguir isolados capazes de produzir fenoloxidasas. Para isso, discos de micélio com 7 mm de diâmetro foram retirados das bordas de colônias com 5 dias de idade e transferidos para placas de Petri contendo meio extrato de malte (15 g/L), ágar (20 g/L) e ácido tânico (5 g/L). Aos três dias de incubação, realizou-se a avaliação visual quanto à formação de um halo marrom, considerado como reação positiva para produção de fenoloxidasas. A cultura de *Trametes versicolor* (L.:) Fries. foi empregada como controle positivo do teste de Bavendamm. A frequência de ocorrência dos fungos causadores da podridão branca foi comparada entre os locais em que as coletas seguiram

o mesmo padrão de amostragem e época de realização, pelo teste de χ^2 a 5% de significância e um grau de liberdade.

2.3. Preparo de inóculo para testes de degradação de cavacos

O substrato para produção do inóculo utilizado nos testes de degradação de cavacos foi constituído por 200 g/kg de farelo de arroz como fonte de nitrogênio e 800 g/kg de serragem de eucalipto. Saturou-se a mistura com água e, após 24 h, o excesso foi drenado. Pesaram-se 600 g da mistura, a qual foi acondicionada em sacos de polipropileno de alta densidade, vedados com o auxílio de dois anéis de PVC e de papel impermeável. Os sacos contendo o substrato foram autoclavados duas vezes, a 121 °C, por 2 h, em intervalos de 48 h.

Após a esterilização, cinco discos de micélio de 7 mm de diâmetro, retirados das bordas de colônias cultivadas em BDA por quatro dias a 25 °C, foram repicados assepticamente para o substrato contido no interior dos sacos. As culturas foram incubadas a 26 °C, no escuro, durante 30 dias, visando à colonização do substrato.

2.4. Relação carbono/nitrogênio (C/N) favorável à degradação

Determinou-se a influência da relação C/N sobre a degradação a partir de dois experimentos em cavacos de cerne de *Eucalyptus saligna* Sm. No primeiro experimento, estudaram-se também as relações carbono/fósforo (C/P) e carbono potássio (C/K) e no segundo experimento, apenas a relação C/N. Para realização dos experimentos foram utilizados cavacos com cerca de 0,2 x 2,5 x 1,5 cm (espessura x comprimento x largura). Uma amostra simples de 200 g de cavacos foi empregada para avaliação dos teores de nitrogênio, fósforo, potássio e carbono. De posse dos resultados das análises que indicavam teores dos nutrientes, nitrogênio (0,21%), fósforo (0,0007%), potássio (0,075%) e carbono (63%), foram preparadas soluções de uréia, de superfosfato simples e cloreto de potássio em concentrações necessárias, para alterar, respectivamente, as relações C/N, C/P e C/K dos cavacos para os valores desejados. No primeiro experimento, a relação C/N foi ajustada para 20 : 1, 60 : 1, 120 : 1 e 270 : 1, e ajustaram-se ou não, concomitantemente, as relações C/P para 300 : 1 e C/K para 40 : 1. Cavacos não tratados foram usados como testemunha e apresentavam relação C/N igual

a 300 : 1. Como os teores de fósforo e potássio dos cavacos eram muito baixos, eles foram desconsiderados para se efetuar o preparo das soluções de correção. Empregaram-se um isolado fúngico (PF36), selecionado aleatoriamente, e outro de *T. versicolor*, usado como controle. Os tratamentos do experimento foram arranjados na forma de um delineamento inteiramente casualizado, fatorial fracionário de $2 \times 4 \times 2 \times 5 + 1$, representado por dois isolados fúngicos, quatro relações C/N, duas relações C/P e C/K, cinco repetições e um tratamento adicional (testemunha). Os dados de porcentagem de perda de peso de matéria seca foram submetidos às análises de variância e de regressão (FEDERER, 1955; DRAPER e SMITH, 1981). Nos tratamentos em que se desejavam corrigir também as relações C/P e C/K, preparou-se uma única solução contendo as quantidades necessárias de nitrogênio, fósforo e potássio.

No segundo experimento foram utilizados sete isolados pré-selecionados, os quais foram repicados para cavacos cuja relação C/N foi ajustada para 20 : 1, 40 : 1, 60 : 1, 80 : 1, 120 : 1, 160 : 1, 200 : 1, 240 : 1 e 300 : 1. O ensaio consistiu em um delineamento inteiramente casualizado, em que os tratamentos foram arranjados em um fatorial de $7 \times 9 \times 5$, sendo sete isolados, nove valores de relação C/N dos cavacos e cinco repetições. Os dados de porcentagem de perda de peso de matéria seca foram submetidos às análises de variância e regressão (FEDERER, 1955; DRAPER e SMITH, 1981). Quando não houve ajuste adequado de modelos, estimou-se o erro-padrão da média.

Os cavacos foram mantidos imersos nas respectivas soluções de nutrientes indicadas durante 24 h à temperatura ambiente, aproximadamente 27 ± 5 °C. Após a imersão, os cavacos foram retirados das soluções e o excesso de água, drenado em papel-toalha. Em seguida, foram pesados 20 g de cavacos, para cada uma das cinco repetições de cada tratamento. Amostras para determinação do teor de umidade dos cavacos foram retiradas no início, meio e fim do processo de pesagem, de cada um dos tratamentos. O teor de umidade dos cavacos foi determinado, secando-se o material em estufa a 105 ± 2 °C, durante 24 h.

Vinte gramas de substrato à base de serragem e farelo de arroz colonizado pelos isolados fúngicos foram utilizados como inóculo. Após a pesagem, os cavacos

foram depositados em frascos de vidro com tampa rosqueável. Os cavacos inoculados foram cobertos com uma tela de náilon, e sobre esta se colocou, para favorecer a colonização pelos fungos, uma camada de vermiculita umedecida, que permaneceu durante todo o teste. Os frascos foram vedados e mantidos em câmara com temperatura controlada, 26 ± 2 °C, no escuro. Para a avaliação do experimento, removeu-se a manta micelial sobre os cavacos com o auxílio de uma escova de dente de cerdas duras. Após a limpeza, os cavacos foram secados em estufa durante 36 h a 105 ± 2 °C, para determinação do peso da matéria seca.

2.5. Degradação acelerada in vitro de cavacos de *Eucalyptus saligna* com diferentes isolados fúngicos causadores da podridão branca da madeira

Comparou-se a capacidade de biodegradação de cavacos de *E. saligna* por isolados fúngicos causadores de podridão-branca em dois experimentos. Com base nos experimentos anteriormente descritos, optou-se por ajustar a relação C/N para 60 : 1.

A inoculação dos cavacos com os isolados e a avaliação do experimento foram realizadas como descrito no item anterior. Cada unidade experimental era constituída de um frasco contendo 20 g de cavacos (matéria seca) e 20 g de inóculo fúngico (matéria fresca). O primeiro experimento foi avaliado aos 90 dias após a incubação e o segundo, aos 60, 90, 120, 150 e 180 dias. Os experimentos consistiram em delineamentos inteiramente casualizados com 41 tratamentos (isolados) no primeiro e com 46 no segundo, sendo cada um destes repetidos por cinco vezes. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott a 5% de significância (STEEL et al., 1997; RIBEIRO JUNIOR, 2001).

Para o segundo experimento, avaliado ao longo do tempo, foi calculada a área abaixo da curva de progresso (AACP) da perda de matéria seca para cada uma das repetições dos tratamentos, como proposto por Kranz e Rotem (1988), e tais dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott a 5% de significância (RIBEIRO JÚNIOR, 2001), para verificar quais isolados provocaram maior perda de peso de matéria seca nos cavacos. Em ambos os experimentos, foram utilizados cavacos inoculados com *T. versicolor* como testemunha.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento e verificação da capacidade dos isolados fúngicos decompositores em causar podridão branca da madeira

Quarenta e nove vírgula três por cento, ou 144 dos 292 isolados pertencem ao grupo de fungos causadores de podridão-branca (Tabela 1). O emprego do meio ágar-serragem de eucalipto deve ter favorecido o alto número observado de isolados fúngicos causadores de podridão branca capazes de utilizar os componentes da madeira, pois a composição do meio de cultura influencia o crescimento, produção enzimática, reprodução e demais processos fisiológicos desses organismos (ZAFAR et al., 1996; DONNELLY e BODDY, 1997; MACHUCA e FERRAZ, 2001).

Diferenças significativas nas porcentagens de ocorrência dos isolados foram detectadas entre Lençóis Paulista e Pratânia ($\chi^2_{(1g.l.)calc} = 4,69$). Não houve diferença significativa nas porcentagens de ocorrência de isolados entre Borebi e Lençóis Paulista ($\chi^2_{(1g.l.)calc} = 3,68$), entre Borebi e Pratânia ($\chi^2_{(1g.l.)calc} = 0,04$) e entre Guanhães e Belo Oriente ($\chi^2_{(1g.l.)calc} = 3,14$).

Com base em observações realizadas na época das coletas das amostras, acredita-se que a maior velocidade de degradação de cepas mortas no campo depende da frequência desse grupo de fungos. Não podem ser feitas afirmações com relação à variação da proporção desses organismos na população microbiana ao longo do ano, porque as coletas foram realizadas em uma única ocasião em cada área.

A diferença significativa nas porcentagens de ocorrência dos isolados fúngicos entre Lençóis Paulista e Pratânia pode ser atribuída a fatores do ambiente. Em Lençóis Paulista, a manta orgânica possuía, aparentemente, maior umidade que em Pratânia, indicando maior disponibilidade de água, condição favorável à biodegradação da madeira (BOYLE et al., 1998; BJÖRDAL et al., 1999; EJECHI, 2003). Detalhando o fato, a maior disponibilidade de água pode contribuir para a lixiviação de extrativos da madeira, que pode reduzir a resistência à degradação (OLIVEIRA et al., 2005,b).

No caso de Guanhães e Belo Oriente, existem diferenças nas condições meteorológicas e na topografia das duas regiões. A temperatura média mensal no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2002 diferiu significativamente entre as duas regiões, pelo teste T ($p < 0,001$). A taxa de degradação de tocos em Guanhães

foi mais lenta que em Belo Oriente, observada pelo estágio de degradação mais avançado de cepas de mesma idade. Provavelmente a diferença de altitude, cerca de 900 m, e a menor temperatura de Guanhães propiciem menor atividade microbiana, embora, segundo O'Lear et al. (1996), a taxa de decomposição da madeira seja mais rápida em topografias mais elevadas, para madeira enterrada. Outro ponto importante foi que, em Guanhães, quase não foram notados basidiocarpos, nem cupins nas cepas. Em Belo Oriente, observaram-se cupins e basidiocarpos em grande quantidade, sendo muito comum a observação de galerias feitas pelos cupins em cepas colonizadas por micélio fúngico. Além de um maior número, havia também maior diversidade de basidiocarpos nas cepas em Belo Oriente. Nesse sentido, a degradação mais rápida em Belo Oriente pode ser atribuída à associação entre fungos e cupins. Os fungos aumentam a digestibilidade da celulose para os cupins, fazendo que haja aproveitamento maior e mais rápido dos restos vegetais (HYODO et al., 2000). Não houve diferença na porcentagem de ocorrência de isolados fúngicos causadores de podridão-branca entre as duas áreas pelo teste de χ^2 . Talvez a amostragem não tenha sido representativa, uma vez que no campo, aparentemente, existe diferença na quantidade e diversidade de fungos entre as duas áreas. A provável falta de representatividade da amostra pode ter sido decorrente da pequena área amostrada nas duas regiões, cerca de 1,8 ha.

Tabela 1 – Porcentagem de ocorrência de isolados fúngicos causadores da podridão-branca da madeira por região amostrada

Table 1 – Percentage of occurrence of wood white rot fungi isolates per sampled region

Região	Número total de isolados	Isolados causadores da podridão-branca	
		Total	%
Teixeira de Freitas (BA)	13	4	30,8
racruz (ES)	6	5	83,3
Belo Oriente (MG)	83	43	55,4
Microrregião de Viçosa (MG)	7	4	57,1
Borebi (SP)	35	15	42,9
Lençóis Paulista (SP)	35	23	65,8
Pratânia (SP)	22	8	36,4
Luis Antônio (SP)	12	6	50,0
Guafba (RS)	16	11	68,8
Alto Rio Doce (MG)	8	4	50,0
Guanhães (MG)	50	18	36,0
Monte Dourado (PA)	5	3	60,0
Total	292	144	49,3

3.2. Relação carbono/nitrogênio (C/N) favorável à biodegradação

No primeiro experimento realizado, observou-se tendência de ocorrer maior degradação dos cavacos de cerne de *E. saligna* na relação C/N igual a 60 : 1, para *T. versicolor* e PF36, tanto nos cavacos em que

foram corrigidas as relações C/P e C/K quanto nos cavacos em que não houve correção dessas relações. Nos tratamentos em que não se ajustaram as relações C/P e C/K, não houve ajuste significativo das equações, embora tenha ocorrido tendência de maior degradação na relação C/N igual a 60 : 1 (Figura 1).

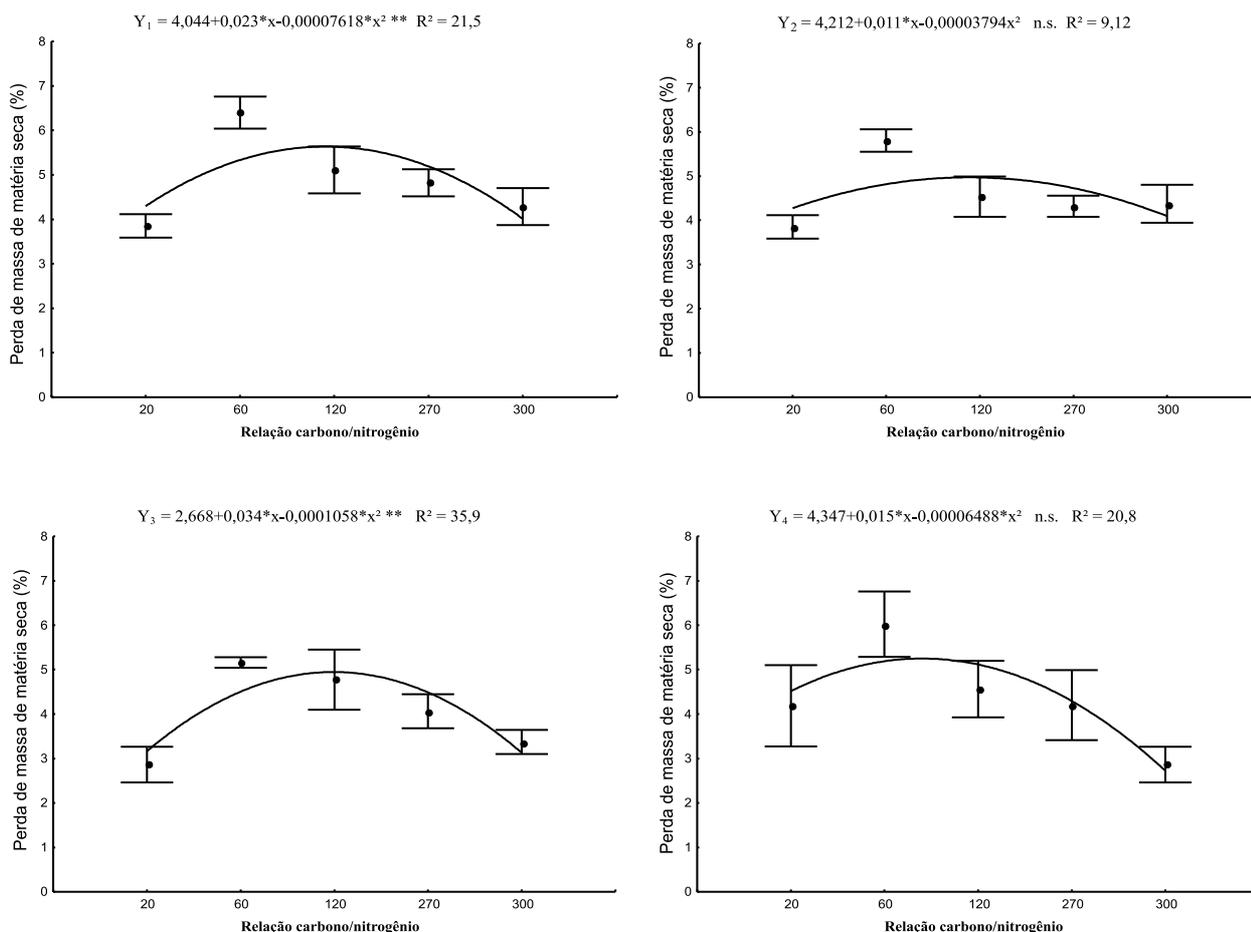


Figura 1 – Perda de massa porcentual de matéria seca provocada por fungos causadores de podridão-branca, após 45 dias de incubação, em função das relações carbono/nitrogênio, carbono/fósforo e carbono/potássio corrigidas nos cavacos de cerne de *Eucalyptus saligna*. Y1 – Cavacos com correção das relações C/P e C/K inoculados com o fungo *Trametes versicolor*; Y2 – cavacos sem correção das relações C/P e C/K inoculados com o fungo *Trametes versicolor*; Y3 – Cavacos com correção das relações C/P e C/K, inoculados com o isolado PF36; Y4 - Cavacos sem correção das relações C/P e C/K inoculados com o isolado PF36. ** = significativo a 5% de significância. n.s. = não-significativo. Barras de erro em y são o erro-padrão da média.

Figure 1 – Percentage of dry matter weight loss caused by white rot fungi, 45 days after incubation, as a function of changes in carbon/nitrogen, carbon/phosphorus and carbon/potassium ratios in *Eucalyptus saligna* heartwood chips. Y1 – wood chips with adjusted C/P and C/K ratios inoculated whit *Trametes versicolor*; Y2 – wood chips without adjustment of C/P and C/K ratios inoculated with *Trametes versicolor*. Y3 – wood chips with adjusted C/P and C/K ratios inoculated with PF36. Y4 - wood chips without adjustment of C/P and C/K ratios inoculated with PF36. ** = Statistical significance at alpha level of 5%. n.s. = non significant. Error bars represent standard errors of mean.

No segundo experimento, realizado com os isolados PF1, PF1, PF2, PF3, PF4, PF5, PF6 e PF7, ocorreu variação na relação C/N favorável à degradação. A relação C/N igual a 60 : 1 favoreceu maior degradação da madeira para os isolados PF2, PF3, PF4 e PF7. Nos isolados PF2 e PF3, os cavacos com relação C/N igual a 300 : 1 tiveram perda de massa de matéria seca muito próxima à daqueles com relação C/N igual a 60 : 1. A relação C/N igual a 200 : 1 favoreceu a ação dos isolados PF1 e PF6, sendo que no primeiro a degradação de cavacos em valores de relação C/N igual a 60 : 1 e 80 : 1 apresentou médias muito próximas à degradação ocorrida nos cavacos com relação C/N 200 : 1. No isolado PF5, a degradação de cavacos foi menor nas relações C/N 20 : 1, 40 : 1 e 240 : 1 (Figura 2). Não houve ajuste adequado dos modelos testados. No isolado PF4 na relação C/N igual a 80 : 1 ocorreu contaminação em todas as repetições, inviabilizando a avaliação de tal tratamento. Os dados indicaram haver tendência geral de ocorrer maior degradação em cavacos com relação C/N igual a 60 : 1.

Um valor baixo da relação C/N, 60 : 1 favoreceu a degradação da madeira pelos fungos testados no primeiro experimento e nos isolados PF2, PF3, PF4 e PF7, no segundo experimento. Generalizações, porém, não devem ser feitas, pois o complexo manganês-peroxidase de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer, por exemplo, é estimulado em valores mais elevados da relação C/N (FU et al., 1997), o que pode explicar a elevada degradação dos cavacos ocorrida também nas relações C/N igual a 200 : 1, nos isolados PF1 e PF6 e 300 : 1, isolado PF5, no segundo experimento de degradação. Contrariamente, *Bjerkandera* spp., *Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler e *Pleurotus ostreatus* (Jacquin: Fr.) Krummer têm seus complexos enzimáticos estimulados por relações C/N mais baixas (KAAL et al., 1995). Outro motivo que pode ter contribuído para as variações encontradas entre os isolados em resposta à alteração da relação C/N é o fato de que a degradação da madeira por microrganismos depende não só da quantidade de carbono e nitrogênio lábeis, mas também do processo predominante no momento, ou seja, respiração ou mineralização da matéria orgânica (VANCE e CHAPIN III, 2001). Dessa forma, os estudos para determinar a relação C/N a ser utilizada devem ser realizados em condições que favoreçam a mineralização da matéria orgânica, com valores adequados de temperatura, cerca de 27 °C, e umidade maior que 30%. Mesmo em condições

adequadas à degradação da madeira, diferentes fungos respondem diferentemente ao tipo de nitrogênio, orgânico ou inorgânico, que é utilizado para correção da relação C/N, embora na maioria dos casos a degradação da madeira seja favorecida pela adição de nitrogênio em suas formas orgânicas (HIGHLEY et al., 1994).

Devido às diferenças que podem existir em resposta à relação C/N de acordo com o organismo estudado, são necessários mais testes para verificar qual a melhor relação a ser utilizada no campo por ocasião da implantação da destoca microbiológica. Cada isolado fúngico deve ser estudado em condição de campo e, então, determinada a melhor relação C/N para acelerar a degradação, devendo também ser estudada a forma de nitrogênio a ser utilizada, tanto para os isolados selecionados neste trabalho quanto para novos isolados que serão selecionados em etapas futuras.

A alteração da relação C/N da madeira favoreceu a degradação dos cavacos por alguns dos isolados fúngicos testados, indicando que tanto os isolados quanto as relações C/N influenciam a biodegradação da madeira. A relação C/N igual a 60 : 1 em geral favoreceu a degradação, o que pode ser devido à maior produção enzimática e ao maior crescimento dos fungos causadores de podridão-branca nos cavacos com tal relação carbono/nitrogênio. A atividade de enzimas lignolíticas pode ser estimulada com o uso de meios de cultura onde não ocorra carência de nitrogênio (HIGHLEY et al., 1994; KAAL et al., 1995).

3.3. Experimentos in vitro de degradação acelerada em cavacos de *Eucalyptus saligna*, por diferentes isolados fúngicos causadores da podridão-branca

Conduzido o primeiro experimento, foram selecionados sete isolados, que foram denominados PF1, PF2, PF3, PF4, PF5, PF6 e PF7, de acordo com a perda de matéria seca decrescente que causaram nos cavacos. Posteriormente, dentre esses, três foram identificados por pertencer ao gênero *Pycnoporus*, um a *Ganoderma*, um a *Peniophora*, um ao gênero *Pestalotiopsis* e um não foi possível identificar (Tabela 2). *T. versicolor* causou 12,5% de perda de matéria seca nos cavacos, ao passo que os isolados selecionados causaram perdas maiores de 25,26%, 23,96%, 23,83%, 21,99%, 19,42%, 16,88% e 14,35%, respectivamente, para PF1, PF2, PF3, PF4, PF5, PF6 e PF7 (Figura 3).

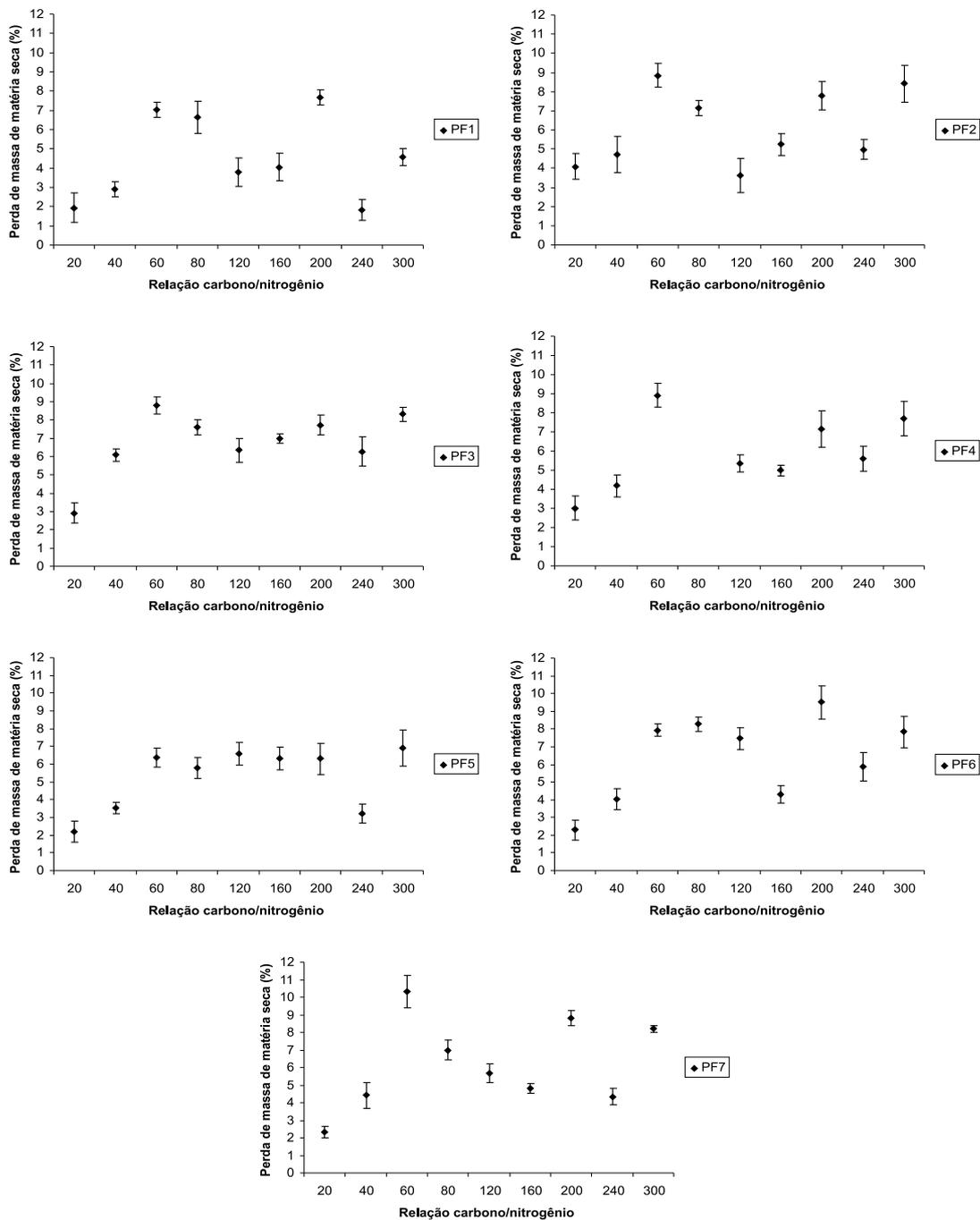


Figura 2 – Perda de massa porcentual de matéria seca provocada pelos isolados fúngicos PF1, PF2, PF3, PF4, PF5, PF6 e PF7, causadores de podridão-branca da madeira, em função das diferentes relações carbono/nitrogênio corrigidas nos cavados de *Eucalyptus saligna*, após 60 dias de incubação. Barras de erro em y são o erro-padrão da média.

Figure 2 – Percentage of dry matter weight loss caused by wood white rot fungal isolates PF1, PF2, PF3, PF4, PF5, PF6 and PF7, in *Eucalyptus saligna* heartwood chips with various adjusted carbon/nitrogen ratios, after 60 days of incubation. Error bars represent standard errors of mean.

Tabela 2 – Identificação dos isolados causadores de podridão-branca da madeira**Table 2** – Identification of the wood white rot fungi isolate

Código	Gênero ou Espécie
PF1	<i>Peniophora</i> sp.
PF2	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
PF3	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
PF4	<i>Ganoderma</i> sp.
PF5	Não identificado
PF6	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
PF7	<i>Pycnoporus sanguineus</i>

No segundo experimento, os sete isolados selecionados no primeiro teste novamente estavam entre os melhores, mas a ordem se alterou. Os isolados PF5 e PF3 foram os melhores, apresentando maior área abaixo da curva de progresso de perda de matéria seca (Figura 4). Os isolados PF45, PF43, PF42 e PF44 também se destacaram quanto à capacidade de reduzir a matéria seca dos cavacos inoculados, sendo também superiores ao *T. versicolor*. Os isolados PF42, PF43, PF44 e PF45 foram obtidos de cepas oriundas de Belo Oriente, MG.

Os fungos selecionados no primeiro teste de degradação em cavacos mostraram potencial de uso

para acelerar a degradação das cepas no campo, pois todos causaram mais de 14% de perda de matéria seca nos cavacos de cerne de *E. saligna*, enquanto a perda provocada por *T. versicolor* foi de 12,5%. Os valores de perda de massa seca foram mais elevados que os encontrados para madeira de *Eucalyptus* spp. submetida à ação de *G. trabeum*, durante 120 dias, por Oliveira et al. (2005a). Esses valores ficaram em 0,5 e 4,6% para *E. grandis* e *E. citriodora*, respectivamente. No mesmo experimento, *G. trabeum* causou redução de 38% na matéria seca da madeira de *Pinus elliottii*, considerado moderadamente resistente à biodegradação. *Pinus taeda*, que também pode ser considerado como moderadamente resistente à ação de *T. versicolor*, sofreu 37,1% de perda de matéria seca em 90 dias (WORRALL et al., 1997). Os fungos selecionados no experimento de degradação em cavacos, em associação com a alteração da relação C/N da madeira, têm potencial para degradar tocos de espécies de eucalipto, já que conseguiram, no período do teste, causar perda de peso de até 25,26%, isolado PF1, na madeira de cerne de eucalipto que geralmente se comporta como altamente resistente ao apodrecimento (OLIVEIRA et al., 2005b).

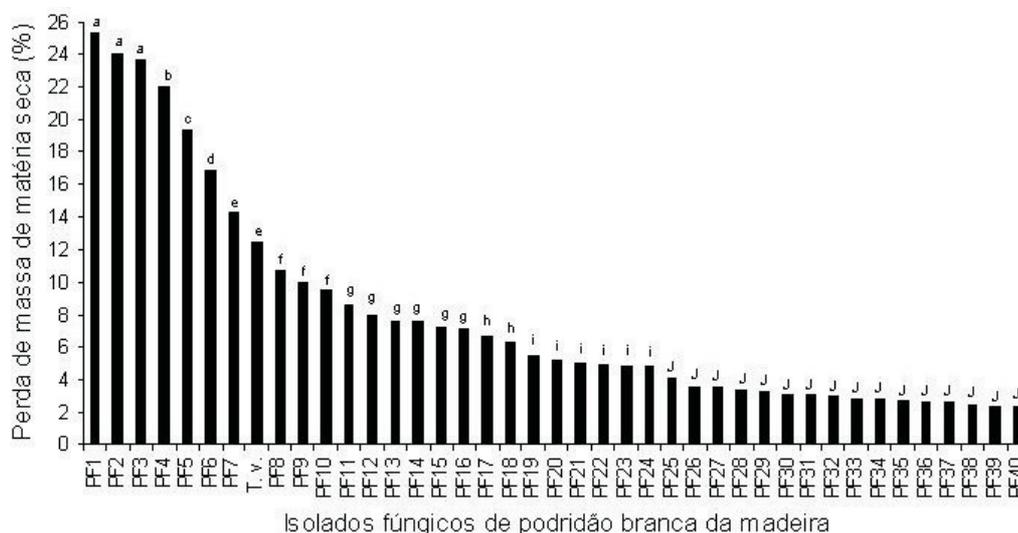


Figura 3 – Perda de peso porcentual de matéria seca de cavacos de *Eucalyptus saligna*, submetidos à ação de isolados fúngicos causadores da podridão-branca após 90 dias. T. v. – *Trametes versicolor*. Barras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Figure 3 – Percentage of dry weight loss of *Eucalyptus saligna* heartwood chips after 90 days of degradation by wood white rot fungi. T.v. – *Trametes versicolor*. Columns with the same letter are not significantly different at 5% probability level by the Scott-Knott's test.

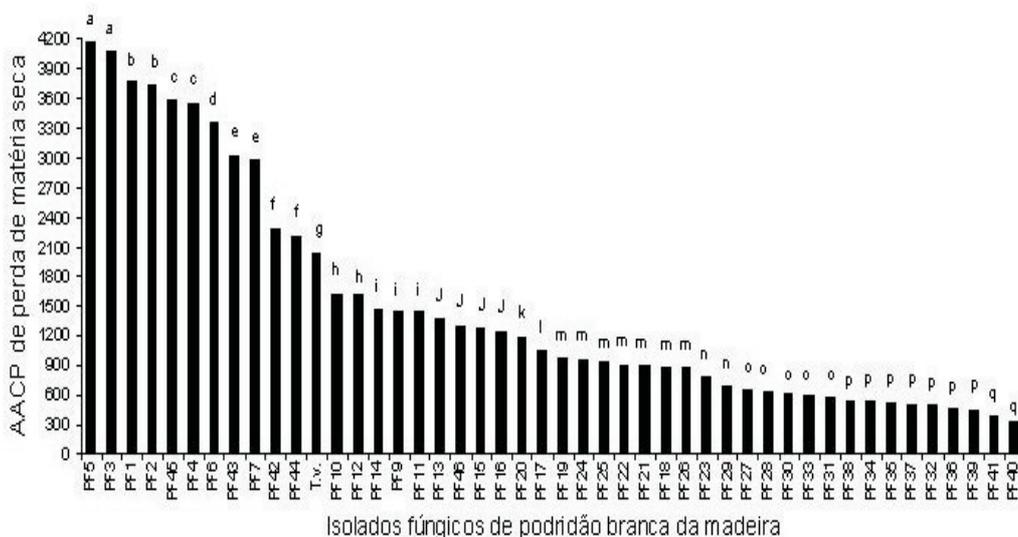


Figura 4 – Área abaixo da curva de progresso de perda de peso de matéria seca de cavacos de *Eucalyptus saligna* submetidos à ação de isolados fúngicos causadores da podridão-branca da madeira. T. v. – *Trametes versicolor*. Barras seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Figure 4 – Area under dry weight loss progress curve of *Eucalyptus saligna* heartwood chips after degradation by wood white rot fungi. T. v. – *Trametes versicolor*. Columns with the same letter are not significantly different at 5% probability level by the Scott-Knott's test.

4. CONCLUSÕES

- O meio de cultura ágar-serragem de eucalipto é eficiente em favorecer o isolamento de fungos causadores da podridão-branca da madeira de *Eucalyptus* spp.

- Cerca de 50% dos isolados fúngicos obtidos causaram podridão-branca segundo o teste de Bavendamm.

- Existe diferença na frequência de ocorrência desses fungos entre localidades.

- A relação carbono/nitrogênio e o isolado fúngico influenciam a degradação de cavacos de madeira.

- Os fungos apresentam potencial para testes de degradação de cepas no campo porque causaram maior degradação de cavacos de *Eucalyptus saligna* que *Trametes versicolor*.

5. REFERÊNCIAS

ADOUR, L. et al. Growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* in liquid media in relation with the consumption of carbon and nitrogen sources and the release of ammonia and carbon dioxide. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.533-542, 2001.

BJÖRDAL, C. G.; NILSSON, T.; DANIEL, G. Microbial decay of waterlogged archeological wood found in Sweden. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.43, p.63-73, 1999.

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

BOYLE, D.; WIESNER, C.; RICHARDSON, A. Factors affecting the degradation of polyaromatic hydrocarbons in soil by white-rot fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, n.7, p.873-882, 1998.

COSTA, A.S. **Pré-tratamento biológico de cavacos industriais de eucalipto para produção de celulose Kraft**. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1993.

DAVIDSON, W.R.; CAMPBELL, W.A.; BAISDELL, D.J. Differentiations of wood-decaying fungus by their reactions on gallic or tannic acid medium. **Journal of Agricultural Research**, v.59, p.683-695, 1938.

- DONNELLY, D. P.; BODDY, L. Resource acquisition by the mycelial-cord-former *Stropharia caerulea*: effect of resource quantity and quality. **FEMS Microbiology Ecology**, v.23, p.195-205, 1997.
- DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York: John Wiley and Sons, 1981. 709p.
- EJECHI, B.O. Microbial deterioration of partially submerged service timbers in a tropical inter-tidal zone. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.51, p.115-118, 2003.
- FEDERER, W.T. **Experimental design: theory and application**. New York: MacMillan Company, 1955. 544p.
- FU, S.Y.; YU, H.; BUSWELL, J.A. Effect of nutrient and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajor-caju*. **FEMS Microbiology Letters**, v.147, p.133-137, 1997.
- HIGHLEY, T.R. et al. **Research on biodeterioration of wood, 1987 – 1992**: I - Decay mechanisms and biocontrol. Madison: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Product Laboratory, 1994. 20p.
- HYODO, F. et al. Role of the mutualistic fungus in lignin degradation in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus* (Isoptera; Macrotermitinae). **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.653-658, 2000.
- KAAL, E.E.J.; FIELD, J.A.; JOYCE, T.W. Increasing lignolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. **Bioresource Technology**, v: 53, p.133-139, 1995.
- KRANZ, J.; ROTEM, J. **Experimental techniques in plant disease epidemiology**. Berlin: Springer-Verlag Heidelberg, 1988. 299p.
- MACHUCA, A.; FERRAZ, A. Hydrolitic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.386-391, 2001.
- MEYSAMI, P.; BAHERI, H. Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. **Advances in Environmental Research**, v.7, n.4, p.881-887, 2003.
- O'LEAR, H.A. et al. Fire and topographic effects on decomposition rates and N dynamics of buried wood in tallgrass prairie. **Soil Biology and Biochemistry**, v.28, n.3, p.323-329, 1996.
- OLIVEIRA, J.T.S.; TOMASELLO, M.; SILVA, J.C. Resistência natural da madeira de sete espécies de eucalipto ao apodrecimento. **Revista Árvore**, v.29, p.993-998, 2005a.
- OLIVEIRA, J.T.S. et al. Influência dos extrativos na resistência ao apodrecimento de seis espécies de madeira. **Revista Árvore**, v. 29, p. 819-826, 2005b.
- PELÁEZ, F.; MARTÍNEZ, M.J.; MARTÍNEZ, A.T. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. **Mycological Research**, v.99, p.37-42, 1995.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000. 477p.
- RAYNER, A.D.M.; BODDY, L. **Fungal decomposition of wood**. Chippenham: John Wiley and Sons, 1988. 587p.
- RIBEIRO JÚNIOR, J.I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 301p.
- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H.; DICKEY, D.A. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. New York: McGraw-Hill, 1997. 666p.
- VANCE, E.D.; CHAPIN III, F.S. Substrate limitations to microbial activity in taiga forest floors. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.173-188, 2001.
- WORRALL, J.J.; ANAGNOST, S.E.; ZABEL, R.A. Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi. **Mycologia**, v.89, n.2, p.199-219, 1997.
- ZAFAR, S.I. et al. Influence of nutrient amendment on the biodegradation of wheat straw during solid state fermentation with *Trametes versicolor*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.42, p.83-87, 1996.

