



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL DEGRADATIVO DE  
FUNGOS LIGNOCELULOLÍTICOS ASSOCIADOS ÀS  
PODRIDÕES BRANCA E PARDA**

**ANNA SOFYA VANESSA SILVÉRIO DA SILVA**

**BRASÍLIA - DF  
2018**

**ANNA SOFYA VANESSA SILVÉRIO DA SILVA**

**IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL DEGRADATIVO DE FUNGOS  
LIGNOCELULOLÍTICOS ASSOCIADOS ÀS PODRIDÕES BRANCA E  
PARDA**

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia pelo Programa de Pós-graduação em Fitopatologia.

**Orientador**

Dr. Helson Mario Martins do Vale

**Coorientadora**

Dr.<sup>a</sup> Eliane Ferreira Noronha

**BRASÍLIA - DISTRITO FEDERAL  
BRASIL  
2018**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Da Silva, Anna Sofya Vanessa Silvério da Silva.

Identificação e potencial degradativo de fungos lignocelulolíticos associados às podridões branca e parda. / Anna Sofya Vanessa Silvério da Silva.

Brasília, 2018.

p.70.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia,  
Universidade de Brasília, Brasília.

1. Madeira– Podridão Branca e Parda.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Identificação e potencial degradativo de fungos lignocelulolíticos associados às podridões branca e parda.

*Ao meu pai Francisco das Chagas que me apoiou na inquietude do saber, herança intangível, e à minha valorosa mãe Maria José (in memoriam) sem a qual os meus sonhos não seriam realidade.*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

Àquele que tudo fez desde o princípio e para sempre, a minha maior gratidão! Os seus mistérios me envolvem e me incitam a ser uma eterna buscadora. Deus, Krishina, Alá, Odin, Oxalá... Sem denominações, permaneço em gratidão ao Grande Espírito da verdade!

*Porque não falar de flores?* Da mais linda de todas, que brotou com a única finalidade de fazer o bem: Maria José Silvério da Silva, minha mãe querida, filha de Rosa Silvério Maia e Raimundo Silvério Maia, esposa de Francisco das Chagas Pereira da Silva e mãe de Yone Guadalupe Silvério da Silva, Rossana Claudya Silvério da Silva, Marcos Theófilo Silvério da Silva e Norma Nancy Emanuelle Silvério da Silva, as mais belas flores do meu jardim: “(...) Unidas... *Ai quem pudera, numa eterna primavera viver, qual vive esta flor. Juntar as rosas da vida, na rama verde e florida, na verde rama do amor!*” (Castro Alves. Espumas Flutuantes, 1870). E, como um poema, a eternizar a nossa história, viveremos como essas rosas na plenitude do amor sem fim! Que cada broto venha a ser o começo de novas aventuras rumo ao sempre presente infinito.

Agradeço a toda minha família, por todo seu amor e ensinamentos ao longo dessas três décadas de convivência. Agradeço também à família que Deus nos permitiu escolher: os amigos! De um modo especial, aos meus grandes amigos que participaram diretamente desse trabalho, de uma forma ou de outra, contribuindo para o seu desenvolvimento e concretização: Jamile Mendes, Fernando Gouveia, Marcelo Fontana, Érica Cristina, Tatiana Miranda, Bianca Samay, Alonso Poma, Francilene Lopes, Aline Silva, Márcia Helena, Sildene Paes, Francisco Silva (Chico), Justino Dias, Samuel Galvão, Débora Cervieri, Cléia Cabral, Catharine Abreu, Geisianny Moreira e Lincon Rafael (*sozinho no mundo*).

Agradeço ainda o apoio fundamental de alguns colegas de trabalho: Paulo Fontes, que me admitiu no LPF e confiou-me esta missão, rica e cheia de possibilidades, de fazer parte desta grande família! Fernando Gouveia, Marcelo Fontana, Getúlio Almeida e Fernando Ananias, minha equipe, da área de Biodegradação e Preservação; Varlones Alves e Márcia Helena, da área de Secagem; Júlio César, da área de Desenvolvimento Institucional; Alessandro Moreira e Tereza Pastore, da área de Química; Alexandre Bahia e Elisa Palhares, da área de Anatomia; Luiz Cláudio, da Biblioteca; aos demais amigos que, por ventura, aqui não tenham sido mencionados; bem como, ao chefe geral do laboratório, Celso Schenkel, por me permitir esta grande oportunidade de adquirir novos conhecimentos e ampliar nossas linhas de pesquisa junto à UnB.

Agradeço ao Departamento de Fitopatologia, especialmente aos professores Helson Martins (meu orientador), Juvenil Cares, Adalberto Café, José Carmine Dianese, Zuleide Chaves e Danilo Pinho; e ao Departamento de Biologia Molecular, especialmente à professora Eliane Noronha (minha coorientadora), por ter me recebido com tanta espontaneidade e carinho, aos alunos Pedro Hamann, Alonso Poma, Débora Cunha, Gabrielle Rosa, Jovane Dantas, Raul Alcântara, Francilene Lopes, Hamile Mey, Sadia Ullah, Helder Andrey, Brenda Rabello, Jéssica Pinheiro, Mário Neto e Fabyano Lopes pelo apoio pontual e fundamental.

Agradeço ainda à professora Solange Xavier, da Universidade Estadual de Goiás, fonte de inspiração para o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Trabalho realizado junto aos Departamentos de Fitopatologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob a orientação do professor Dr. Helson Mario Martins do Vale e a coorientação da professora Dr.<sup>a</sup> Eliane Ferreira Noronha, com apoio do Laboratório de Produtos Florestais do Serviço Florestal Brasileiro.

**IDENTIFICAÇÃO E POTENCIAL DEGRADATIVO DE FUNGOS  
LIGNOCELULOLÍTICOS ASSOCIADOS ÀS PODRIDÕES BRANCA E PARDA**

**ANNA SOFYA VANESSA SILVÉRIO DA SILVA**

DISSERTAÇÃO APROVADA em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ por:

---

Dr.<sup>a</sup> Solange Xavier dos Santos  
Universidade Estadual de Goiás (Examinador Externo)

---

Dr. Adalberto C. Café Filho  
Universidade de Brasília (Examinador Interno)

---

Dr. Helson Mario Martins do Vale  
Universidade de Brasília (Presidente - Orientador)

**BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL  
BRASIL  
2018**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>RESUMO GERAL</b> .....	xiv
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	xv
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
1.1 A produção madeireira e os desafios para a sua conservação .....	3
1.1.1 Panorama florestal do Brasil .....	3
1.1.2 Produção madeireira e espécies potenciais .....	4
1.1.3 A estrutura da madeira.....	9
1.1.4 Biodeterioração da madeira, conceitos e implicações econômicas.....	13
1.2 Os fungos lignocelulolíticos .....	18
1.2.1 Caracterização geral, hábito e ciclo de vida.....	18
1.2.2 Identificação molecular.....	23
1.2.3 Mecanismos enzimáticos para degradação da biomassa lenhosa.....	25
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
2.1 Coleção de isolados.....	29
2.2 Reativação da coleção e cultivo monohifal .....	29
2.3 Extração do DNA genômico.....	30
2.4 Amplificação, purificação e sequenciamento do DNA.....	31
2.5 Análises filogenéticas.....	31
2.6 Avaliação da atividade lignocelulolítica .....	33
2.6.1 Ensaio qualitativos.....	33
2.6.2 Ensaio quantitativos.....	34
2.6.2.1 Produção enzimática.....	34
2.6.2.2 Curva de crescimento.....	35
2.7 Teste de durabilidade natural da madeira.....	35
2.7.1 Obtenção da madeira.....	35
2.7.2 Preparo dos frascos de vidro.....	36
2.7.3 Preparo do inóculo.....	37
2.7.4 Ensaio de apodrecimento acelerado.....	37
2.7.5 Determinação da durabilidade natural.....	38
2.7.6 Análises estatísticas.....	39
<b>3 RESULTADOS</b> .....	40

3.1	Identificação molecular.....	40
3.2	Avaliação da atividade lignocelulolítica.....	43
3.2.1	Ensaio qualitativo.....	43
3.2.2	Ensaio quantitativo.....	44
3.2.2.1	Curva de crescimento.....	44
3.2.2.2	Produção enzimática.....	45
3.3	Durabilidade natural.....	47
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais causas de deterioração da madeira.....	15
<b>Tabela 2.</b> Códigos de acesso dos isolados à coleção do USDA e à coleção MCHUB relacionados ao tipo de podridão causada à madeira.....	29
<b>Tabela 3.</b> Sequência nucleotídica dos iniciadores para a região ITS mais LSU e tamanho esperado do amplicon.....	31
<b>Tabela 4.</b> Números de acesso do GenBank e referência das sequências de DNA utilizadas na análise filogenética.....	32
<b>Tabela 5.</b> Classes de resistência a fungos lignocelulolíticos em razão da perda de massa.....	38
<b>Tabela 6.</b> Análises das sequências por comparação via BLASTN no Genbank.....	41
<b>Tabela 7.</b> Classes de resistência de três espécies madeireiras baseadas na perda de massa após ensaio de apodrecimento acelerado com seis Basidiomycota lignocelulolíticos.....	49

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura anatômica da madeira.....	10
<b>Figura 2.</b> Estrutura da Parede Celular: Microscopia Eletrônica de Varredura e esquema representativo evidenciando o ângulo de orientação das microfibrilas de celulose nas diferentes camadas (A e B). ML = lamela média; PCW = parede primária; S1, S2 e S3 = camadas da parede secundária. Escala 5µm.....	11
<b>Figura 1.</b> Interações entre os polímeros da parede celular secundária: hemicelulose (glucoronoxilana); celulose; e lignina.....	12
<b>Figura 4.</b> Características do corpo de prova da madeira <i>Cecropia</i> sp. após degradação por fungo de podridão branca em ensaio de apodrecimento acelerado, segundo a norma ASTM 2017:05.....	19
<b>Figura 5.</b> Características do corpo de prova da madeira <i>Pinus</i> sp. após degradação por fungo de podridão parda em ensaio de apodrecimento acelerado, segundo a norma ASTM 2017:05.....	20
<b>Figura 6.</b> Interações entre <i>Heterobasidion</i> sp. e a árvore, com respectivas infecção dos seus tecidos (I) e degradação saprofítica da madeira (II). São indicadas enzimas e fitotoxinas produzidas pelo fungo para cada estado trófico.....	22
<b>Figura 7.</b> Ciclo de vida típico de fungo de podridão: A - Esporos haplóides dão origem ao micélio monocariótico (n). Quando dois micélios monocarióticos compatíveis se encontram ocorre a plasmogamia e a formação de micélio dicariótico (n+ n); B - Micélio dicariótico penetra através de ferida; C - Infecção dos tecidos vivos; D - Formação do basidioma com basídios; E - Cariogamia; F, G - Meiose; H - Basídios maduros e a formação de quatro basidiósporos.....	22
<b>Figura 8.</b> Relações filogenéticas e principais hábitos de vida no subfilo Agaricomycotina, para as espécies com genoma sequenciado. As principais ordens (Agaricales e Polyporales) são destacadas. Espécies com um asterisco (*) são predominantemente patógenos. <b>Nota:</b> as espécies <i>Schizophyllum commune</i> , <i>Jaapia argillacea</i> e <i>Botryobasidium botryosum</i> não são claramente definidas quanto ao tipo de podridão que causam.....	24

<b>Figura 9.</b> Esquema de ação sinérgica das enzimas sobre a celulose da parede celular vegetal.....	26
<b>Figura 10.</b> Mecanismo de oxidação da lignina. As enzimas LiPs e VPs possuem alto potencial redox e oxidam diretamente a lignina.....	27
<b>Figura 11.</b> Vista em estereomicroscópio da cultura do isolado 1685 em placa de Petri com meio ágar - água utilizado para purificação monohifal. A seta indica o local onde ocorreu a incisão da ponta da hifa.....	30
<b>Figura 12.</b> Confeção dos corpos de prova para o ensaio de apodrecimento acelerado e obtenção da serragem de <i>Swartzia pylonema</i> .....	36
<b>Figura 13.</b> Ensaio de apodrecimento acelerado. Frascos de vidro com as placas suporte das madeiras suscetíveis inoculadas e mantidas em incubadora com temperatura e umidade controladas.....	38
<b>Figura 14.</b> Cálculo da perda de massa nos blocos de madeira submetidos ao TDN.....	38
<b>Figura 15.</b> Análise da reação de PCR para amplificação da região ITS mais LSU por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM: Marcador de massa molecular 1Kb DNA Ladder. 1: controle negativo, 2: isolado 1681, 3: 1682, 4: 1826, 5: 1684 e 6: 1685.....	40
<b>Figura 16.</b> Análise da reação de PCR para amplificação da região ITS mais LSU por eletroforese em gel de agarose a 1%. MM: Marcador de massa molecular 1Kb DNA Ladder. 1: Controle negativo, 2: Isolado 1825, 3: 1826, 4: 1827, 5: 1828 e 6: 1829.....	40
<b>Figura 17.</b> Árvore filogenética da classe Agaricomycetes. A árvore filogenética foi obtida pelo método de máxima verossimilhança com 1000 repetições de bootstrap, fundamentada em sequências da região ITS mais LSU. Os isolados marcados correspondem aos da Coleção do LPF.....	42
<b>Figura 18.</b> Teste qualitativo de atividade enzimática. A atividade foi determinada pelo diâmetro do halo de degradação produzido pelo fungo xilófago, conforme indicado pelas setas. <b>AR</b> : azul de remazol (atividade de enzimas ligninolíticas); <b>XIL</b> : xilana (atividade de xilanases); e <b>CMC</b> : carboximetilcelulose (atividade de endoglucanases).....	43
<b>Figura 19.</b> Avaliação da atividade de CMCase, xilanase e lacase por teste em placa. A atividade foi expressa pelo halo de degradação produzido por cada um dos isolados frente aos substratos CMC, xilana e azul de remazol.....	44

<b>Figura 20.</b> Curvas de crescimento dos isolados Auriculariales (Au_1682), <i>G. trabeum</i> (Gt_1828), <i>M. incrassata</i> (Mi_1829) e <i>T. versicolor</i> (Tv_1681) cultivados em meio mínimo líquido contendo serragem da madeira <i>Swartzia psilonema</i> como única fonte de carbono. A concentração de proteína intracelular foi utilizada como parâmetro de análise de crescimento.....	44
<b>Figura 21.</b> Avaliação da produção de endoglucanases (a), celulases totais (b), xilanases (c) e lacases (d) pelos isolados Auriculariales (Au_1682), <i>G. trabeum</i> (Gt_1828), <i>M. incrassata</i> (Mi_1829) e <i>T. versicolor</i> (Tv_1681) quando cultivados em meio mínimo contendo serragem da madeira <i>S. psilonema</i> como única fonte de carbono.....	46
<b>Figura 22.</b> Placas suporte do grupo controle não inoculadas e corpos de prova colonizados por <i>Trametes versicolor</i> .....	47
<b>Figura 23.</b> Crescimento micelial do fungo Auriculariales sobre os corpos de prova de <i>S. psilonema</i> , nas condições do teste de durabilidade natural, segundo a norma ASTM 2017:2005. As letras correspondem, respectivamente: <b>A</b> - crescimento micelial sobre a superfície do CP; <b>B</b> - dano aparente à estrutura das fibras da madeira; <b>C</b> e <b>D</b> - crescimento no interior do vaso.....	48
<b>Figura 24.</b> Gráfico com as médias das perdas de massa (%) decorrentes da ação de seis Basidiomycota lignocelulolíticos sobre: <i>Cecropia</i> sp. (controle para fungos de podridão branca), <i>Pinus</i> sp. (controle para fungos de podridão parda) e <i>S. psilonema</i> (teste).....	48
<b>Figura 25.</b> Estruturas fúngicas coletadas dos corpos de prova do ensaio de apodrecimento acelerado com o fungo Polyporales indeterminado. As letras A e B representam as imagens das estruturas coletadas após a limpeza dos corpos de prova.....	49

## RESUMO GERAL

SILVA, Anna Sofya Vanessa Silvério da Silva. **Identificação e potencial degradativo de fungos lignocelulolíticos associados às podridões branca e parda.** 2018. 70p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O Brasil é um dos principais países produtores de madeira tropical no mundo, com destaque ao setor madeireiro da Amazônia, cuja atividade de exploração madeireira é intensa. O Laboratório de Produtos Florestais (LPF), entre as suas linhas de atuação, busca identificar e caracterizar tecnologicamente as madeiras dos diversos biomas brasileiros, conferindo-lhes a possibilidade de novos usos. Através da área de Biodegradação e Preservação, mantém a Coleção de fungos xilófagos como fonte de recursos biológicos viáveis ao desenvolvimento de suas pesquisas, especialmente para os testes de durabilidade natural da madeira (TDN). Essa é uma propriedade inerente à cada espécie madeireira que determina, em grande parte, a sua utilização, principalmente, em condições tropicais. Entre as principais causas de sua biodeterioração estão os fungos causadores de podridão, que podem degradar a madeira da árvore viva ou pós-colheita. Esses fungos são lignocelulolíticos, estando em sua maior parte classificados no filo Basidiomycota, onde são encontradas as espécies mais eficientes na degradação da biomassa lenhosa, que são essenciais ao ciclo global do carbono. Este trabalho apresentou o objetivo geral de identificar e caracterizar os isolados pertencentes à Coleção de fungos xilófagos do LPF associados às podridões branca e parda, e como objetivos específicos: confirmar a identidade dos isolados por meio de caracterização molecular; realizar triagem dos isolados com maior atividade enzimática; realizar ensaios enzimáticos para produção e caracterização de enzimas; realizar ensaios colorimétricos para obtenção de suas curvas de crescimento; e avaliar o potencial biodegradativo dos isolados por meio de ensaio de apodrecimento acelerado. Os isolados foram submetidos à técnica de purificação monohifal para, em seguida, serem utilizados nos testes. A identificação molecular final foi obtida por análises filogenéticas através do método de máxima verossimilhança. A caracterização enzimática foi realizada por meio de testes para CMCases, xilanases, FPases e lacases com os sobrenadantes de cada isolado, em dez dias de cultivo, sob agitação a 120 rpm e 28 °C, em meio mínimo com serragem de *Swartzia pylonema* como fonte lignocelulósica. As curvas de crescimento foram determinadas por método indireto de quantificação de proteína intracelular. As análises moleculares permitiram gerar uma árvore filogenética para a classe Agaricomycetes, posicionando os isolados em clados segundo as suas respectivas ordens. A caracterização enzimática resultou na obtenção de curvas de atividades específicas, para as quais o isolado *Trametes versicolor* apresentou os maiores valores de atividade. O isolado da ordem Auriculariales indeterminado apresentou a maior taxa de crescimento, em detrimento dos menores valores de atividade enzimática observados. O ensaio de apodrecimento acelerado contribuiu para atestar o potencial biodegradativo de seis isolados, sendo que as maiores perdas de massa em *S. pylonema* foram registradas nos ensaios com *Gloeophyllum trabeum* e o isolado da ordem Polyporales indeterminado. Os resultados obtidos permitiram a autenticação parcial da coleção e a sugestão de novos mecanismos para o seu gerenciamento, com mudanças nos atuais métodos de preservação empregados. Os resultados ainda corroboraram a caracterização tecnológica pioneira quanto à durabilidade natural da madeira de *S. pylonema*.

**Palavras-chave:** madeira, micoteca, biodegradação, caracterização, durabilidade natural.

---

Orientador - Dr. Helson Mario Martins do Vale - Universidade de Brasília

## GENERAL ABSTRACT

SILVA, Anna Sofya Vanessa Silvério da Silva. **Identification and degradation potential of lignocellulolytic fungi associated with white and brown rot.** 2018. 70p. Dissertation (Master in Plant Phatology) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Brazil is one of the main tropical timber producing countries in the world, with emphasis on the timber industry in the Amazon, whose logging activity is intense. The Forest Products Laboratory (LPF), among its lines of action, seeks to identify and technologically characterize the wood of the various Brazilian biomes, granting them the possibility of new uses. Through the area of Biodegradation and Preservation, it maintains the Collection of xylophagous fungi as a source of viable biological resources for the development of their researches, especially for the tests of natural durability of wood (TDN). This is an inherent property of each species of wood which largely determines its use, mainly in tropical conditions. Among the main causes of its biodeterioration are rotting fungi, which can degrade living or post-harvest tree wood. These fungi are lignocellulolytic, being mostly classified in the phylum Basidiomycota, where the most efficient species are found in the degradation of the woody biomass, which are essential to the global carbon cycle. This work presented the general objective of identifying and characterizing the isolates belonging to the LPF xylophagous fungi associated to white and brown rot, and specific objectives: to confirm the identity of the isolates by means of molecular characterization; screening of isolates with higher enzymatic activity; performing enzymatic assays for the production and characterization of enzymes; to perform colorimetric assays to obtain their growth curves; and to evaluate the biodegradable potential of the isolates by means of the accelerated rotting test. The isolates were submitted to the monohifal purification technique and then used in the tests. The final molecular identification was obtained by phylogenetic analysis using the maximum likelihood method. The enzymatic characterization was performed by means of tests for CMCase, xylanases, FPase and laccases with the supernatants of each isolate, in ten days of cultivation, under agitation at 120 rpm and 28 °C, in a medium with *Swartzia psilonema* sawdust as a lignocellulosic source. Growth curves were determined by indirect method of intracellular protein quantification. The molecular analyzes allowed to generate a phylogenetic tree for the class Agaricomycetes, positioning the isolates in clades according to their respective orders. The enzymatic characterization resulted in the obtaining of curves of specific activities, for which the isolate *Trametes versicolor* presented the highest values of activity. The isolate of the order Auriculariales undetermined showed the highest growth rate, in detriment of the lowest values of enzymatic activity observed. The accelerated rotting assay contributed to the biodegradation potential of six isolates, and the highest mass losses in *S. psilonema* were recorded in the *Gloeophyllum trabeum* assays and the indeterminate Polyporales isolate. The results obtained allowed the partial authentication of the collection and the suggestion of new mechanisms for its management, with changes in the current preservation methods employed. The results also corroborated the pioneering technological characterization of the natural durability of *S. psilonema* wood.

**Key words:** wood, fungi collection, biodegradation, characterization, natural durability.

---

Dr. Helson Mario Martins do Vale - Universidade de Brasília

## INTRODUÇÃO

A madeira é um recurso renovável de grande valor e importância ecológica, econômica e social (ZABEL & MORREL, 1992; SNIF, 2016a). O Brasil possui grande parte de seu território coberto por florestas naturais e plantadas (dos 493,5 milhões de hectares, 485,8 são de florestas nativas e 7,7 milhões são de florestas plantadas), o que o torna a segunda maior área de florestas do mundo, seguinte à Rússia. Neste âmbito, encontram-se refletidos os bens e serviços que os ecossistemas florestais fornecem, tais como fonte de material genético, alimento, armazenamento de água em bacias hidrográficas, reservatórios e aquíferos, proteção de habitats, regulação de gases que afetam o clima, fonte de matéria-prima como madeira, combustíveis e fibras, entre outros (SNIF, 2016b).

A utilização da madeira como material estrutural, combustível e matéria bruta industrial (ZABEL & MORREL, 1992) é determinada por dois fatores básicos: sua durabilidade natural e sua preservação. O seu uso é afetado em grande parte por agentes degradadores, entre os quais, destaca-se a degradação biológica, pelas grandes perdas nos vários tipos de produtos florestais. Os fungos são os principais agentes biológicos que degradam os constituintes da parede celular da madeira, produzindo quebra de sua estrutura. Como forma de avaliar a resistência natural e de madeira tratada, são realizados ensaios de apodrecimento acelerado em laboratório, que avaliam, principalmente, a perda de massa da madeira causada por estes organismos (MENDES & ALVES, 2002).

Os fungos que causam podridão podem degradar tanto a madeira da árvore viva, quanto morta, sendo considerados xilófagos ou lignocelulolíticos (STANCHEVA *et al.*, 2009). No filo Basidiomycota, estão os fungos mais eficientes na decomposição da biomassa lenhosa, os quais são essenciais ao ciclo global do carbono (HISCOX *et al.*, 2018). Esse filo compreende 32% de todos os fungos descritos, que são importantes sob diversos aspectos para o setor florestal, agricultura e medicina (RILEY *et al.*, 2014a).

Segundo dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), os 26.000 taxa de Basidiomycota são divididos em três subfilos: Agaricomycotina (~22.000 taxa), Pucciniomycotina (~2.300 taxa) e Ustilaginomycotina (~1.000 taxa). Entre os Agaricomycotina estão os principais fungos decompositores de madeira (RILEY *et al.*, 2014a). Estes fungos produzem enzimas conhecidas pela capacidade de degradar os principais constituintes da madeira: celulose, hemicelulose e lignina (BASHIR *et al.*, 2015). Este trabalho tem o objetivo geral de identificar e caracterizar os isolados pertencentes à Coleção de fungos xilófagos do LPF associados às podridões branca e parda e como objetivos

específicos: confirmar a identidade dos isolados por meio de caracterização molecular; realizar triagem dos isolados com maior atividade enzimática; realizar ensaios enzimáticos para produção e caracterização de enzimas; realizar ensaios colorimétricos para obtenção de suas curvas de crescimento; e avaliar o potencial biodegradativo dos isolados por meio de ensaio de apodrecimento acelerado utilizando madeiras de reconhecida baixa resistência à degradação: *Cecropia* sp. e *Pinus* sp.; e a madeira de *Swartzia psilonema*, com o intuito de contribuir para sua caracterização quanto à durabilidade natural.

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 A produção madeireira e os desafios para a sua conservação

### 1.1.1 Panorama florestal do Brasil

O Brasil, reconhecidamente um país florestal, possui 58% do seu território coberto por florestas naturais e plantadas, cuja produção madeireira sustenta-se através da silvicultura e do extrativismo vegetal, atividades estas que contribuem com o grande percentual da produção primária florestal (FAO - FRA, 2015; IBGE, 2015).

No senso comum, as florestas são concebidas por vegetação composta, principalmente, de indivíduos lenhosos, cujos sinônimos são bosque, mata, mato, capoeira, selva, entre outros. Porém, ao se tratar de uma definição científica objetiva, necessária ao estabelecimento de regulamentos e normas governamentais, nacionais e internacionais, para os quais não pode haver dúvidas de interpretação, o termo “florestas” pode ser definido com base em diversos aspectos (SNIF, 2016a).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), considerando os aspectos de uso e ocupação do solo, o conceito de floresta constitui: “*área medindo mais de 0,5 ha com árvores maiores que 5 m de altura e cobertura de copa superior a 10%, ou árvores capazes de alcançar estes parâmetros in situ. Isso não exclui terra que está predominantemente sob uso agrícola ou urbano*”.

No âmbito das florestas públicas e seus recursos, o governo federal tem adotado os conceitos relacionados às tipologias vegetais contidas na Avaliação Global dos Recursos Florestais (FRA) da FAO. No contexto dos recursos florestais madeireiros, embora as florestas nativas ocupem uma área muito maior, representam apenas 9% da produção, oriunda de áreas legalmente manejadas, enquanto as florestas plantadas no país são responsáveis por 91% de toda madeira produzida (IBÁ, 2015).

Os gêneros de árvores *Pinus* e *Eucalyptus* apresentam espécies de rápido crescimento e passaram a ser amplamente cultivados a partir dos anos 60, favorecidos pelos incentivos fiscais e programas de governo no período. Dessa maneira, historicamente, as florestas plantadas passaram a desempenhar a função de suprir a demanda por produtos florestais, substituindo, progressivamente, os oriundos da extração vegetal de origem nativa (ÁVILA *et al.*, 2017).

Considerando o crescimento do setor madeireiro, com a expansão das plantações, observa-se também um crescente aumento da produtividade, associado a fatores como o

melhoramento genético, através da seleção de espécies com características relevantes à produção de madeira, o emprego de tecnologias avançadas para o manejo florestal e a colheita, e o controle de pragas (DE ARAUJO *et al.*, 2017).

Acrescentam-se ainda as condições edafoclimáticas e fundiárias favoráveis, verticalização do setor e qualidade da mão de obra, fundamentais para a produtividade por hectare, o que favoreceu, dessa forma, um menor ciclo de colheita frente a outros países produtores (ABRAF, 2013).

### **1.1.2 Produção madeireira e espécies potenciais**

A produção florestal, retratada em pesquisas anuais como a Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura (PEVS) realizada pelo IBGE, pode ser dividida em produtos madeireiros e não madeireiros (SNIF, 2016a). Os produtos madeireiros constituem os materiais lenhosos de origem vegetal que podem ser beneficiados em produtos duráveis. Já os não madeireiros compreendem os produtos de origem vegetal não lenhosos, tais como óleo, resina, sementes, cipó, plantas ornamentais, bem como serviços sociais e ambientais. No âmbito da construção civil, que inclui, entre outros, os derivados da madeira, poderia ser considerada uma terceira categoria: as estruturas de madeira (DE ARAUJO *et al.*, 2017; SNIF, 2016a).

De acordo com a PEVS, os principais produtos madeireiros, cujos dados de quantidade e valor da produção referem-se à exploração dos recursos vegetais naturais e de maciços plantados, são: carvão vegetal, lenha e madeira em tora, divididos em duas categorias com base na destinação de uso: madeira para combustível (carvão) e madeira para uso industrial (produção de serrados, laminados, chapas, celulose, entre outros (IBGE, 2015).

Os segmentos industriais envolvidos na produção florestal de áreas plantadas são prioritariamente representados pelos setores de Celulose e Papel (papéis em geral e embalagens); Painéis de Madeira Industrializada (MDF, aglomerados, chapas de fibra, OSB, HDF, lâminas); Processamento Mecânico (madeira serrada, vigas, tábuas, PMVA, pranchas, ripas, sarrafos, compensados); Madeira Tratada (mourões, postes, cruzetas, pilares, cercas, muros, dormentes); Siderurgia a Carvão Vegetal (ferro gusa, ferro liga, aço); e Energia (lenha industrial, biomassa, pellets) (ABRAF, 2013).

No período de 2000 a 2011, países emergentes como Rússia, China e Brasil apresentaram uma crescente integração ao comércio mundial de produtos madeireiros, enquanto alguns países tradicionalmente líderes no setor tiveram queda em suas balanças

comerciais, a exemplo do Canadá, cuja exportação de produtos florestais apresentou um decréscimo de 18% no mesmo período, associado à queda do mercado imobiliário norte-americano e à redução das exportações para o Japão (KOEDEL *et al.*, 2016). Este registro corrobora a crescente expansão da indústria brasileira de base florestal que, em 2012, registrou um crescimento das exportações e do consumo interno dos principais produtos florestais (ABRAF, 2013).

O volume de exportação de celulose, proveniente de áreas plantadas, tem participado significativamente para o Produto Interno Bruto (PIB). O ano de 2014 foi expressivo para o setor, visto que contribuiu com o aumento de 1,7% no PIB, frente ao desempenho de setores tradicionais como a indústria (1,2%), a agropecuária (0,4%) e o setor de serviços (0,7%). A receita das exportações alcançou US\$ 8,49 bilhões e as importações diminuíram 3,1%. Esse quadro evidenciou a importância crescente do setor para a economia do país (IBÁ, 2015).

Nesse mesmo ano, a produção madeireira brasileira obteve destaque para papel e cartão (13.100.071 ton/R\$ 22,8 bilhões), celulose (11.952.090 ton/R\$ 14,2 bilhões) e painéis de fibra (8.854.150 m<sup>3</sup>/R\$ 5 bilhões). Em 2015, a madeira em tora para papel e celulose foi o principal produto, contribuindo com 62,0% do total obtido pela silvicultura, proveniente do plantio de eucalipto. Em relação às exportações, o produto madeireiro historicamente mais exportado foi a celulose que teve a China como principal país importador, cujo montante de produtos madeireiros importados do Brasil alcançaram o valor de US\$ 2.059.321.632, ocupando o segundo lugar da lista dos cinco principais países importadores: Estados Unidos, China, Países Baixos, Itália e Argentina (IBGE, 2015; SNIF, 2016a).

Em 2018, o PIB apresentou crescimento de 1,2% no primeiro trimestre, em relação ao mesmo período de 2017, favorecido mais uma vez pela produção de papel e celulose, entre outros segmentos (IBGE, 2018).

A silvicultura apresentou área total de 10.023.076 hectares, segundo os dados da PEVS em 2016, sendo a Região Sul a principal produtora (3.736.702 hectares); seguida pela Região Sudeste (3.363.590 hectares); Região Centro-Oeste (1.411.549 hectares); Região Nordeste (908.832 hectares) e Região Norte (602.403 hectares). Do total de área plantada no país, 75,3% corresponde a eucalipto; 20,7% a pinus; e 4,0% a outras espécies (IBGE, 2016).

A exploração dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus* em regiões de florestas plantadas é intensa favorecendo uma diminuição da biodiversidade, tornando-as mais suscetíveis a doenças e pragas florestais quando comparadas às florestas naturais. A indústria florestal, com vistas a aumentar sua oferta de madeira, necessita constantemente encontrar alternativas e,

para isso, busca variedades de espécies arbóreas que possam suprir adequadamente a demanda (FAO, 2007).

A busca por novas espécies tem por finalidade superar os entraves para a maior utilização da madeira, portanto, torna-se imprescindível mais conhecimentos técnicos sobre essa matéria-prima e o combate eficiente à exploração ilegal e depredatória das florestas (ZENID, 1997).

No que tange ao tema, inúmeras proibições têm sido impostas dentro de um contingente de políticas públicas que consideram, entre outros fatores, a conservação dos recursos florestais e a avaliação de risco ambiental, relevantes na prevenção de desastres naturais, como deslizamentos de terra e inundações, todos relacionados à extração excessiva para fins comerciais. Contudo, também são observados, como resultados destas proibições, as perturbações em mercados, as restrições nas oportunidades de empregos, as pressões sobre comunidades dependentes das florestas e a busca por outras regiões de exploração madeireira (FAO, 2007).

Como exemplo de tais regiões, no início da história brasileira, ao que se chamou de primeiro ciclo econômico do país, temos a região litorânea, do Nordeste ao Sul, com a Mata Atlântica, na qual o pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), espécie de madeira que deu nome à nossa pátria, foi exaustivamente explorada pelos portugueses, no Brasil colônia (CASTRO, 2002). No decorrer da história, a região que compreende a chamada Mata das Araucárias, floresta mista que se estende do Rio Grande do Sul ao sul de Minas Gerais, tornou-se o berço da indústria de base florestal brasileira. Nas duas tipologias florestais, predominou a forte exploração durante décadas da peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*) e do pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia*) (ZENID, 1997).

A este período de forte pressão extrativista, que abasteceu a maior parte dos mercados até o ano de 1970, sucederam a exaustão destes biomas e a criação, por parte do governo, de projetos para o desenvolvimento da região Amazônica. A biodiversidade desta região, porém, representou um desafio às empresas de processamento mecânico, em virtude das diferenças nas características anatômicas, químicas e mecânicas entre as espécies madeireiras e, inclusive, dentro da espécie. A caracterização tecnológica dessas espécies veio a possibilitar, através de estudos pioneiros e laudos técnicos, a alocação em grupos com indicações de uso específicas (ALVES & MENDES, 2002; ZENID, 1997).

A exploração madeireira nessa região no decorrer dos anos passou a ocorrer sob forte pressão legal e ambiental por parte de governos e órgãos nacionais e internacionais, bem

como da sociedade em geral, e inclui, entre outras, restrições aos ciclos de colheita, definição de limites mínimos ao diâmetro de corte, preservação de árvores e sementes de espécies raras, proteção de vegetação ribeirinha e da vida selvagem (MACPHERSON *et al.*, 2012).

Corroborando estas limitações, estão as restrições impostas à importação de madeiras tropicais pelos países do hemisfério norte, especialmente, os da Europa Ocidental, que preconizam os princípios da sustentabilidade e exploração socialmente justa e economicamente viável, dentro de um sistema de certificação ambiental. Contudo, a madeira certificada ainda representa um problema para a indústria de base florestal. Desta forma, preconizam-se requisitos mínimos para a comercialização do produto, tais como: a comprovação de origem, conseqüentemente, com autorização do órgão ambiental competente e o atendimento às restrições legais impostas ao uso de espécies tradicionais, a exemplos do ipê (*Tabebuia* spp.) e do mogno (*Swietenia macrophylla*), possibilitando substituí-las por outras espécies sem risco de extinção e cujas características possam atender às demandas de mercado (JUVENAL & MATTOS, 2002; ZENID, 1997).

Aliado a uma demanda crescente, e considerando a grande diversidade de espécies florestais nos diferentes biomas do Brasil, ocorre a necessidade de expansão das áreas legalmente manejadas, não apenas como fonte de recursos madeireiros como também de não madeireiros, e isso permite, entre outros aspectos, a geração de serviços ambientais imprescindíveis; emprego e renda às comunidades que delas dependem; manejo sustentável; destinação de usos variados para a madeira; e um maior valor agregado ao produto final (GARIGLIO *et al.*, 2010).

Iniciativas governamentais retratam este cenário de expansão, ao considerar outras regiões com grande potencial, que necessitam ser conhecidas quanto aos possíveis usos de seus recursos. Como exemplo, o Serviço Florestal Brasileiro, órgão vinculado ao Ministério do Meio Ambiente, apoia projetos de manejo sustentável no bioma Caatinga, que se destaca pela significativa área de abrangência regional e comprovada oferta de recursos florestais (GARIGLIO, 2015). Porém, para que haja a aceitação da madeira desta região faz-se necessário a caracterização tecnológica, que viabilizará seus usos potenciais, conforme suas propriedades físicas e biológicas. Dessa forma, a valorização da Caatinga possibilita diminuir a pressão sobre a Amazônia, principal mercado de madeiras nativas no país. Neste contexto, o referido órgão tem caracterizado diversas espécies do bioma, entre endêmicas e não endêmicas, conhecidas pelos nomes populares: chapada (*Terminalia fagifolia*); coração-de-negro (*Machaerium* cf. *brasiliensis*); rama-de-bezerra (*Pityrocarpa moniliformis*); piquiá-

cascado (*Aspidosperma pyrifolium*); jacarandá-de-sangue (*Swartzia psilonema*); Sipaúba (*Combretum glaucocarpum*); pau-amarelo (*Pterodon abruptus*); entre outras árvores (SOUZA, 2017). Entre essas espécies, *Swartzia psilonema*, tem recebido certa atenção em virtude de algumas de suas características fenotípicas que a torna atrativa em termos de produção madeireira.

A primeira revisão do gênero *Swartzia* ocorreu em 1968 por Riciaro S. Cowan, que estudou 127 espécies distribuídas pela América Tropical, das quais 55 de ocorrência brasileira, sendo a Amazônia seu centro de dispersão (MEIRELLES & SOUZA, 2015). Esse gênero fornece madeira de excelente qualidade e possui características que assemelham-no ao jacarandá, algumas espécies de *Swartzia*, inclusive, são popularmente conhecidas por este nome. Aspectos fenotípicos de algumas espécies como o cerne negro ou ébano conferem padrões de alto valor comercial (MANAUS-ITACOATIARA *et al.*, 1975).

Pertencente à família botânica Fabaceae (Leguminosae), o referido gênero possui cerca de 144 espécies aceitas, também encontradas em outras regiões brasileiras além da Amazônica, como o Nordeste, na Mata Atlântica; o Sul, no estado do Rio Grande do Sul; e o Centro-Oeste, especialmente em Mato Grosso. Para além do continente americano, existem apenas duas espécies endêmicas descritas na África (ANGYALOSSY-ALFONSO & MILLER, 2002).

Algumas espécies foram relatadas para o bioma Caatinga, após diversos levantamentos florísticos e fitossociológicos realizados em áreas consideradas prioritárias para conservação (ARAÚJO *et al.*, 2005). Cabe ressaltar que esse é considerado o único bioma endêmico e encontra-se predominantemente no semi-árido nordestino, cobrindo cerca de 10% do território nacional, nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e norte de Minas Gerais. Apresenta períodos de seca prolongados, altas taxas de evapotranspiração e solos com baixa taxa de retenção de água (MENDES & CASTRO, 2010).

Na região Sudeste, três novas espécies também foram descritas por Mansano & Tozzi (1999). Este quadro geral demonstra a necessidade proeminente de mais estudos regionais sobre o gênero *Swartzia*, considerando principalmente o tempo decorrido de sua última revisão (MANSANO & LIMA, 2007).

A madeira das espécies desse gênero constitui seu principal produto de valor econômico, com excelentes propriedades tecnológicas. As características típicas do lenho as tornam atrativas para o setor de marcenaria de luxo, a exemplo da madeira obtida da árvore

*Swartzia laevis* (MEIRELLES & SOUZA, 2015).

A referida espécie, juntamente a um pequeno grupo de espécies de outros gêneros, representaram mais de 90% do total de espécies fornecedores de madeira extraída das florestas dos países que constituem as Guianas (Guiana, Suriname e Guiana Francesa) no século passado. Este grupo apresenta características de durabilidade, força, resiliência ao fogo, entre outras, que contribuíram para o estabelecimento da indústria madeireira da região, com impulso ao mercado externo. Porém, como ocorre em outros países tropicais com grande diversidade biológica, muitas outras espécies ainda desconhecidas apresentam características equiparáveis às demais madeiras de valor comercial, o que as tornam recursos potenciais viáveis ao comércio (HAMMOND *et al.*, 1996).

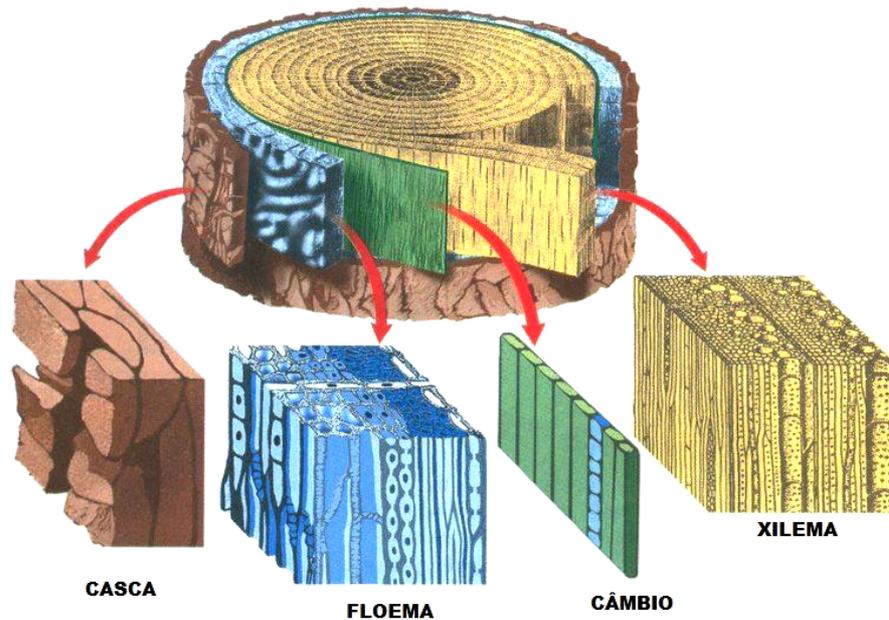
As espécies de *Swartzia* são descritas, de modo geral, como árvores de médio a grande porte, com algumas exceções de arbustos, variando em torno de 3 a 30 m de comprimento, que crescem em áreas não inundadas, vegetação ciliar e cerrado; alburno com variação de cor de amarelo-claro a branco; e cerne com tons de castanho a marrom ou preto. As suas características assemelham-nas às de madeiras nobres como o *Brazilian rosewood*, o já referido jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra*) e o ébano (*Diospyros* spp.). Constituem matéria-prima para fabricação de móveis, pisos, itens decorativos, esculturas, entre outras (ANGYALOSSY-ALFONSO & MILLER, 2002).

Adicionalmente, algumas espécies apresentam características fitoquímicas relevantes como a presença dos seguintes metabólitos secundários: isoflavonóides, saponinas triterpênicas e diterpenos aromáticos, componentes químicos com atividade antimicrobiana, antifúngica, moluscicida e citotóxica (MARQUI *et al.*, 2008).

### **1.1.3 A estrutura da madeira**

A madeira é uma matéria-prima obtida das árvores, de constituição heterogênea e variável por se tratar de um produto do seu metabolismo. As principais espécies arbóreas encontram-se dentro das angiospermas, grupo de plantas cuja principal característica é a presença de flores e frutos com sementes em seu interior. No entanto, muitas outras espécies estão entre as gimnospermas, grupo botânico com a característica típica de “sementes nuas” ou ausência de fruto envolvendo a semente. Para a indústria, existe a classificação artificial que determina que as madeiras obtidas de angiospermas sejam denominadas *hardwood* ou “madeira dura” e as obtidas de gimnospermas de *softwood* ou “madeira macia” (RAMAGE *et al.*, 2017).

O conhecimento da sua estrutura é indispensável para sua utilização racional. As regiões do tronco compreendem, de fora para dentro, a casca externa (ritidoma), casca interna (floema), câmbio, alburno (a madeira dessa região é geralmente mais clara, leve e mais suscetível ao ataque de pragas e microrganismos), cerne e medula (Figura 1). O cerne apresenta durabilidade natural maior que o alburno e a principal razão é a presença de extrativos tóxicos aos organismos degradadores de madeira (CORADIN & CAMARGOS, 2002).



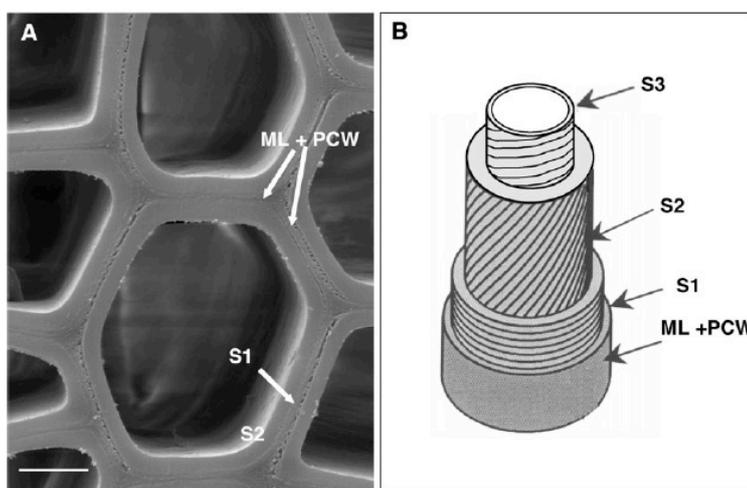
**Figura 1.** Estrutura anômica da madeira. Adaptado de JUBILUT, 2014.

O estudo dessa estrutura pode ser detalhado em níveis. Ao considerarmos a árvore e o tipo de madeira por ela produzido, nos referimos ao nível macro; os produtos madeireiros como móveis, pisos e painéis, ao nível sub-macro; os elementos constitutivos como o alburno, o cerne, os anéis de crescimento, etc., ao nível micro; as estruturas celulares como lúmen, pontuações, raios e vasos, ao nível sub-micro; e, finalmente, a constituição da parede celular (celulose, hemicelulose e lignina), suas ligações químicas, bem como extrativos presentes e demais componentes orgânicos e inorgânicos, tratamos de um estudo a nível molecular (NILSSON & ROWELL, 2012).

Portanto, ao se considerar o ponto de vista microanalítico, o seu processo de formação biológica é complexo e inicia-se a partir de um tecido vegetal de transição chamado câmbio vascular, sendo então composta basicamente de xilema secundário. Deste tecido, são diferenciadas as células que farão parte do xilema e do floema (angiospermas). Em seguida, na formação da parede celular, ocorrem os processos de lignificação e orientação do ângulo

das microfibrilas, que influenciam diretamente as características da madeira (DÉJARDIN *et al.*, 2010). Suas propriedades químicas e mecânicas dependem principalmente das propriedades da parede celular, principalmente a secundária (MELLEROWICZ & SUNDBERG, 2008).

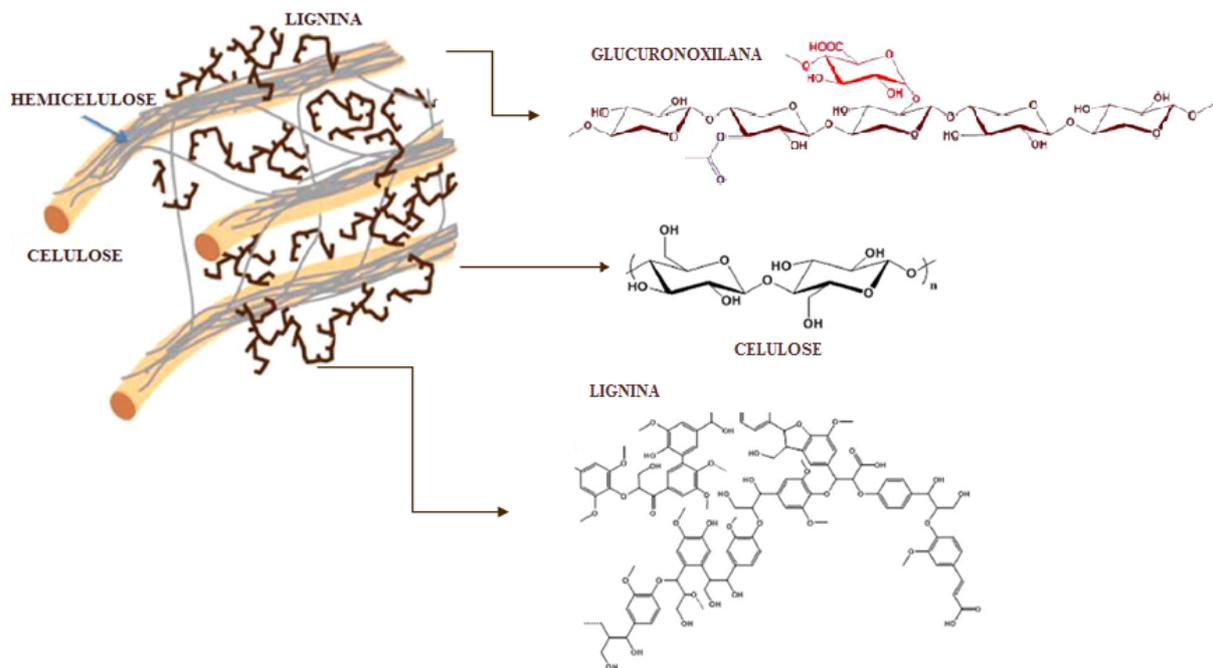
A parede celular é formada de múltiplas camadas, diferentes quanto à organização das microfibrilas e proporções de celulose, hemicelulose, lignina e pectina (Figura 2). A parede primária (P) compreende a lamela média (LM) e é formada por pectina e xiloglucana, com concentrações de lignina superiores às camadas subsequentes (MELLEROWICZ & SUNDBERG, 2008). A parede secundária é subdividida nas camadas S1, S2 e S3 compostas de microfibrilas de celulose envoltas por uma matriz de hemicelulose e lignina (DÉJARDIN *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Estrutura da Parede Celular: Microscopia Eletrônica de Varredura e esquema representativo evidenciando o ângulo de orientação das microfibrilas de celulose nas diferentes camadas (A e B). ML = lamela média; PCW = parede primária; S1, S2 e S3 = camadas da parede secundária. Escala 5 $\mu$ m (DÉJARDIN *et al.*, 2010).

A celulose é o material orgânico mais abundante da terra e o principal constituinte da madeira, compondo entre 40% e 50% de seu peso seco. É um polímero de alto peso molecular, altamente ordenado, formado por moléculas de glicose que se unem através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas formando cadeias lineares que interagem entre si através de ligações de hidrogênio, constituindo então as microfibrilas, unidades básicas de celulose insolúveis em água e cristalinas (CARVALHO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; LE *et al.*, 2015; RAMAGE *et al.*, 2017).

A união entre as microfibrilas em uma matriz de hemicelulose e lignina, através de interações físicas e ligações covalentes, constitui então a fibrila de celulose (Figura 3).



**Figura 2.** Interações entre os polímeros da parede celular secundária: hemicelulose (glucuronoxilana); celulose; e lignina. Adaptado de Ramage *et al.*, 2017.

O segundo principal constituinte da madeira é a hemicelulose que compreende de 25 a 35% da sua massa seca. Está presente em maior quantidade nas *hardwood* ou folhosas (em torno de 35%) que nas *softwood* ou madeiras de coníferas (em torno de 28%). São grupos distintos de polissacarídeos na parede celular formando um polímero heterogêneo que pode conter pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose), ácidos urônicos ( $\alpha$ -d-glucurônico,  $\alpha$ -d-4-O-metilgalacturônico e  $\alpha$ -d-galacturônico) e grupos acetila (CARVALHO *et al.*, 2009; LE *et al.*, 2015).

Nas folhosas, as hemiceluloses são ricas em xilanas e possuem menores quantidades de glicomananas, enquanto as coníferas apresentam maiores quantidades de galatoglicomananas acetiladas e menores proporções de xilana. A principal função da hemicelulose é unir as microfibrilas de celulose, conferindo rigidez à estrutura da parede celular (CARVALHO *et al.*, 2009; LE *et al.*, 2015).

O terceiro principal constituinte estrutural desse material é a lignina que está presente entre 23 a 33% em coníferas e 16 a 25% em folhosas. É uma macromolécula sintetizada a partir de monômeros de alcoóis p-hidroxi-cinâmílicos ou monolignóis: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico, que diferem entre si de acordo com a posição dos grupos metoxil em seu ciclo aromático. Ela forma uma rede tridimensional de unidades de fenilpropanóide:

siringil - S (originadas do álcool sinapílico), guaiacil - G (originadas do álcool coniferílico) e  $\rho$ -hidróxifenil - H (derivadas do álcool  $\rho$ -cumarílico) que se ligam covalentemente às hemiceluloses, conferindo força e rigidez à parede celular e impermeabilidade ao sistema vascular (CARVALHO *et al.*, 2009; DÉJARDIN *et al.*, 2010; LE *et al.*, 2015).

Por conseguinte, entre as paredes celulares existe uma região conhecida por lamela média, altamente lignificada e que forma um complexo lignina-pectina que funciona como “cimento” entre paredes de células adjacentes. Dessa forma, entende-se que a composição e estrutura da parede celular estão entre os principais fatores que condicionam as características da madeira que é um material anisotrópico, ou seja, suas propriedades físicas diferem de acordo com o ângulo formado entre as fibrilas de celulose e o eixo longitudinal da célula, sendo este um fator crítico que determina suas propriedades estruturais e mecânicas (RAMAGE *et al.*, 2017).

#### **1.1.4 Biodeterioração da madeira, conceitos e implicações econômicas**

A deterioração da madeira de modo geral pode ter origem abiótica ou biótica. É o resultado da ação de fatores físicos, químicos, mecânicos e de agentes biológicos (Tabela 1), decorrente das condições de exposição a que este material é submetido ao longo de sua vida útil (BRITO, 2014).

Em virtude da sua natureza biológica, é um material suscetível ao ataque de diversos organismos, denominados conjuntamente “xilófagos” e, em alguns casos, conhecidos também por “apodrecedores”. Entre eles encontram-se fungos, bactérias, cupins, besouros e brocas marinhas, importantes agentes que podem reduzir drasticamente sua vida útil (SUNDARARAJ *et al.*, 2015).

A deterioração biológica nada mais é que o resultado das funções vitais desses diferentes organismos, cujos efeitos diretos são principalmente químicos e mecânicos. Está intimamente relacionada aos fatores ambientais, tecnológicos e sociais. É um fenômeno complexo e contínuo sobre o qual os agentes deterioradores alteram as propriedades da madeira tornando-a mais suscetível ao ataque por outros organismos (BRITO, 2014; KONSA *et al.*, 2014). Em alguns casos, estão envolvidas perdas que vão além das econômicas, como é o caso de deterioração de objetos preservados em museus, que abrigam patrimônio tangível e intangível à humanidade (KONSA *et al.*, 2014).

As indústrias de processamento sofrem perdas econômicas consideráveis com a biodeterioração, a exemplo das mudanças de coloração causadas por fungos manchadores na

madeira para exportação. Estima-se que cerca de um terço da produção anual em Gana, cuja economia está pautada principalmente na extração de recursos naturais e agricultura, é perdida por deterioração biológica (APETORGBOR *et al.*, 2004).

De modo geral, os primeiros organismos xilófagos que colonizam as árvores recém-abatidas são os fungos emboloradores e manchadores, em decorrência da grande quantidade de substância de reserva ainda presente na madeira e da elevada umidade. As manchas causadas por eles podem ser superficiais ou profundas, e reduzem significativamente sua qualidade e valor comercial (COELHO *et al.*, 2007).

Os fungos são os principais decompositores em ecossistemas florestais, entre os quais, os do filo Basidiomycota são os mais importantes na decomposição de materiais lignocelulósicos (SHIROUZU *et al.*, 2016). As interações nas comunidades de Basidiomycota são responsáveis pelo sequestro de cerca de 80 Tg de carbono, anualmente, em biomassa lenhosa, o que as tornam fundamentais ao ciclo global do carbono (HISCOX *et al.*, 2018). Apenas estes fungos desenvolveram sistemas bioquímicos complexos capazes da conversão e mineralização da lignocelulose da madeira em dióxido de carbono e água (FACKLER & SCHWANNINGER, 2012).

**Tabela 1. Principais causas de deterioração da madeira**

Agentes de deterioração da madeira	
	<b>Bactérias</b>
	Fungos manchadores Fungos emboloradores <b>Fungos</b> Fungos apodrecedores Fungos de podridão parda ou cúbica Fungos de podridão branca ou fibrosa Fungos de podridão mole
<b>Agentes bióticos</b>	<b>Insetos</b> Térmitas isópteras (Cupins-de-madeira) Térmitas-de-madeira-seca Térmitas-de-madeira-úmida Térmitas-subterrâneas Térmitas-epígeas Térmitas-arborícolas Brocas-de-madeira Brocas que atacam árvores vivas Brocas que atacam árvores recém-abatidas Brocas que infestam a madeira durante a secagem Brocas de madeira seca Formigas-carpinteiras Abelhas- carpinteiras
	<b>Perfuradores marinhos</b> Moluscos Teredinidae Crustáceos Pholadidae Limnoria Sphaeroma terebrans
<b>Agentes abióticos</b>	<b>Agentes Físicos</b> Patologias de origem estrutural Instabilidade Remoção de elementos estruturais Fraturas incipientes Movimentos de nós e distorções Deformações, deslocamentos e flechas Presença de defeitos naturais Danos mecânicos Danos por animais silvestres Danos por vandalismo
	<b>Agentes Químicos</b> Corrosão em ligações Efeito da corrosão na madeira
	<b>Agentes Atmosféricos ou Meteorológicos</b> Ação de luz ultravioleta Intemperismo Danos por inchamento e retração da madeira Ações de vento nas estruturas Raios atmosféricos
	<b>Danos devido ao fogo</b>

Fonte: Adaptado de BRITO, 2014.

Em decorrência das suas propriedades mecânicas intrínsecas, a madeira vindo sendo utilizada pelo homem desde a Era Neolítica como material para construção, aquecimento e outros produtos derivados, como papel. Hoje em dia, o interesse por ela vem sendo reativado, pois trata-se de uma fonte de biomassa renovável para conversão em bioetanol. De modo geral, ela é resistente a condições ambientais como sol, chuva e estresses abióticos. No

entanto, a principal ameaça ao seu uso é a degradação por fungos lignocelulolíticos (TOUSSAINT *et al.*, 2016). A sua biodeterioração representa um grande problema econômico. Os EUA, por exemplo, sofrem com perdas anuais em torno de cinco bilhões de dólares, de modo que quase 10% do produto anual da floresta são utilizados para substituir os produtos deteriorados (TOUSSAINT *et al.*, 2016).

Os fungos lignocelulolíticos são considerados como “pragas” para a madeira utilizada em construção, causando importantes alterações nas suas propriedades físicas logo no início da deterioração e, continuamente, nas suas propriedades químicas. No entanto, este processo natural pode ser utilizado para fins industriais e tem um grande potencial para indústrias de produção de celulose e processamento de madeira, bem como para conversão, de alto valor agregado, de resíduos lignocelulósicos em biorrefinarias. Particularmente, os mecanismos moleculares dos fungos de podridão branca oferecem uma série de aplicações no campo da biotecnologia de recursos renováveis (FACKLER & SCHWANNINGER, 2012).

No que diz respeito aos danos econômicos causados por eles, estudos diversos avaliaram a frequência de várias espécies de Basidiomycota envolvidos na deterioração da madeira em uso. Um levantamento de 1.500 edifícios no estado de Nova York, no período de 1947 a 1951, indicou diversas espécies presentes, entre as quais se destacaram: *Gloeophyllum trabeum*, *Gloeophyllum sepiarium*, *Hyphodontia spathulata* e *Antrodia xantha*. Na Polônia, um estudo em 3.050 edifícios indicou danos consideráveis à madeira em uso, com relato de maior frequência de isolados para os fungos *Serpula lacrymans* (54%), *Coniophora puteana* (22%) e *Antrodia vaillantii* (11%). Outro importante estudo ocorreu em edifícios da antiga Alemanha Oriental durante 21 anos, tendo como resultado a compilação de 1.200 danos bióticos causados principalmente por *Serpula lacrymans* (35%), *Coniophora* spp. (15%) e *Poria* spp. (9%). Na Noruega, um total de 3.434 espécies foram identificadas, no período de 2001 a 2003, causando danos à madeira de residências, entre as quais, as mais frequentes foram *Antrodia* spp., *Coniophora puteana*, *Serpula lacrymans* e *Gloeophyllum sepiarium* (SCHMIDT, 2007).

No Brasil, há pouquíssimos estudos na área de patologias em estruturas de madeira. No período entre 1983 e 2014, foram publicados 2.637 artigos no Encontro Brasileiro em Madeiras e Estruturas de Madeira – EBRAMEM, em que apenas 74 correspondem à temática de Patologia, Recuperação de Estruturas e Durabilidade da Madeira, ou seja, apenas 2,8% de todos os trabalhos publicados ao longo de três décadas de realização do evento, o que corrobora a necessidade de mais pesquisa na área (BRITO, 2014).

Historicamente, os fungos lignocelulolíticos são classificados como causadores de podridão branca, os quais degradam todos os componentes da parede celular vegetal ou podridão parda, os quais deixam a lignina intacta, degradando apenas os açúcares que compõem a parede celular (RILEY *et al.*, 2014a). Produzem as enzimas celulases e hemicelulases que compreendem as celobio-hidrolases (CBH), endo-1,4-p-D-glucanases (EG),  $\beta$ -glucosidases (BGL), xilanases,  $\beta$ -glucanases, galactanases, entre outras, além das oxidoreduções envolvidas na degradação da lignina (BASHIR *et al.*, 2015).

Estas enzimas são importantes por diversos aspectos, como do ponto de vista ambiental, na descontaminação de efluentes das indústrias de tecidos, papel, alimentos, cosméticos e fármacos, entre outras, nas quais se utilizam corantes sintéticos, em grande parte tóxicos e carcinogênicos, cujas águas residuais constituem grave problema em todo o mundo (LEVIN *et al.*, 2010).

Os métodos convencionais de descontaminação são muitas vezes ineficientes e caros, portanto, uma importante alternativa é o uso de fungos de podridão branca por meio de suas enzimas extracelulares como lignina peroxidase (LiP), lacase (Lac) e manganês peroxidase (MnP), com habilidade para degradar um amplo espectro de compostos xenobióticos, incluindo corantes (LEVIN *et al.*, 2010).

Do ponto de vista biotecnológico, estas enzimas com capacidade de despolimerizar os polissacarídeos e a lignina da parede celular das plantas, são de grande interesse em virtude dos produtos gerados através desta catálise, que podem servir como precursores para produtos de base biológica como papel, combustível, alimentos, ração animal e químicos (RYTIOJA *et al.*, 2014).

Considerado como fungo modelo de podridão branca, *Phanerochaete chrysosporium* pode ser utilizado para reciclar materiais anteriormente considerados não biodegradáveis. Em 2006, ele tornou-se conhecido por ser o primeiro organismo capaz de degradar resinas fenólicas (PRs) com estrutura química semelhante à lignina (GUSSE *et al.*, 2006, apud DE MATTOS-SHIPLEY *et al.*, 2016).

Os papéis ecológicos desses fungos são diversos e os tornam importantes para as sociedades humanas devido às funções que desempenham em setores como indústrias, silvicultura e agricultura, no entanto, também nos impactam mais diretamente como fonte de nutrientes e com espécies de valor medicinal (DE MATTOS-SHIPLEY *et al.*, 2016).

## 1.2 Os fungos lignocelulolíticos

### 1.2.1 Caracterização geral, hábito e ciclo de vida

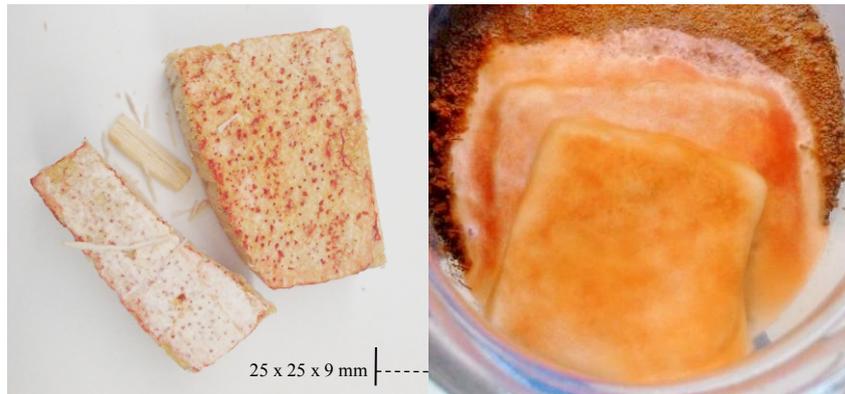
São fungos filamentosos que pertencem ao sub-reino *Dikarya*, filos Ascomycota e Basidiomycota, considerados superiores entre os demais do Reino Fungi (BRONDZ, 2014). Os principais decompositores encontram-se entre os Basidiomycota, com aproximadamente 48.405 espécies descritas, especialmente do subfilo Agaricomycotina, os quais produzem enzimas lignocelulolíticas (RILEY *et al.*, 2014a; FROESE, 2018). Presentes nas mais diversas regiões do planeta, aproximadamente 6.384 espécies de Agaricomycotina lignocelulolíticos são conhecidas no mundo (ABRAHÃO, 2012).

No Brasil, amplamente distribuídos entre os diferentes biomas, podem ser citados as principais ordens que os comportam, número de espécies e alguns gêneros importantes na degradação da biomassa lenhosa: Agaricales (255 spp.), exemplo do gênero *Schizophyllum*; Auriculariales (28 spp.), exemplos dos gêneros *Auricularia* e *Exidiopsis*; Gloeophyllales (3 spp.), exemplo do gênero *Gloeophyllum*; Hymenochaetales (136 spp.) exemplo do gênero *Phellinus*; e Polyporales (333 spp.), a principal ordem de fungos lignocelulolíticos, com gêneros importantes como *Bjerkandera*, *Ceriporia*, *Ganoderma*, *Phanerochaete*, *Pycnoporus* e *Trametes* (FORZZA *et al.*, 2010).

Representantes destes grupos encontram-se depositados em coleções de referência ao redor do mundo, inclusive em instituições brasileiras, como as que são registradas na Federação Mundial de Coleções de Culturas - WFCC ([www.wfcc.info/home/](http://www.wfcc.info/home/)) (VALENCIA & CHAMBERGO, 2013). Um importante exemplo internacional é a Coleção de Culturas de Referência do Centro de Pesquisa em Micologia Florestal do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - USDA (<https://www.fpl.fs.fed.us/>) que é uma das maiores em termos de preservação de Basidiomycota no mundo, com cerca de 12.000 isolados representando 1.500 espécies. Os micologistas da USDA realizam continuamente coletas de fungos causadores de podridões que são identificados por especialistas com base em caracteres morfométricos e técnicas da biologia molecular, ao mesmo tempo que pesquisam sobre a biodiversidade destes em todo o mundo.

Quatro vias de decomposição são reconhecidas entre eles, quais sejam: podridões branca, parda e mole; e manchadores. Os dois primeiros tipos encontram-se entre os Basidiomycota, enquanto os demais pertencem aos Ascomycota. Nas florestas ocorrem interações entre diversas espécies de ambos os filos na decomposição da serrapilheira (LUNDELL *et al.*, 2014).

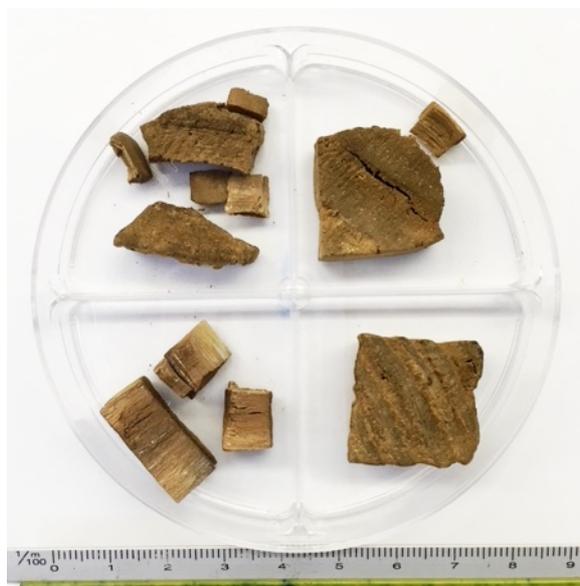
Como já mencionado anteriormente, a capacidade de degradar do grupo é devida, principalmente, ao seu rico suprimento de enzimas, a exemplo de lacases, tirosinases e vários tipos de peroxidases (MARTÍNKOVÁ *et al.*, 2016). Os fungos que causam podridão branca degradam todos os principais constituintes da parede celular da fibra vegetal de tal forma que a madeira residual torna-se esbranquiçada ou amarelada, úmida, macia e frequentemente fibrosa (Figura 4). A maior parte dos fungos apodrecedores atua através deste mecanismo e, frequentemente, é encontrada em madeiras de angiospermas (RYTIOJA *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Características do corpo de prova da madeira *Cecropia* sp. após degradação por fungo de podridão branca em ensaio de apodrecimento acelerado, segundo a norma ASTM 2017:05. Fonte: Anna Sofya V. S. da Silva.

Os causadores de podridão parda tornam a madeira residual seca, marrom, pulverulenta e rachada em cubos (Figura 5). Pertencem em grande parte à ordem Polyporales e, aparentemente, perderam seus genes que codificam ligninases, apresentando apenas poucos genes para peroxidases gerais não ligninolíticas (LUNDELL *et al.*, 2014).

Eles também utilizam mecanismos não enzimáticos que atuam sobre os constituintes da parede celular, que possui baixa porosidade, através da produção de agentes oxidantes de baixo peso molecular, conduzindo a uma despolimerização difusa com aumento da solubilidade alcalina da madeira, característica típica deste tipo de degradação (PRESLEY *et al.*, 2018).



**Figura 5.** Características dos corpos de prova da madeira *Pinus* sp. após degradação por fungo de podridão parda em ensaio de apodrecimento acelerado, segundo a norma ASTM 2017:05. Fonte: Anna Sofya V. S. da Silva.

Os fungos que causam podridão mole são representados principalmente por espécies dos gêneros *Trichoderma*, *Phialophora*, *Paecilomyces*, *Aspergillus*, bem como espécies de *Xylaria* que colonizam tanto árvores, seus troncos, galhos e raízes, quanto a madeira pós-colheita, atuando principalmente em sua superfície, decompondo a lignocelulose sem atingir mais profundamente o cerne (LUNDELL *et al.*, 2014). Eles utilizam mecanismos de decomposição que se assemelham tanto aos de podridão parda, quando se limitam aos carboidratos da parede celular, quanto aos de podridão branca por possuírem sistemas enzimáticos similares (ZABEL & MORREL, 1992).

Os fungos manchadores causam manchas ou descolorações na madeira que diminuem seu valor comercial, quando da classificação para usos estruturais, devido aos danos principalmente estéticos (BRITO, 2014). Colonizam os tecidos parenquimáticos do alburno e não degradam a lignocelulose do xilema, de forma que as propriedades mecânicas deste tecido não são consideravelmente alteradas, com exceção da resistência ao choque (MENDES & ALVES, 2002).

Entre eles, encontram-se as espécies dos gêneros *Ophiostoma* e *Grosmannia* disseminados por meio de besouros que habitam a madeira. As suas hifas pigmentadas também penetram tecidos vivos da árvore, tanto o xilema quanto o floema e, em coníferas, crescem em seus dutos resiníferos, decompondo resinas e ceras (LUNDELL *et al.*, 2014). Podem se desenvolver em diversos estágios de processamento da madeira, desde a estocagem

e transporte de toras até o produto final, de acordo com as condições de ar e umidade propícias (MENDES & ALVES, 2002).

Os fungos lignocelulolíticos são considerados, dessa forma, necrotróficos, quando parasitam os tecidos vivos da árvore causando a morte das células e utilizando-as como fonte de nutrientes, ou saprotróficos, quando colonizam a madeira após a morte da planta (causando podridões pós-colheita). Um número relativamente pequeno pertence ao grupo dos parasitas obrigatórios, que obtêm seus nutrientes unicamente dos tecidos vivos do hospedeiro (BARRON, 2003; STANCHEVA *et al.*, 2009).

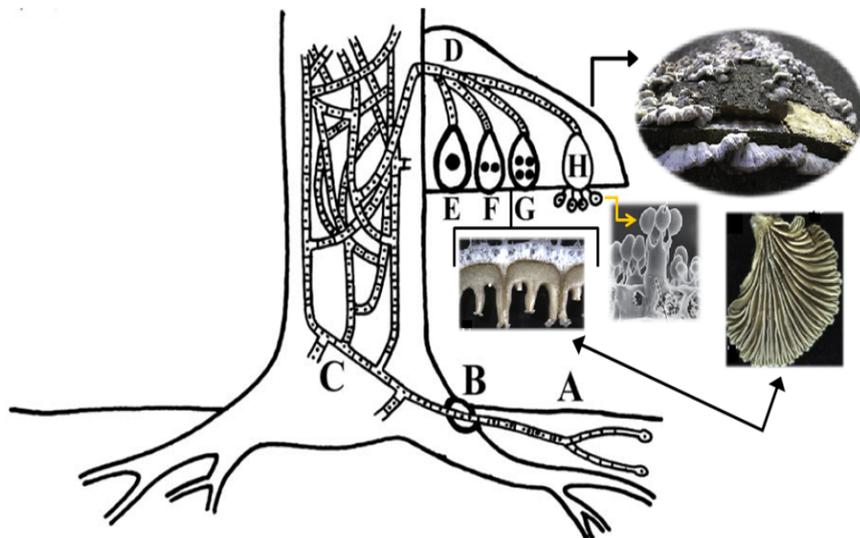
Um importante exemplo são as espécies necrotróficas do gênero *Heterobasidion*, importantes patógenos de coníferas no hemisfério norte (Figura 6), a exemplo da espécie *H. irregulare* com capacidade de remover a lignina durante a degradação da madeira (LIND *et al.*, 2014).

Possuem ciclo de vida típico de um Basidiomycota da classe Basidiomycetes (Figura 7) com a formação, na fase sexuada, de basidiomas com características típicas do grupo a que pertencem, como os popularmente conhecidos “orelhas-de-pau” (SCHMIDT, 2006).

Os fungos desta classe possuem características únicas como a formação do basídio, estrutura na qual os esporos haploides conhecidos como basidiósporos são produzidos. Todavia, antes desta etapa, ocorre uma longa fase dicariótica que antecede a formação das estruturas sexuais de reprodução, em que núcleos geneticamente distintos são “compartimentalizados” nas hifas por meio de septos dolipóricos e grampos de conexão. Estes núcleos irão se fundir, no início da formação do basídio, na efêmera fase diploide, para em seguida dividirem-se por meiose, e depois, mitose, originando os basidiósporos, a partir dos quais novos ciclos se iniciarão (SCHMIDT-DANNERT, 2016).



**Figura 6.** Interações entre *Heterobasidion* sp. e a árvore, com respectivas infecção dos seus tecidos (I) e degradação saprofítica da madeira (II). São indicadas enzimas e fitotoxinas produzidas pelo fungo para cada estado trófico. Fonte: Adaptado de LIND *et al.*, 2014.



**Figura 7.** Ciclo de vida típico de fungo de podridão: A - Esporos haplóides dão origem ao micélio monocariótico (n). Quando dois micélios monocarióticos compatíveis se encontram ocorre a plasmogamia e a formação de micélio dicariótico (n+ n); B - Micélio dicariótico penetra através de ferida; C - Infecção dos tecidos vivos; D - Formação do basidioma com basídios: E - Cariogamia; F, G - Meiose; H - Basídios maduros e a formação de quatro basidiósporos. Fonte: Adaptado de SCHMIDT, 2006; DE MATTOS-SHIPLEY *et al.*, 2016.

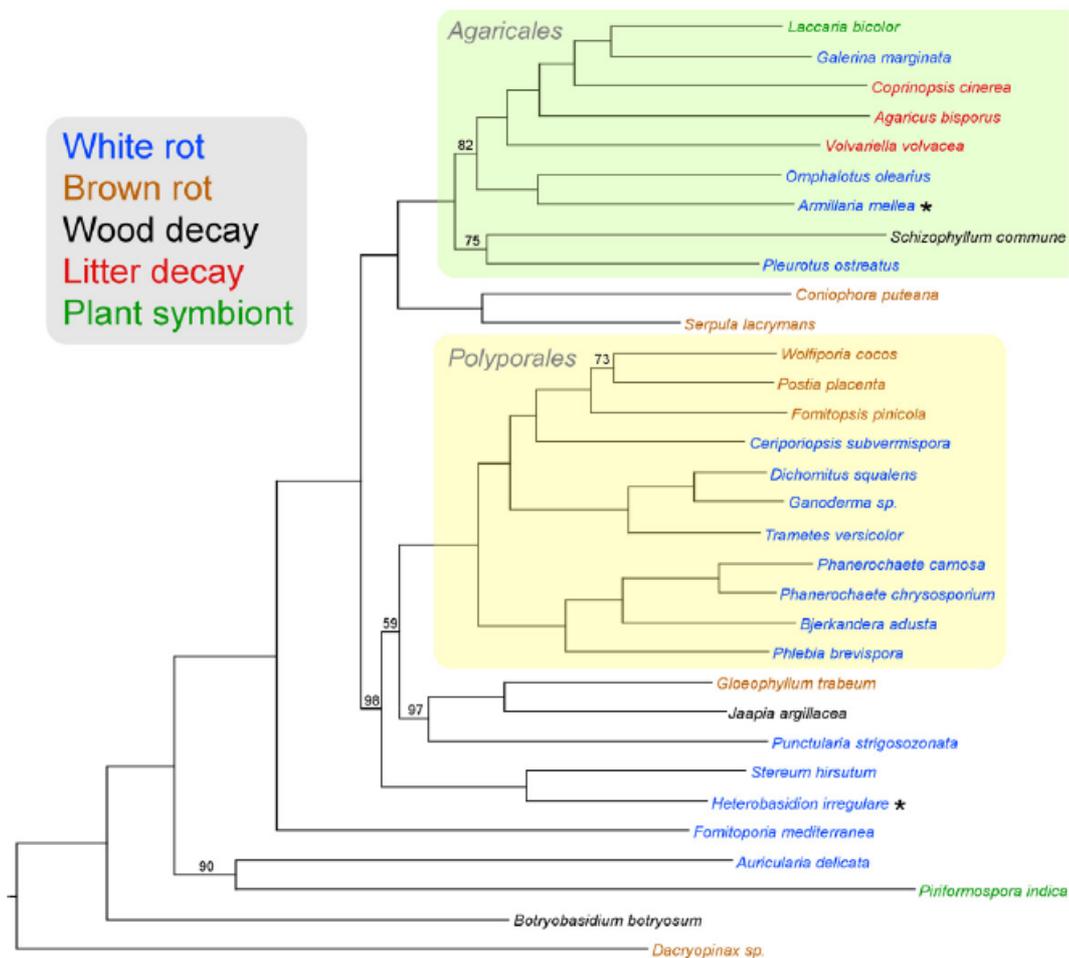
### 1.2.2 Identificação molecular

O sistema de classificação fúngica passou por diversas modificações e, atualmente, apoia-se principalmente em estudos genéticos e de filogenia. A dinâmica do agrupamento e reagrupamento destes organismos, de acordo com o desenvolvimento das pesquisas taxonômicas, evidencia os avanços nos métodos de identificação, com ênfase às técnicas moleculares. Essas melhorias são progressivas e proporcionarão novos rearranjos a nível inter e intraespecífico, bem como a níveis superiores como gênero e família (BRONDZ, 2014).

As análises de genes de RNA ribossômico amplificados por PCR promoveram uma verdadeira revolução na taxonomia fúngica, no início da década de 1990. No presente, são vários os estudos filogenéticos com múltiplos genes que abordam relações amplas em todos os principais grupos de fungos. Inclusive, com a utilização de plataformas de classificação on-line como o GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy)) que atendem diversos pesquisadores, facilitando comparações com seus bancos de dados constantemente atualizados, entre outras ferramentas disponíveis (HIBBETT *et al.*, 2007)

A criação de “códigos de barras” ou DNA *barcoding* para os organismos permitiu a identificação rápida de espécimes fúngicos, orientando, entre outros, estudos sobre controle de doenças e biodiversidade. No ano de 2012, o *International Fungal Barcoding Consortium* formalizou a indicação das regiões do espaçador interno transcrito (ITS) do RNA ribossômico nuclear como *barcoding* primário para a identificação de fungos. Assim, genes altamente conservados como 18S, 5.8S e 28S rRNA são usados para o desenho de *primers* universais com capacidade de amplificar ITS-1, ITS-2 ou toda a região ITS, com a vantagem de apresentarem múltiplas cópias no genoma, o que permite a amplificação a partir de pequenas quantidades de amostras biológicas (XU & ADAMOWICZ, 2016).

No subfilo Agaricomycotina, encontram-se a maior parte dos fungos de podridão do lenho e, atualmente, foram sequenciados e publicados 31 genomas deste grupo. Os estudos genômicos possibilitam uma melhor compreensão dos mecanismos utilizados por eles para a degradação da madeira. Dessa forma, na última década, os avanços nas tecnologias de sequenciamento aprimoraram seus diferentes parâmetros como precisão, taxa de transferência e custo, no sentido de resolver estes questionamentos, correlacionando filogenia à hábitos de vida (Figura 8).



**Figura 8.** Relações filogenéticas e principais hábitos de vida no subfilo Agaricomycotina, para as espécies com genoma sequenciado. As principais ordens (Agaricales e Polyporales) são destacadas. Espécies com um asterisco (\*) são predominantemente patógenos. **Nota:** as espécies *Schizophyllum commune*, *Jaapia argillacea* e *Botryobasidium botryosum* não são claramente definidas quanto ao tipo de podridão que causam. Adaptado de OHM *et al.*, 2014.

A região ITS, no entanto, apresenta algumas limitações como a pouca variação entre espécies intimamente relacionadas, mesmo quando bem delimitadas por outros dados, como é o caso de espécies bem caracterizadas dos gêneros *Heterobasidion*, *Armillaria*, *Fusarium* e *Penicillium*. Dessa maneira, têm sido propostas outras regiões, a exemplo de genes mitocondriais, como DNA *barcoding* de Basidiomycota (VIALLE *et al.*, 2009).

Diversas pesquisas são desenvolvidas no sentido de criar DNA *barcoding* secundário para fungos. Entre elas, o projeto *Assembling the Fungal Tree of Life* (AFTOL) têm proposto a utilização das regiões gênicas RPB1, RPB2, nLSU, nSSU e TEF1 para identificar espécies intimamente relacionadas dentro dos Basidiomycota (XU & ADAMOWICZ, 2016).

### 1.2.3 Mecanismos enzimáticos para degradação da biomassa lenhosa

A heterogeneidade dos polímeros que compõem a parede celular induz os fungos lignocelulolíticos a produzirem uma grande variedade de enzimas com habilidades para degradá-la, assim convertendo esses polímeros em monômeros, que serão utilizados pelos fungos como fonte de carbono (MÄKELÄ *et al.*, 2014).

A degradação da celulose (Figura 9) é realizada por um conjunto de enzimas que atuam sinergicamente e são denominadas, de modo geral, celulasas. As principais são as endoglucanases, exoglucanases e beta-glicosidasas (BGLs). As endoglucanases clivam as ligações das cadeias de glicano ao longo da fibra de celulose e liberam glicooligossacarídeos. As exoglucanases ou também denominadas celobiohidrolases (CBHs) clivam ligações nos terminais da cadeia de celulose, liberando celobiose e/ou glicose. Existem dois tipos de CBHs: CBHI e CBHII, que clivam, respectivamente, as ligações da celulose nas suas extremidades redutora e não redutora. As BGLs, por fim, clivam as ligações dos oligossacarídeos produzidos pelos dois tipos enzimáticos anteriormente descritos, convertendo-os em unidades menores de glicose (RYTIOJA *et al.*, 2014).

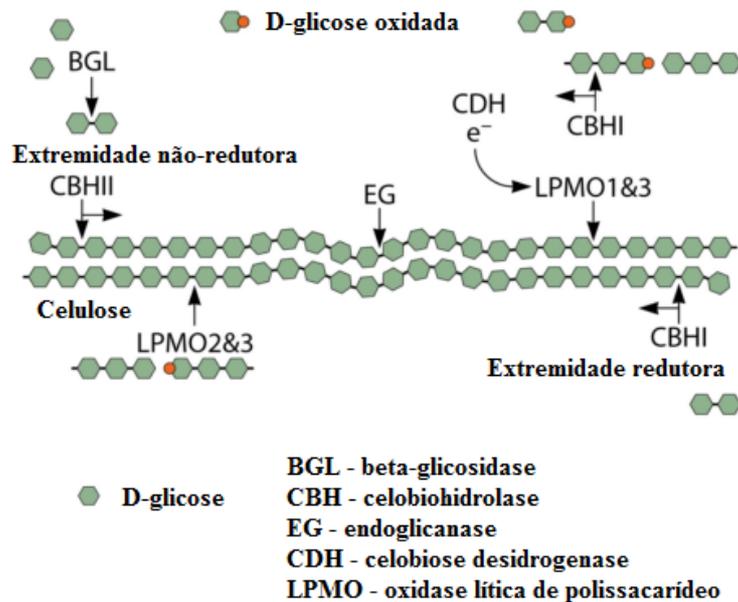
Estudos recentes mostram a atuação de outras enzimas conjuntamente às celulasas, que realizam clivagem da celulose, por meio da oxidação da ligação glicosídica. São elas as celobiose desidrogenases (CDH) e as oxidases líticas de polissacarídeos (LPMOs). As primeiras atuam oxidando celobiose e celooligossacarídeos. As LPMOs são oxidases cobre-dependentes que clivam a ligação glicosídica por oxidação direta da cadeia de celulose (RYTIOJA *et al.*, 2014).

Os fungos de podridão branca ou *White Rot Fungi* (WRF) possuem o conjunto de enzimas necessário à completa degradação da celulose e apresentam, desta forma, expressão ativa tanto de celulasas clássicas quanto de CDHs e LPMOs, como relatado para o WRF *Dichomitus squalens* durante seu crescimento em culturas contendo biomassa lenhosa (MÄKELÄ *et al.*, 2014).

Enzimas como as LPMOs são importantes principalmente sob dois pontos de vista: ao gerarem novos sítios de ligação à celulose para outras enzimas e ao promoverem mudanças mecânicas que tornam a fibrila de celulose mais suscetível à degradação (GOMES, 2017).

Dada a constituição complexa da hemicelulose, o arsenal de enzimas necessárias à sua degradação envolve a ação coordenada de endo e exoenzimas e enzimas auxiliares. Para clivagem da xilana, por exemplo, ocorre a atuação de enzimas como as endo 1,4-beta-D-xilanases e beta-D-xilosidasas sobre a cadeia principal do polissacarídeo. Além dessas, outras

enzimas, como as alfa-D-glicuronidas e acetil-xilana-esterases, podem ser requeridas para a clivagem das cadeias laterais do polímero, que representam barreiras para outras xilanases alcançarem a cadeia principal (CARVALHO *et al.*, 2009; GOMES, 2017).



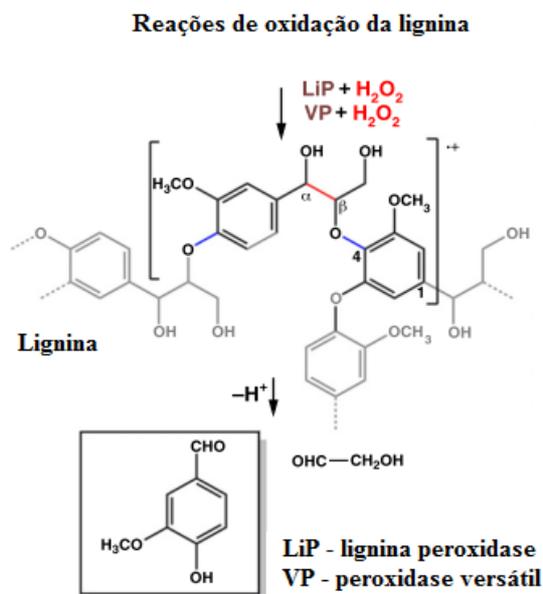
**Figura 9.** Esquema de ação sinérgica das enzimas sobre a celulose da parede celular vegetal. Adaptado de RYTIOJA *et al.*, 2014.

A degradação da lignina (Figura 10), considerada como mecanismo de ação enzimática característico dos WRFs, envolve enzimas ligninolíticas denominadas peroxidases de classe II com alto potencial de oxidação (PODs) como as lignina peroxidases (LiPs), manganês peroxidases (MnPs) e peroxidases versáteis (VPs) (RILEY *et al.*, 2014a). O primeiro fungo WRF com todo genoma sequenciado foi *Phanerochaete chrysosporium* cujo sistema enzimático de degradação da lignina envolve diversos tipos de LiPs, MnPs e lacases (Lacs) (KANG *et al.*, 2010).

As lacases (Lacs) são enzimas agrupadas na classe das fenoloxidasas não dependentes de peróxido que oxidam diretamente anéis fenólicos e que podem atuar, com o auxílio de mediadores de baixo peso molecular, sobre estruturas não fenólicas (AN *et al.*, 2015). As LiPs e VPs possuem maior potencial de oxirredução que as lacases, de tal forma que elas agem sobre uma grande variedade de compostos aromáticos, e apresentam também a capacidade de oxidarem diretamente estruturas aromáticas não fenólicas do polímero de lignina, na ausência de mediadores de baixo peso molecular (SCHMIDT-DANNERT, 2016). A principal diferença entre as peroxidases e lacases consiste no tipo de receptor de elétrons, pois as

primeiras utilizam o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e as seguintes, o oxigênio molecular (MIR-TUTUSAUS *et al.*, 2018).

As MnPs catalisam reações redox, dependentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de Mn<sup>2+</sup> para Mn<sup>3+</sup> que, ao ser estabilizado, age como mediador de baixo peso molecular degradando os anéis aromáticos da lignina (ZHANG *et al.*, 2018).



**Figura 10.** Mecanismo de oxidação da lignina. As enzimas LiPs e VPs possuem alto potencial redox e oxidam diretamente a lignina. Adaptado de SCHMIDT-DANNERT, 2016.

Os fungos que causam podridão parda ou *Brown Rot Fungi* (BRF) degradam preferencialmente celulose e hemicelulose sem remover a lignina circundante. Eles conseguem modificar parcialmente a lignina via reação de Fenton:  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O} + \cdot\text{OH}$ , a qual produz radicais hidroxilas, importantes oxidantes. A desmetoxilação também consiste em um mecanismo não enzimático importante nos estágios iniciais de degradação da lignina, pois diminuiu consideravelmente seu conteúdo de grupos metoxila. Dessa forma, eles atuam sobre a lignocelulose com oxidantes de baixo peso molecular promovendo sua despolimerização difusa e consequente aumento de sua solubilidade alcalina, mecanismo este que os distingue dos WRFs (NIEMENMAA & HATAKKA, 2008; PRESLEY *et al.*, 2016; SCHMIDT-DANNERT, 2016).

As enzimas pectinases também estão envolvidas na degradação da biomassa lenhosa, atuando sobre a pectina, polissacarídeo presente na lamela média, que promove a aderência entre as células adjacentes, como já mencionado anteriormente. Elas atuam através de reações de despolimerização e desesterificação. Entre elas estão as endopoligalacturonases,

exopoligalacturonases, pectato liases e pectinesterases. A degradação de cada domínio do polissacarídeo envolve um conjunto específico destas enzimas (XAVIER-SANTOS *et al.*, 2004; GOMES, 2017).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micologia do Departamento de Fitopatologia; Laboratório de Enzimologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Brasília e no LPF do Serviço Florestal Brasileiro.

### 2.1 Coleção de isolados

Os isolados selecionados para este trabalho pertencem à Coleção de fungos xilófagos do LPF e encontram-se discriminados na Tabela 2, com os respectivos códigos de acesso à Coleção de origem: Coleção de Culturas de Referência do Centro de Pesquisa em Micologia Florestal do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA); e à Coleção Micológica de Referência Herbário UB da Universidade de Brasília (MCHUB).

**Tabela 2.** Códigos de acesso dos isolados à coleção do USDA e à coleção MCHUB relacionados ao tipo de podridão causada à madeira.

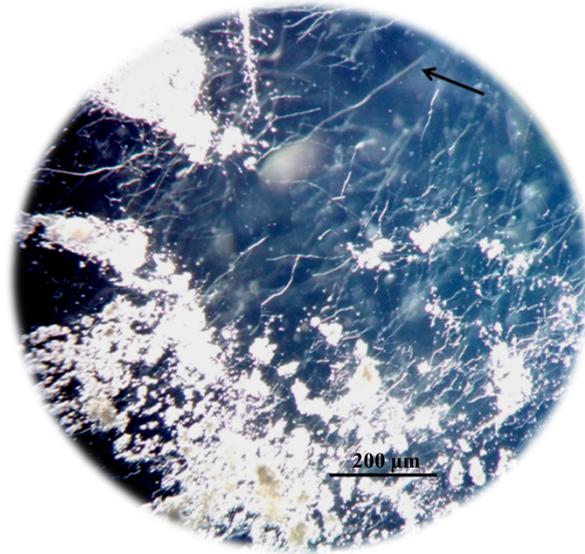
<b>Identificação (LPF)</b>	<b>Coleção (USDA)</b>	<b>Coleção (MCHUB)</b>	<b>Tipo de Podridão</b>
<i>Bjerkandera fumosa</i>	L-15918-Sp	1682	Branca
<i>Schizophyllum commune</i>	TJV-93-5-sp	1826	Branca
<i>Meruliporia incrassata</i>	Piirto-31	1829	Parda
<i>Ganoderma applanatum</i>	HHB-7823-s	1825	Branca
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	ME461	1685	Branca
<i>Trametes versicolor</i>	Mad 697	1681	Branca
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	Mad 617	1828	Parda
<i>Coniophora puteana</i>	Mad 515	1827	Parda
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	FP-103380	1684	Branca

### 2.2 Reativação da coleção e cultivo monohifal

Na coleção de culturas, os isolados eram mantidos por meio do método de repicagem periódica em placas de Petri contendo o meio de cultura extrato de malte ágar - EMA (3% de malte : 1,8% de ágar), e armazenados em câmara de germinação do tipo B.O.D a 5 °C.

Cada isolado foi submetido ao método de purificação monohifal a fim de garantir a sua identidade genética. Para cada cultura retirou-se um disco de micélio que, em seguida, foi transferido para uma placa de Petri contendo meio ágar-água (2%) com estreptomicina a 0,01% (g/L).

Após 1 ou 2 dias de incubação, à temperatura ambiente, no escuro, cada cultura foi analisada sob estereomicroscópio (Leica Microsystems) para a retirada da extremidade de uma hifa individual (Figura 11) que foi transferida para novas placas de Petri para cultivo em meio EMA.



**Figura 11.** Vista em estereomicroscópio da cultura do isolado 1685 em placa de Petri com meio ágar - água utilizado para purificação monohifal. A seta indica o local onde ocorreu a incisão da ponta da hifa.

As novas culturas foram mantidas em incubadora com umidade e temperatura controladas ( $75\% \text{ UR} \pm 2$ ;  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ ), no escuro, durante 16 dias, e posteriormente, foram realizadas observações das estruturas somáticas sob microscópio de luz. Em seguida, foram utilizados dois métodos para armazená-las: em B.O.D a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  e por congelamento, no qual cinco discos de micélio com cerca de 0,7 cm de diâmetro foram retirados de cada colônia, conservados em solução salina 0,9% com glicerol 50% e mantidos em *freezer* a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 2.3 Extração do DNA genômico

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo EMA coberto com papel celofane e incubados à temperatura ambiente por 10 dias no escuro. Após o crescimento das colônias, o micélio foi removido com auxílio de um palito de madeira e colocado em microtubos de 1,5 mL contendo 30  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-EDTA (TE). A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o Kit de purificação de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit) conforme recomendação do fabricante. A concentração do DNA total foi determinada em espectrofotômetro Nanovue e ajustada para

25 ng/μL. As amostras foram armazenadas a 20 °C para posterior utilização.

#### 2.4 Amplificação, purificação e sequenciamento do DNA

Foi preparada uma solução para a PCR, em microtubos de 0,2 mL, para um volume final de 12,5 μL, utilizando os seguintes reagentes: 6,25 μL de MyTaq Master Mix (Bioline, USA), 0,3 μL de cada iniciador (senso e anti-senso), 1 μL de DNA genômico (25 ng/μL) e 4,65 μL de água ultrapura. Os DNAs de todos os isolados foram amplificados e sequenciados com os iniciadores da região ITS mais LSU (Tabela 3).

A reação foi conduzida em termociclador Termo Bio-RAD/MyCycler sob as seguintes condições: 1 ciclo para etapa inicial de desnaturação (95 °C por 01:30 min), seguido de 35 ciclos com uma etapa de desnaturação (95 °C por 20 seg.), uma de anelamento (53 °C por 45 seg.) e uma de extensão (72 °C por 45 seg.) e extensão final (72 °C por 5 min).

**Tabela 3.** Sequência nucleotídica dos iniciadores para a região ITS mais LSU e tamanho esperado do amplicon.

Iniciador	Sequência do iniciador (5'-3')	Tamanho esperado (pb)
ITS+LSU-F	TTATCGTCCCTGCCCTTTGTA	1500
ITS+LSU-R	TCCTGAGGGAAACTTCG	

Os produtos das reações de PCR foram visualizados por meio da eletroforese em gel de agarose à 1% na presença de brometo de etídio (1 μg mL<sup>-1</sup>), U.V. a 254 nm e marcador molecular padrão 1 kb *Ladder*® (Invitrogen) para verificar o tamanho e pureza das amplificações. Os amplicons da região ITS mais LSU foram purificados com ExoSAP-IT (USB) Affymetrix. Foi adicionado 6 μl de água ultrapura aos 9,5 μl do produto de PCR para diluir o DNA de cada amostra. Para cada 5 μl do DNA diluído foi adicionado 2 μl de ExoSAP-IT. O programa de purificação em termociclador foi de 37 °C por 15 minutos seguido por 80 °C por 15 minutos. Os produtos de PCR foram sequenciados pela MacroGen Inc., Coréia do Sul (<http://www.macrogen.com>).

#### 2.5 Análises Filogenéticas

Os resultados dos sequenciamentos foram primeiramente analisados quanto à qualidade dos cromatogramas obtidos para cada isolado. A sequência consenso do sequenciamento de cada um dos isolados foi montada com o auxílio do software Geneious

9.1.3. Primeiramente a sequência consenso foi utilizada no blast para identificação (banco de dados), em seguida a árvore filogenética foi feita com base nesta informação.

Foi realizado o alinhamento múltiplo das sequências da região ITS mais LSU dos isolados pelo software MUSCLE (EDGAR, 2004). A árvore filogenética foi montada através do programa FastTree (ZHOU *et al.*, 2018) que utiliza um método modificado de máxima verossimilhança, com 1.000 repetições de bootstraps e suporte acima de 70%.

As sequências adicionais utilizadas foram selecionadas a partir de periódicos e posteriormente obtidas do GenBank (Tabela 4). A espécie *Bipolaris secalis* foi utilizada como grupo externo (outgroup).

**Tabela 4.** Números de acesso do GenBank e referência das sequências de DNA utilizadas na análise filogenética.

<b>Espécie</b>	<b>UnB</b>	<b>ITS+LSU</b>	<b>Referência</b>
<i>Coniophora puteana</i>	1827	AM946631	(SCHMIDT & MORETH, 2008)
<i>Coniophora puteana</i>	-	KJ995933	(MORETH & SCHMIDT, 2005)
<i>Coniophora puteana</i>	-	AJ5834262	(MORETH & SCHMIDT, 2005)
<i>Coniophora puteana</i>	-	GU1875781	(MORETH & SCHMIDT, 2005)
<i>Schizophyllum commune</i>	1826	AF261587	(MONCALVO <i>et al.</i> , 2002)
<i>Schizophyllum commune</i>	-	MH307932	(CAJTHAML, 2015)
<i>Schizophyllum commune</i>	-	DQ0717252	(GARNICA <i>et al.</i> , 2007)
<i>Schizophyllum commune</i>	-	AF334751	(BINDER <i>et al.</i> , 2010)
<i>Schizophyllum commune</i>	-	AF261587	(BINDER <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bjerkandera fumosa</i>	1682	KJ831937	(MARTIN <i>et al.</i> , 2015)
<i>Bjerkandera fumosa</i>	-	KY9488551	(JUSTO <i>et al.</i> , 2017)
<i>Bjerkandera fumosa</i>	-	KT3059371	(WESTPHALEN <i>et al.</i> , 2015)
<i>Bjerkandera fumosa</i>	-	KP1351981	(JUSTO <i>et al.</i> , 2017)
<i>Exidiopsis</i> sp.	-	AY509549	(LUTZONI <i>et al.</i> , 2004)
<i>Exidiopsis calcea</i>	-	AY885162	(LUTZONI <i>et al.</i> , 2004)
<i>Exidiopsis effusa</i>	-	KX262193	(MALYSHEVA & SPIRIN, 2017)
<i>Heterochaete andina</i>	-	KX262187	(MALYSHEVA & SPIRIN, 2017)
<i>A. auricula-judae</i>	-	KM396824	(WU <i>et al.</i> , 2015)
<i>A. auricula-judae</i>	-	KM396826	(WU <i>et al.</i> , 2015)
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	1828	KJ995923	(JASALAVICH <i>et al.</i> , 2000)
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	-	KJ1411851	(GARCIA-SANDOVAL <i>et al.</i> , 2011)
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	-	AY089733	(ADAIR <i>et al.</i> , 2002)
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	-	HM5360671	(GARCIA-SANDOVAL <i>et al.</i> , 2011)
<i>Gloeophyllum sepiarum</i>	-	JN649344	(SJOKVIST <i>et al.</i> , 2012)
<i>Columnocystis abietina</i>	-	EU118619	(SJOKVIST <i>et al.</i> , 2012)
<i>Trametes versicolor</i>	1681	KC176306	(THORN <i>et al.</i> , 1996)

<i>Trametes gibbosa</i>	-	KC176329	(THORN <i>et al.</i> , 1996)
<i>Trametes versicolor</i>	-	KC176344	(THORN <i>et al.</i> , 1996)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	1684	KP012989	(MAY, 2003)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	-	JN164795	(JUSTO & HIBBETT, 2011)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	-	KP012920	(MAY, 2003)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	-	FJ372709	(RUNGJINDAMAI <i>et al.</i> , 2008)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	-	595619	(YUAN <i>et al.</i> , 2011)
<i>Ganoderma applanatum</i>	1825	KJ668395	(JANG <i>et al.</i> , 2016)
<i>Ganoderma tsugae</i>	-	KJ146707	(JANG <i>et al.</i> , 2016)
Polyporales	-	JQ312203	(CHOWDHARY <i>et al.</i> , 2013)
<i>Hydnopolyporus fimbriatus</i>	-	KX664355	(MAYER <i>et al.</i> , 2016)
<i>Ceriporia</i> sp.	-	LC014887	(HAGIWARA <i>et al.</i> , 2015)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1685	MH047187	(HEEGER <i>et al.</i> , 2018)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	GQ470643	(WESTPHALEN <i>et al.</i> , 2015)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	KP135246	(FLOUDAS & HIBBETT, 2015)
<i>Meruliporia incrassata</i>	1829	AJ419912	(SCHMIDT & MORETH, 2002)
<i>Meruliporia incrassata</i>	-	AJ491672	(CARLIER <i>et al.</i> , 2004)
<i>Meruliporia incrassata</i>	-	GU187595	(BINDER <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bipolaris secalis</i>	-	KU554624	(LORENZINI <i>et al.</i> , 2016)

---

## 2.6 Avaliação da atividade lignocelulolítica

A atividade lignocelulolítica dos isolados estudados foi determinada tanto por meio de ensaios qualitativos, detectando-se a atividade enzimática pela formação de halo de degradação do substrato em meio sólido, quanto através de ensaios quantitativos, por métodos espectrofotométricos, quantificando-se a produção de enzimas e ainda avaliando-se a curva de crescimento em meio líquido.

### 2.6.1 Ensaios qualitativos

A atividade lignocelulolítica dos isolados foi inicialmente avaliada de forma qualitativa, por meio de testes de atividade em placas de Petri contendo o meio sólido MYG (5 g de malte, 2,5 g de extrato de levedura, 20 g de ágar e 1 L de água destilada). Para detecção da atividade de lacases, o meio foi acrescido de glicose e suplementado com azul de remazol 0,3 M como indicador. Para detecção da atividade de xilanases e endoglucanases o meio MYG foi suplementado com xilana ou carboximetilcelulose (CMC) a 0,5%,

respectivamente, como única fonte de carbono em substituição à glicose (GARCIA, 2006; GOMES, 2017). Todos os isolados foram incubados em BOD a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ;  $75\% \pm 2$  UR, no escuro. Após 4 dias de incubação, as culturas contendo xilana e CMC como fonte de carbono foram coradas com *Congo Red* a 0,1% (0,1 g de vermelho congo e 100 mL de água destilada) e, em seguida, descoradas com solução de NaCl 0,5 M (NaCl 29,22 g e 1 L de água destilada) para detecção da atividade enzimática, visualizada pelo halo de coloração mais clara, conforme previamente descrito por Carder (1986). A atividade de lacase foi visualizada pela formação de halo transparente, de acordo com Garcia (2006).

O valor do halo de hidrólise foi determinado pelo resultado da subtração do valor do diâmetro da colônia somado ao halo pelo valor do diâmetro da colônia (medidos em centímetros), conforme Hankin e Anagnostakis (1975). A medição do diâmetro foi realizada três vezes tanto na horizontal, quanto na vertical, e, em seguida, foi feita uma média aritmética desses valores para obter o tamanho da colônia e do halo.

## **2.6.2 Ensaio quantitativo**

### **2.6.2.1 Produção enzimática**

Os isolados 1681, 1828, 1682 e 1829 foram selecionados para esses ensaios por pertencerem a espécies descritas como clássicas causadoras de podridão da madeira e também em função de dados prévios de ensaios de apodrecimento acelerado em laboratório (LPF), ou ainda, por apresentarem os maiores halos de degradação nos testes qualitativos para avaliação da atividade lignocelulolítica.

A partir das culturas monohifais, cinco discos de micélio foram inoculados em frascos Erlenmeyers com 50 mL de meio mínimo (0,7% (m/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,16%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a pH 7,0) acrescido de serragem da madeira *S. psilonema* (numa concentração final de 0,5% m/v) como fonte única de carbono. Os fungos foram incubados por 10 dias, a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  e sob agitação de 120 rpm. A cada dia, 2 frascos foram retirados, as culturas filtradas a vácuo, e os filtrados centrifugados a 10.000 rpm por 20 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para separação da massa micelial. O sobrenadante foi a fração utilizada como fonte de holocelulases e lacases para a determinação de atividade enzimática e à massa micelial foi adicionado 15 mL de água destilada e o composto reservado para a determinação da curva de crescimento.

A atividade holocelulolítica nos sobrenadantes das culturas foi avaliada pela liberação de açúcares redutores dos substratos carboximetilcelulose, papel de filtro e xilana pelo

método de Miller (1959). Os ensaios enzimáticos para determinação das atividades de CMCase, celulase total e xilanase foram realizados conforme descrito por Leitão *et al.* (2017).

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada colorimetricamente pela leitura em espectrofotômetro (Spectra Max) no comprimento de onda de 540 nm e utilizando curvas padrão de glicose e xilose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de açúcar redutor por minuto de reação (UI). A atividade de lacase foi determinada conforme descrito por Garcia (2006), a absorbância foi lida em espectrofotômetro (SpectraMax) a 420 nm. Todos os ensaios foram conduzidos em duplicata e os valores apresentados corresponde a média aritmética das duas repetições.

### **2.6.2.2 Curva de crescimento**

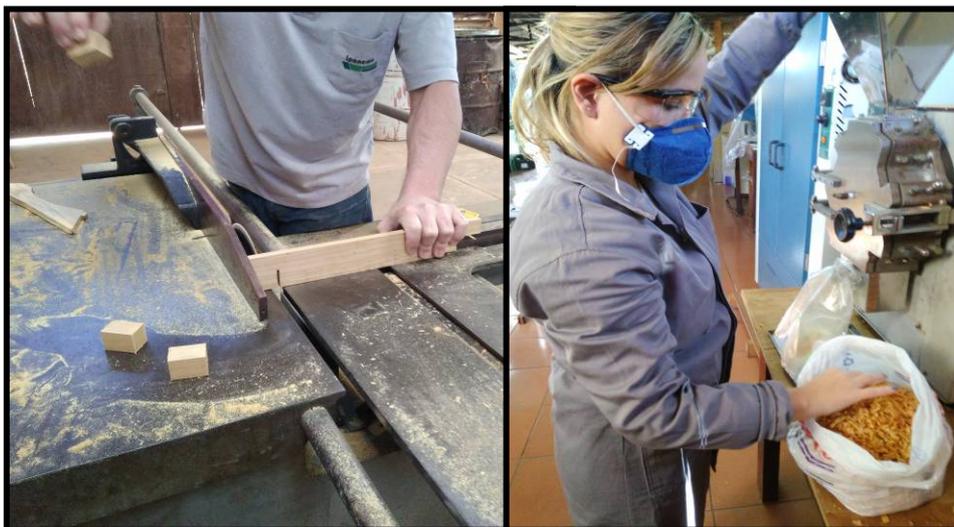
A massa micelial obtida conforme descrito anteriormente, foi empregada para a obtenção das curvas de crescimento a partir da quantificação de proteína intracelular após a lise das células fúngicas por meio de sonicador (SONICS Vibra cell), conforme descrito por Bradford (1976). A absorbância foi lida em espectrofotômetro (SpectraMax) a 595 nm.

## **2.7 Teste de durabilidade natural da madeira**

O teste de durabilidade natural da madeira foi realizado no Laboratório de Fungos da Área de Biodegradação e Preservação do LPF utilizando-se as madeiras de *S. psilonema*, *Cecropia* sp. e *Pinus* sp. Para tanto, foi seguida a norma padronizada da *American Society For Testing Materials* - ASTM D 2017 (2005).

### **2.7.1 Obtenção da madeira**

A madeira de *S. psilonema* foi coletada em áreas de assentamentos rurais localizadas nas região centro-norte do estado do Piauí, com predominância de vegetação típica do bioma Caatinga, que fazem parte de Plano de Manejo Florestal comunitário, apoiado pelo LPF. Foram abatidas cinco árvores para confecção dos corpos de prova e obtenção da serragem pela marcenaria e pelo setor de produtos, respectivamente (Figura 12). As madeiras de *Cecropia* sp. e de *Pinus* sp. foram coletadas na Fazenda Água Limpa da UnB, em seguida, foram conduzidas à marcenaria para obtenção das placas suporte e dos corpos de prova.



**Figura 12.** Confeção dos corpos de prova para o ensaio de apodrecimento acelerado e obtenção da serragem de *Swartzia psilonema*.

### 2.7.2 Preparo dos frascos de vidro

Em frascos de vidro com capacidade de 250 mL, foram adicionados 130 g de solo, coletado na Fazenda Água Limpa da UnB, que foi previamente peneirado e corrigido quanto à acidez para um pH próximo de 6,0. Sobre o solo foi adicionado 65 mL de água destilada. Em cada frasco, foi depositada a placa suporte de madeira, com reconhecida suscetibilidade a um dos tipos de podridão: *Cecropia* sp. (controle para podridão branca) e *Pinus* sp. (controle para podridão parda), conforme procedimento descrito por TEIXEIRA *et al.* (2015). Após autoclavagem a 120 °C durante 45 minutos, os frascos foram acondicionados em incubadora com umidade de  $75 \pm 2\%$ , e temperatura de  $25 \pm 2$  °C por uma semana.

Os corpos de prova foram lixados e mantidos em uma sala climatizada com umidade relativa do ar de  $63 \pm 2\%$  e temperatura de  $22 \pm 2$  °C, até atingirem o teor de umidade de equilíbrio de 12%, verificada por meio de pesagens periódicas com 20% das amostras, até atingirem massa constante (variação inferior a 0,01g), desse modo, todas as demais amostras do ensaio foram pesadas em balança analítica (Shimadzu).

Para cada espécie de madeira, foram utilizados 30 corpos de prova a serem inoculados por cada isolado. O grupo controle constituiu-se de 16 corpos de prova da madeira suscetível. O teste foi conduzido com 106 corpos de prova para cada um dos nove isolados (30 para *Cecropia* sp., 30 para *Pinus* sp., 30 para *S. psilonema* e 16 do controle) totalizando 954 amostras.

### **2.7.3 Preparo do inóculo**

O cultivo dos nove isolados da Coleção para o ensaio de apodrecimento acelerado foi realizado em Erlenmeyers com 300 mL de EM, sob rotação inicial de 100 rpm em mesa agitadora (TECNAL) durante 24h e, posteriormente, mantidos por três semanas em incubadora com umidade de  $75 \pm 2\%$  e temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

Ao final desse período, em cada Erlenmeyer foi adicionada água destilada na proporção de 1:1, totalizando 600 mL. O conteúdo foi misturado em homogeneizador, do qual foi extraída uma alíquota de 3 mL que foi inoculada sobre as placas suporte de madeira, preparadas conforme descrito anteriormente. Após a inoculação, os frascos foram mantidos na incubadora, sob as mesmas condições anteriores, até a completa colonização do suporte (Figura 13).

### **2.7.4 Ensaio de apodrecimento acelerado**

Os corpos de prova foram esterilizados em autoclave por 30 minutos a 120 °C, em seguida foram inseridos assepticamente nos frascos já inoculados conforme a etapa anterior, em câmara de fluxo laminar. Os frascos foram incubados por aproximadamente 12 semanas (máximo de 16 semanas) de acordo com a perda de massa no grupo controle, averiguada a partir da 8ª semana de teste, na qual, dois corpos de prova passaram a ser pesados semanalmente. Quando esta perda de massa atingia valor igual ou superior a 50% da massa inicial, finalizava-se o experimento para cada isolado. Dessa forma, os corpos de prova eram retirados dos frascos e o micélio removido com escova de cerdas macias, permanecendo em sala climatizada até alcançar a estabilidade quanto à variação de massa, a partir da qual foi realizada a pesagem final de todas as amostras.



**Figura 13.** Ensaio de apodrecimento acelerado. Frascos de vidro com as placas suporte das madeiras suscetíveis inoculadas e mantidas em incubadora com temperatura e umidade controladas.

### 2.7.5 Determinação da durabilidade natural

A durabilidade natural da madeira foi avaliada com base na perda de massa (PM) dos corpos de prova, calculada pela diferença entre a massa inicial ( $M_i$ ), que ocorre antes do ataque do fungo apodrecedor, e a massa final ( $M_f$ ), após o ataque do fungo (Figura 14).

A equação da perda de massa:

$$PM = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100$$

**Figura 14.** Cálculo da perda de massa nos blocos de madeira submetidos ao TDN.

A partir das médias das perdas de massa, as espécies foram classificadas quanto à sua durabilidade natural (Tabela 5).

**Tabela 5.** Classes de resistência a fungos lignocelulolíticos em razão da perda de massa.

Classe de resistência	Perda de massa (%)
Altamente resistente (AR)	0 - 10
Resistente (R)	11 - 24
Resistência moderada (RM)	25 - 44
Não resistente (NR)	$\geq 45$

Fonte: (ASTM, 2005)

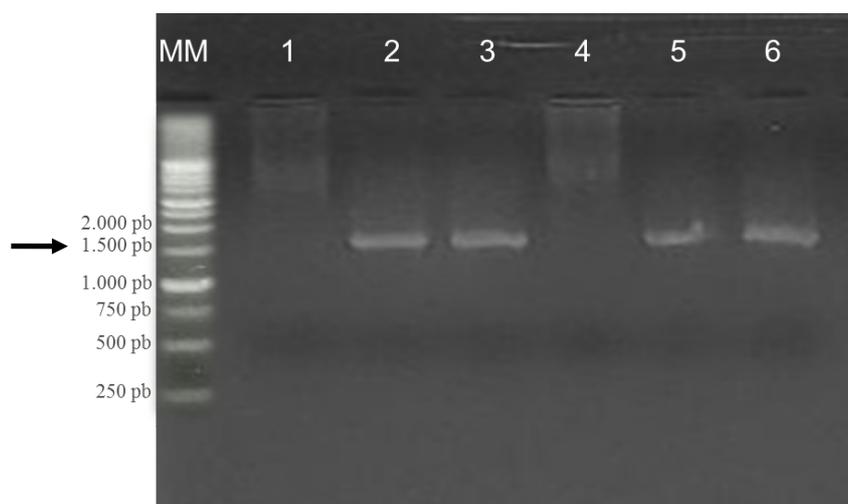
### **2.7.6 Análises estatísticas**

Na análise das médias de perdas de massa, foi verificada a presença de outliers e sua posterior remoção de acordo com Hoaglin *et al.* (1986). Considerando que os dados não apresentaram normalidade, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis através do software SPSS v. 21, com o intuito de avaliar as diferenças estatísticas entre eles.

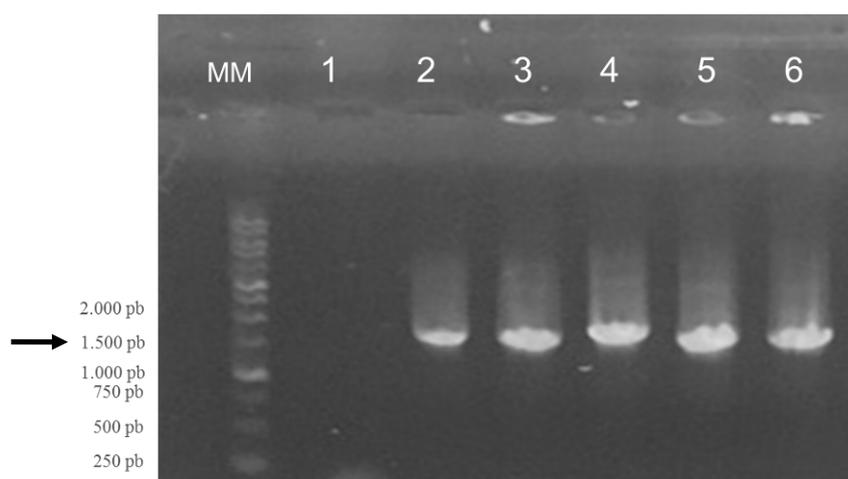
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Identificação molecular

Um único produto de PCR com o tamanho esperado de 1.500 pares de bases (pb) foi detectado nas reações realizadas contendo o DNA dos isolados *T. versicolor* (1681), *B. fumosa* (1682), *S. commune* (1826), *P. sanguineus* (1684), *P. chrysosporium* (1685), *G. applanatum* (1825), *C. puteana* (1827), *G. trabeum* (1828) e *M. incrassata* (1829) (Figuras 15 e 16).



**Figura 15.** Análise da reação de PCR para amplificação da região ITS mais LSU por eletroforese em gel de agarose a 1%. **MM:** Marcador de massa molecular 1Kb DNA Ladder. **1:** controle negativo, **2:** isolado 1681, **3:** 1682, **4:** 1826, **5:** 1684 e **6:** 1685.



**Figura 16.** Análise da reação de PCR para amplificação da região ITS mais LSU por eletroforese em gel de agarose a 1%. **MM:** Marcador de massa molecular 1Kb DNA Ladder. **1:** Controle negativo, **2:** Isolado 1825, **3:** 1826, **4:** 1827, **5:** 1828 e **6:** 1829.

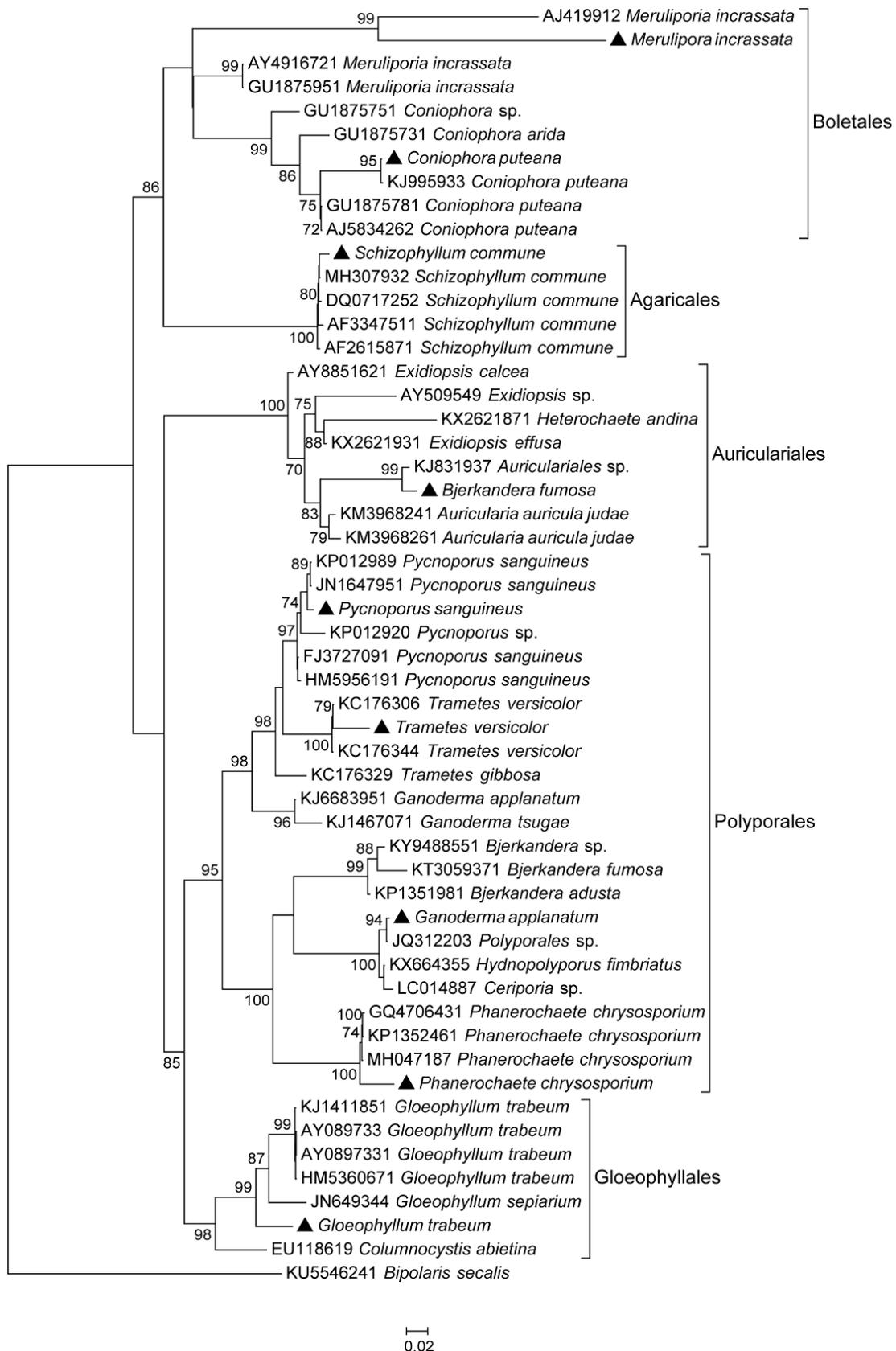
A comparação das sequências dos amplicons com a base de dados do GenBank resultou na identificação prévia dos isolados dentro das espécies esperadas, para grande parte destes, de acordo com a classificação anteriormente realizada por parâmetros morfométricos (Tabela 6).

**Tabela 6.** Análises das sequências por comparação via BLASTN no Genbank.

Isolados (UnB)	Região Genômica	Cobertura (%)	Identidade (%)	Resultado	Acesso Genbank
1681	ITS+LSU	100%	96%	<i>Trametes versicolor</i>	KC176306.1
1682	ITS+LSU	80%	97%	Auriculariales	KJ831937.1
1684	ITS+LSU	100%	95%	<i>Trametes hirsuta</i>	CP019375.1
1685	ITS+LSU	99%	99%	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MH047187.1
1825	ITS+LSU	89%	99%	<i>Hydnopolyporus fimbriatus</i>	KX664355.1
1826	ITS+LSU	97%	99%	<i>Schizophyllum commune</i>	MH307932.1
1827	ITS+LSU	100%	99%	<i>Coniophora puteana</i>	AM946631.1
1828	ITS+LSU	91%	95%	<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	JN649344.1
1829	ITS+LSU	80%	82%	<i>Meruliporia incrassata</i>	AJ419912.1

Na identificação final, a árvore filogenética obtida com as sequências da região ITS mais LSU formou cinco clados distintos pertencentes à classe Agaricomycetes, do subfilo Agaricomycotina (Figura 17). Os fungos *P. sanguineus*, *T. versicolor* e *P. chrysosporium* tiveram suas identidades confirmadas de acordo com os agrupamentos obtidos para o clado da ordem Polyporales. *G. applanatum* não teve sua identidade confirmada, apresentando-se como outra espécie da ordem Polyporales próxima de *H. fimbriatus* e *Ceriporia* sp.

Os fungos *M. incrassata* e *C. puteana*; e *S. commune* foram confirmados quanto às suas identidades, conforme os agrupamentos obtidos para as ordens Boletales e Agaricales, respectivamente. *B. fumosa* não teve sua identidade confirmada, apresentando-se como outra espécie dentro da ordem Auriculariales. O fungo *G. trabeum* agrupou com os demais isolados da espécie no clado Gloeophyllales.



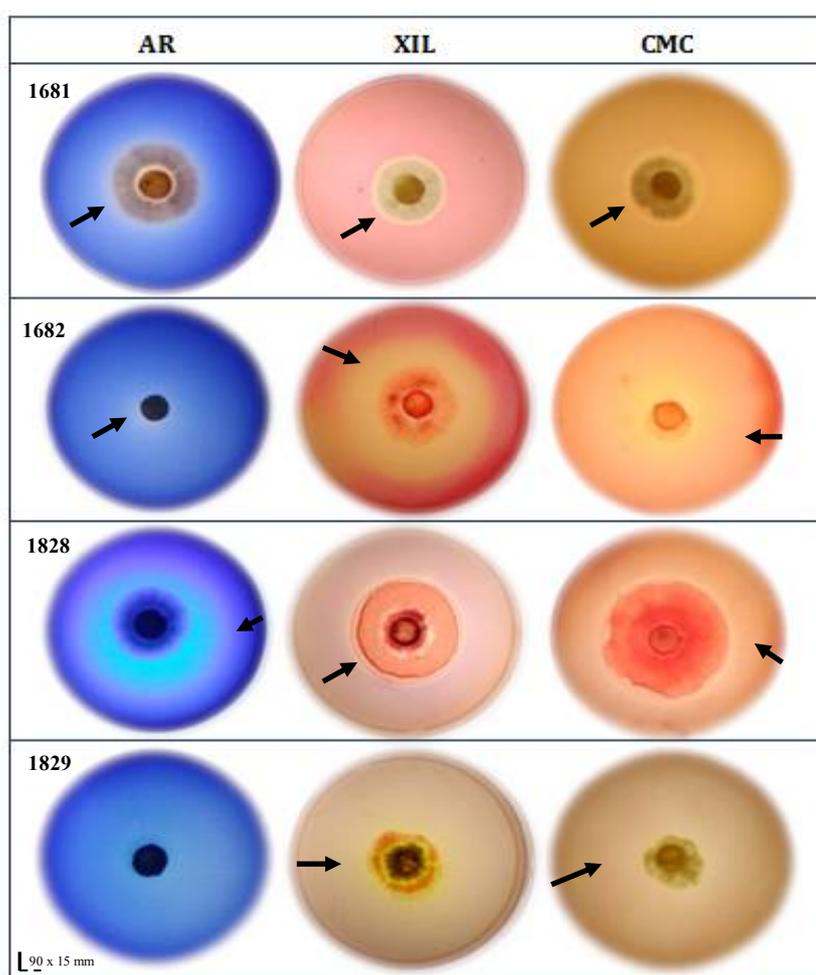
**Figura 17.** Árvore filogenética da classe Agaricomycetes. A árvore filogenética foi obtida pelo método de máxima verossimilhança com 1.000 repetições de bootstrap, fundamentada em sequências da região ITS mais LSU. Os isolados marcados correspondem aos da Coleção do LPF.

## 3.2 Avaliação da atividade lignocelulolítica

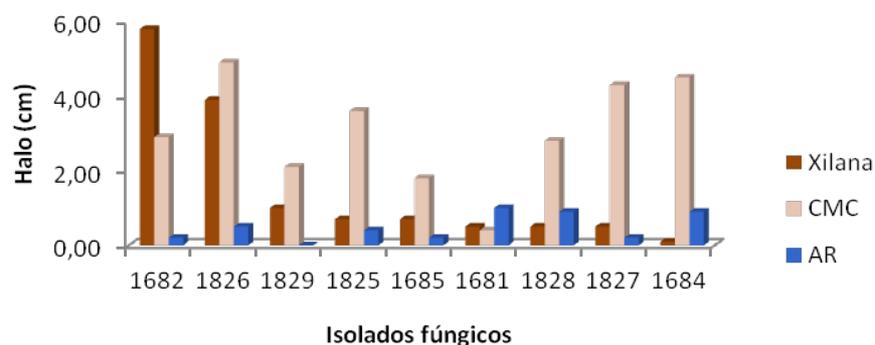
### 3.2.1 Ensaios qualitativos

Todos os isolados apresentaram halo de degradação nos ensaios qualitativos para as enzimas testadas, exceto *M. incrassata* que não mostrou atividade ligninolítica (Figura 18).

Os isolados 1682 (Auriculariales), 1826 (*S. commune*) e 1829 (*M. incrassata*) apresentaram as maiores médias de atividades sobre os três meios (azul de remazol, xilana e carboximetilcelulose) (Figura 19).



**Figura 18.** Teste qualitativo de atividade enzimática. A atividade foi determinada pelo diâmetro do halo de degradação produzido pelo fungo xilófago, conforme indicado pelas setas. **AR:** azul de remazol (atividade de enzimas ligninolíticas); **XIL:** xilana (atividade de xilanasas); e **CMC:** carboximetilcelulose (atividade de endoglucanases).

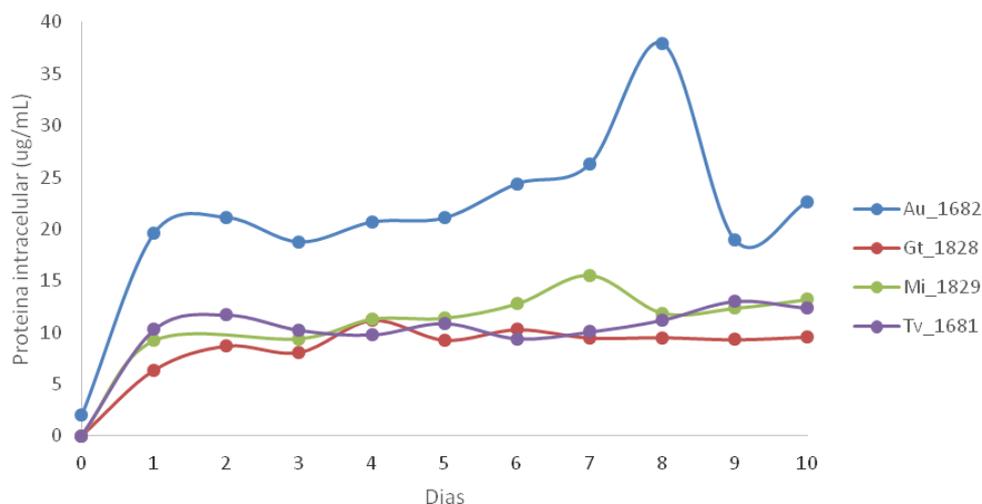


**Figura 19.** Avaliação da atividade de CMCase, xilanase e lacase por teste em placa. A atividade foi expressa pelo halo de degradação produzido por cada um dos isolados frente aos substratos CMC, xilana e azul de remazol.

### 3.2.2 Ensaios quantitativos

#### 3.2.2.1 Curva de crescimento

Todos os Basidiomycota testados cresceram em meio mínimo líquido, contendo a serragem como substrato lignocelulósico. Os fungos *M. incrassata*, *G. trabeum* e *T. versicolor* apresentaram curvas de crescimento próximas entre si e inferiores à do isolado Auriculariales (37,93 µg/mL) que apresentou o melhor crescimento micelial nas condições do teste (Figura 20).

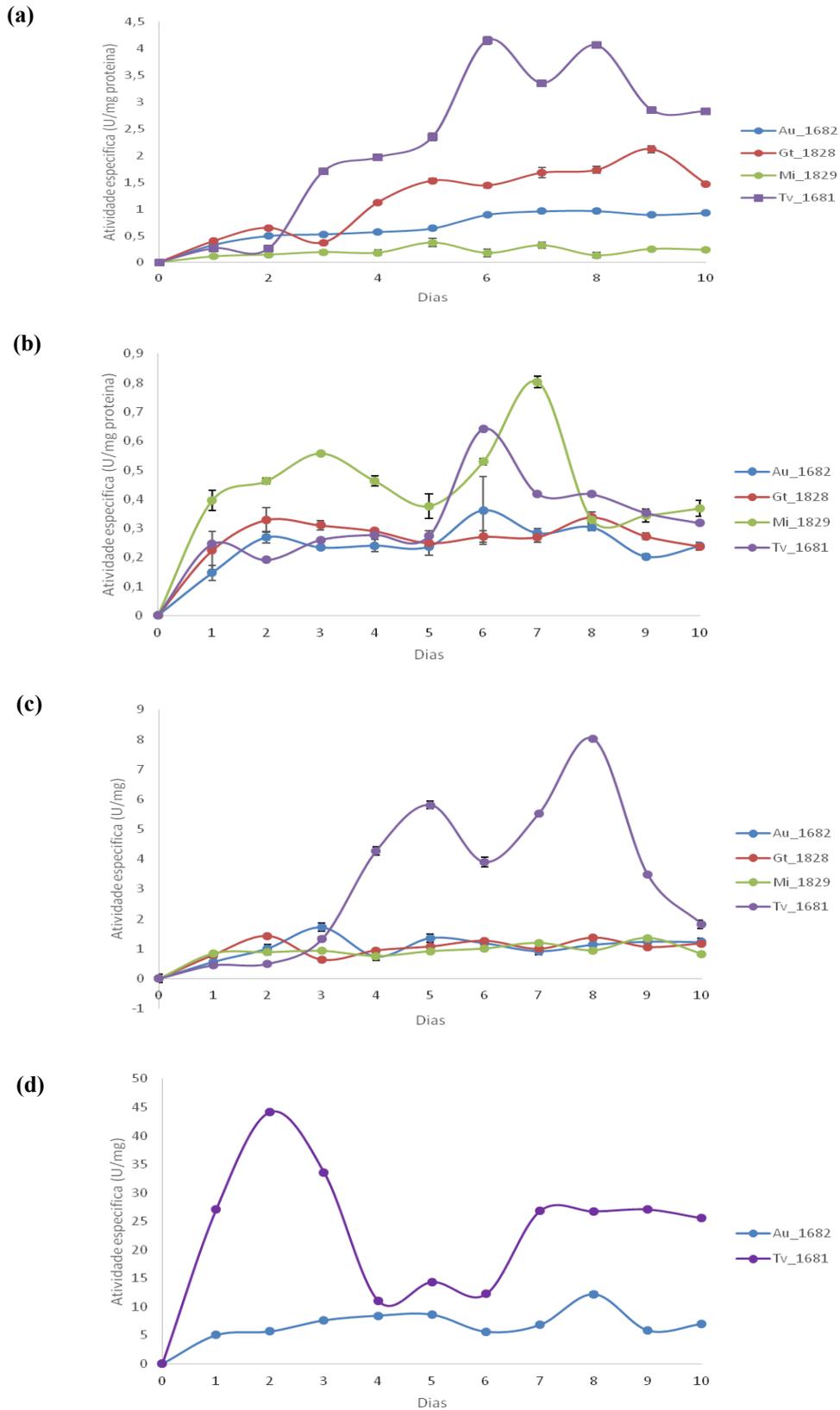


**Figura 20.** Curvas de crescimento dos isolados Auriculariales (Au\_1682), *G. trabeum* (Gt\_1828), *M. incrassata* (Mi\_1829) e *T. versicolor* (Tv\_1681) cultivados em meio mínimo líquido contendo serragem da madeira *Swartzia pylonema* como única fonte de carbono. A concentração de proteína intracelular foi utilizada como parâmetro de análise de crescimento.

### 3.2.2.2 Produção enzimática

Os quatro fungos *G. trabeum*, *M. incrassata*, *T. versicolor* e Auriculariales apresentaram atividade de endoglucanases, celulases totais e hemicelulases (Figura 21). Valores mais significativos de atividade de endoglucanases (4,15 U/mg) e xilanases (8,02 U/mg) foram obtidos para *T. versicolor*. O fungo *G. trabeum* foi o segundo em atividade específica para endoglucanases (2,12 U/mg). A maior atividade específica para celulases totais foi de *M. incrassata* (0,80 U/mg).

Com relação à atividade xilanolítica específica, os demais isolados apresentaram atividades constantes próximas entre si e inferiores à de *T. versicolor*. Apenas *T. versicolor* e Auriculariales apresentaram atividade de lacase, com os valores mais significativos de 44,22 U/mg e 12,17 U/mg, respectivamente.



**Figura 21.** Avaliação da produção de endoglucanases (a), celulases totais (b), xilanases (c) e lacases (d) pelos isolados Auriculariales (Au\_1682), *G. trabeum* (Gt\_1828), *M. incrassata* (Mi\_1829) e *T. versicolor* (Tv\_1681) quando cultivados em meio mínimo contendo serragem da madeira *S. pilonema* como única fonte de carbono.

### 3.3 Durabilidade natural

Dentre os nove Basidiomycota testados, sete cresceram sobre as placas suporte das madeiras de *Cecropia* sp. (controle para os fungos de podridão branca) e de *Pinus* sp. (controle para os fungos de podridão parda) com exceção de *S. commune* e *C. puteana*. Na etapa seguinte de inserção dos corpos de prova (CP's) das madeiras de *S. psilonema*, *Cecropia* sp. e *Pinus* sp., os sete isolados continuaram a crescer sobre os CP's nas condições do teste (Figura 22).



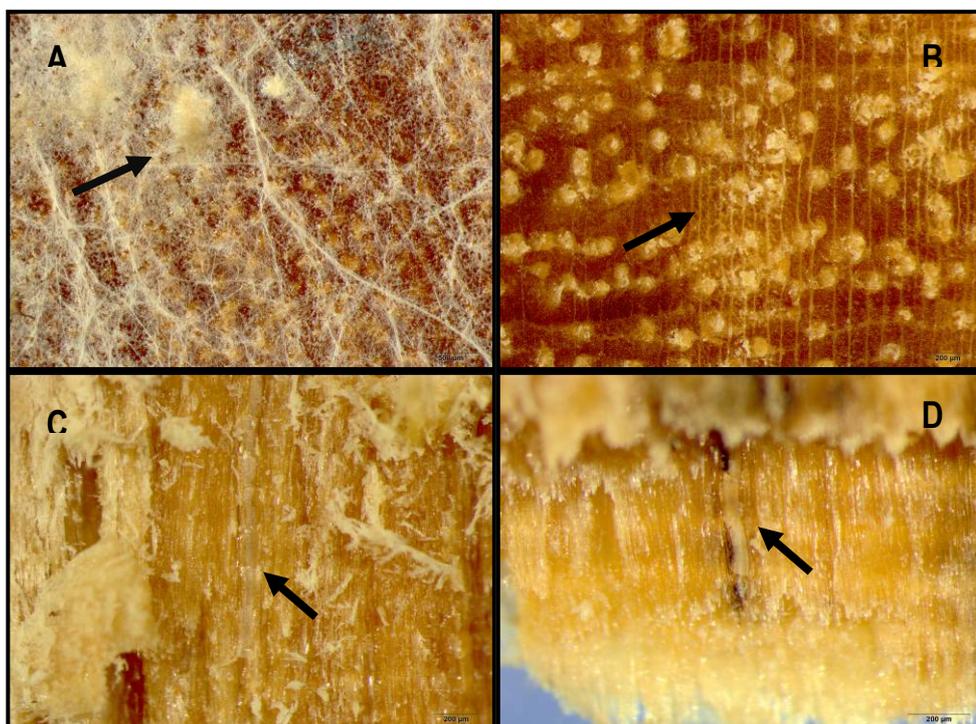
**Figura 22.** Placas suporte do grupo controle não inoculadas e corpos de prova colonizados por *Trametes versicolor*. Foto: Marcelo Fontana da Silveira (Área de Biodegradação e Preservação do LPF).

No entanto, o fungo Auriculariales não causou perda de massa significativa no grupo controle do teste após dezesseis semanas de incubação, segundo a norma ASTM, de forma que seus dados não foram computados para a determinação da durabilidade das madeiras. Foi possível, contudo, observar seu crescimento micelial sobre os CP's, nas condições do teste (Figura 23).

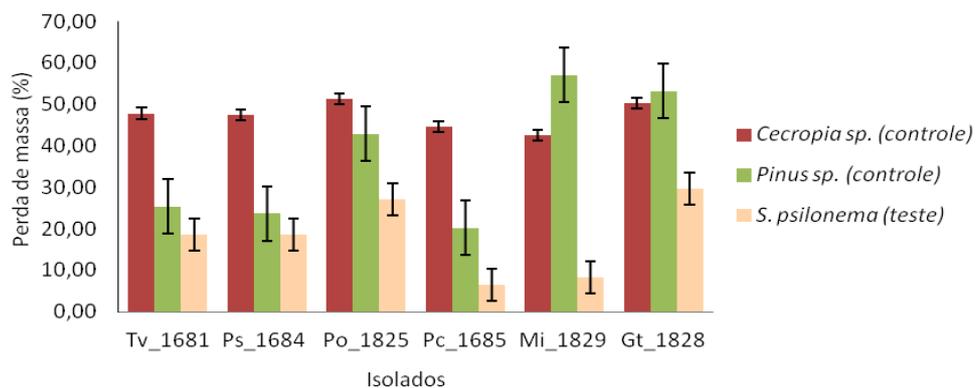
A perda de massa resultante da ação degradadora dos seis Basidiomycota lignocelulolíticos por meio do ensaio de apodrecimento acelerado, permitiu determinar a durabilidade natural da madeira de *S. psilonema*.

A madeira de *Cecropia* sp. apresentou-se como não resistente à maioria dos isolados, exceto a *P. chrysosporium* e a *M. incrassata* para os quais foi moderadamente resistente, enquanto *Pinus* sp. foi classificado como não resistente aos dois isolados causadores de podridão parda: *G. trabeum* e *M. incrassata*; moderadamente resistente aos isolados *T. versicolor* e Polyporales; e resistente a *P. sanguineus* e a *P. chrysosporium*. A madeira teste apresentou variações entre as classes de resistência, de acordo com a perda de massa para cada isolado. Foi classificada como moderadamente resistente (RM) aos fungos Polyporales (27,01%) e *G. trabeum* (29,72%); resistente (R) aos fungos *T.*

*versicolor* e *P. sanguineus* com perda de massa de 18,55% para ambos; e altamente resistente (AR) a *P. chrysosporium* (6,47%) e a *M. incrassata* (8,26%) (Figura 24).



**Figura 23.** Crescimento micelial do fungo Auriculariales sobre os corpos de prova (CP's) de *S. psilonema*, nas condições do teste de durabilidade natural, segundo a norma ASTM 2017:2005. As letras correspondem, respectivamente: **A** - crescimento micelial sobre a superfície do CP's; **B** - dano aparente à estrutura das fibras da madeira; **C e D** - crescimento no interior do vaso. Foto: Anna Sofya Silva/Alexandre Bahia (Área de Anatomia do LPF).



**Figura 24.** Gráfico com as médias das perdas de massa (%) decorrentes da ação de seis Basidiomycota lignocelulolíticas sobre: *Cecropia sp.* (controle para fungos de podridão branca), *Pinus sp.* (controle para fungos de podridão parda) e *S. psilonema* (teste).

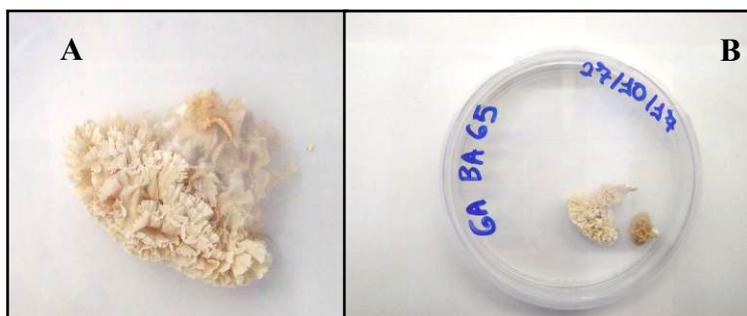
As médias da perda de massa e as respectivas classes de resistência das três espécies madeiras submetidas à degradação pelos seis Basidiomycota lignocelulolíticos são apresentadas na Tabela 7.

Durante o teste com Polyporales crescendo sobre as três madeiras, foi observado, em alguns casos, a formação de estruturas semelhantes aos basidiomas do fungo lignocelulolítico causador de podridão branca *H. fimbriatus* (Figura 25).

**Tabela 7.** Classes de resistência de três espécies madeiras baseadas na perda de massa após ensaio de apodrecimento acelerado com seis Basidiomycota lignocelulolíticos.

Espécies	Perda de massa (%)			
		<i>Cecropia</i> sp.	<i>Pinus</i> sp.	<i>S. psilonema</i>
<i>T. versicolor</i>	$\Delta m$	47,82b	25,34bc	18,55b
	Classe	NR	RM	R
<i>P. sanguineus</i>	$\Delta m$	47,42b	23,73b	18,55b
	Classe	NR	R	R
Polyporales	$\Delta m$	51,31b	42,89cd	27,01bc
	Classe	NR	RM	RM
<i>G. trabeum</i>	$\Delta m$	50,31b	53,22d	29,72c
	Classe	NR	NR	RM
<i>P. chrysosporium</i>	$\Delta m$	44,64b	20,26b	6,47a
	Classe	RM	R	AR
<i>M. incrassata</i>	$\Delta m$	42,60a	57,06d	8,26a
	Classe	RM	NR	AR

Letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de comparação de pares ao nível de 5% de probabilidade.  $\Delta m$  - Perda de massa; Classe: AR - Altamente Resistente; R - Resistente; RM - Resistência Moderada e NR - Não Resistente.



**Figura 25.** Estruturas fúngicas coletadas dos corpos de prova do ensaio de apodrecimento acelerado com o fungo Polyporales indeterminado. As letras **A** e **B** representam as imagens das estruturas coletadas após a limpeza dos CP's.

## 4 DISCUSSÃO

O LPF tem desempenhado um importante papel na área de tecnologia da madeira ao longo de mais de quatro décadas, desenvolvendo pesquisas para utilização sustentável dos recursos florestais. Dentre as suas áreas de atuação, a de Biodegradação e Preservação, objetivando coletar informações essenciais sobre a durabilidade natural das espécies florestais e produtos derivados, realiza, entre outros, o ensaio de apodrecimento acelerado em laboratório e, para isso, mantém a Coleção de fungos xilófagos, com espécies obtidas de coleções referenciadas e que são reconhecidas como “clássicas” causadoras de podridões.

Dessa forma, o estudo aqui desenvolvido partiu do pressuposto de que manter essa Coleção vai além da função de prover recursos biológicos viáveis para esse tipo de ensaio, considerando-a como um importante componente da infraestrutura científica e tecnológica do país.

Entre as ferramentas utilizadas para confirmação da identidade dos isolados da referida Coleção, foi escolhido o algoritmo Muscle para o alinhamento múltiplo das sequências da região ITS combinada com a LSU, por ser considerado mais eficiente e rápido que outros disponíveis. De acordo com Edgar (2004) isso ocorre devido ao método não exigir alinhamento inicial das sequências para gerar uma matriz de distâncias e ao fato de haver um refinamento progressivo destes alinhamentos. De acordo com o método de reconstrução filogenética da máxima verossimilhança aqui utilizado, buscou-se, entre todas as possibilidades, a árvore que melhor representou as relações de parentesco entre os isolados, conferindo, assim, um melhor posicionamento quanto às suas respectivas identificações específicas.

As regiões gênicas utilizadas neste trabalho refletem o sucesso obtido em algumas publicações recentes, nas quais são descritas como bons marcadores genéticos para identificar fungos do Filo Basidiomycota. Schoch *et al.* (2012) indicam que as regiões ITS e LSU têm um desempenho muito semelhante como *barcodes* e que a combinação entre elas é aplicada em estudos de amostragem ambiental, onde a amplificação em tandem pode permitir a identificação simultânea de espécies com ITS e a análise filogenética com LSU. De acordo com Pinho *et al.* (2016), dados como esses são importantes para a escolha da região gênica considerando os objetivos e o grupo de organismos a ser estudado, bem como a disponibilidade nos bancos de dados para comparação.

Iniciadores gerais como os pares ITS1 e ITS4 amplificam as regiões espaçadoras internas transcritas do rDNA para vários fungos, como leveduras e Ascomycota, no entanto,

podem não funcionar para outros grupos com espécies intimamente relacionadas. Para este caso, há iniciadores específicos que amplificam determinadas regiões gênicas para os Basidiomycota. Este filo, como já bem revisado, compreende os mais relevantes para degradação da madeira, de modo que, o uso destes iniciadores específicos exclui a amplificação para os demais, muito comuns em amostras ambientais, por exemplo (KIRKER, 2014).

Tal fato pode ser confirmado neste trabalho, pois o par de iniciadores específicos LR5 (*reverse*) e V9G (*forward*) amplificaram as regiões LSU e ITS do rDNA de todos os isolados, possibilitando chegar ao nível de espécie para a maioria e efetivando, por conseguinte, sua empregabilidade na resolução entre alguns membros deste complexo grupo.

Estes estudos corroboram os resultados de Xu & Adamowicz (2016), os quais destacaram o emprego de nLSU, RPB2, fator de alongação da tradução (TEF1) e da subunidade menor do ribossomo mitocondrial (mitSSU), como marcadores genéticos promissores ou possíveis *barcodes* secundários para diferenciar espécies intimamente relacionadas dentro dos Basidiomycota.

A recomendação da utilização de madeiras para aplicação em diferentes setores depende de uma análise prévia de sua durabilidade que é principalmente impactada pela degradação biótica realizada por esses Basidiomycota. Neste sentido, é necessário o entendimento dos seus mecanismos na decomposição da madeira para o desenvolvimento de novos métodos que visam maximizar sua resistência à degradação e aumentar sua vida útil. Além disso, é importante a disponibilidade de uma coleção certificada de fungos a serem utilizados nos testes de durabilidade eficientes na degradação de diferentes tipos de madeira.

Uma das contribuições do presente trabalho foi a confirmação da identificação para a maioria dos isolados utilizados no LPF para análises dos testes de durabilidade. No entanto, divergências foram encontradas quanto aos depósitos de origem para os isolados 1682 e 1825, originalmente identificados como *Bjerkandera fumosa* (L-15918-Sp) e *Ganoderma applanatum* (HHB-7823-s).

Apesar desta divergência é preciso ser cauteloso, pois segundo Choi & Kim (2017) a árvore gênica para uma população de microrganismos pode diferir de outras árvores gênicas para a mesma população, dependendo da seleção subjetiva dos genes. A árvore filogenética apresentada no presente trabalho é reflexo da escolha da região ITS combinada com a LSU do DNA.

A partir dessas análises, foi obtido o cladograma baseado nas ordens dentro da classe dos Agaricomycetes, do subfiló Agaricomycotina. A espécie *Bjerkandera fumosa* (ordem Polyporales) da coleção do LPF ficou posicionada como uma espécie dentro da ordem Auriculariales, próxima, inclusive, de *Auricularia auricula-judae*. Essa ordem também possui algumas espécies causadoras de podridão, como as da família Exidiaceae e Auriculariaceae (WORRALL *et al.*, 1997).

Quanto ao fungo originalmente depositado na coleção como *Ganoderma applanatum*, a sua posição no clado como uma espécie não identificada da ordem Polyporales aproximou-se tanto de *H. fimbriatus* quanto de *Ceriporia* sp. Vale salientar que esta ordem se destaca por possuir várias famílias e gêneros com importantes espécies causadoras de podridões. Stancheva *et al.* (2009) relataram cerca de trinta e oito espécies importantes em termos de degradação da madeira.

O isolado acima citado causou perdas de massa significativas para todas as madeiras submetidas ao TDN. As características residuais dos corpos de prova evidenciaram sua classificação como causador de podridão branca. As estruturas semelhantes aos basidiomas de *H. fimbriatus* coletadas durante a retirada do fungo dos CP's reforça a necessidade de mais estudos de caracterização para sua identificação específica.

Diante desses resultados e considerando apenas o método de preservação da Coleção (subculturas ou repiques periódicos) em uma análise mais restrita, é possível correlacioná-los às limitações relativas a este tipo de técnica, muitas vezes impraticável ao armazenamento de um grande número de culturas. Este é um método considerado vulnerável a contaminações e pode permitir alterações morfológicas, fisiológicas e genéticas aos isolados. Quando utilizado como único método de preservação a longo prazo pode conduzir à seleção de variantes fenotípicas (crescimento pleomórfico) e de mutantes, resultando, em alguns casos, em culturas completamente diferentes dos fungos originalmente isolados ou adquiridos (HOMOLKA, 2014).

Essa é uma possibilidade real e denota o quão necessário se fez dispor de métodos eficientes para validar a Coleção do LPF, conforme preconiza a *World Federation for Culture Collections* (WFCC) a respeito da autenticação de coleções biológicas. Entre as suas recomendações, as de caracterização molecular são frequentemente utilizadas para confirmar a identidade das espécies após preservação, em estágios onde as constantes manipulações das culturas colocam os isolados em risco de contaminação. Para isso, geralmente realiza-se o sequenciamento de determinadas regiões gênicas do DNA, em vários pontos no decorrer do gerenciamento das coleções (SMITH, 2012).

Dentro desse contexto, outros protocolos também são recomendados. O Consórcio Europeu de Centros de Recursos Microbianos (EMbaRC) ressaltou a importância de testes de viabilidade, confirmação de um ou mais dados morfológicos, bioquímicos e fisiológicos, além de critérios genéticos específicos, para caracterizar e identificar microrganismos (SMITH, 2012). A caracterização enzimática constitui análise bioquímica importante e funciona como teste de viabilidade e confirmação de características da espécie. Os isolados aqui avaliados passaram por um *screening* em meios seletivos comerciais que funcionaram como indicadores do potencial de degradação de lignina, celulose e hemicelulose.

Ao se avaliar visualmente os cultivos após o tratamento com corante e solução salina (exceto para azul de remazol), foi observado que praticamente todos formaram halos, com exceção de *M. incrassata* em azul de remazol, o que era esperado em virtude do seu padrão enzimático característico do seu estilo de vida, causador de podridão parda, considerando que este meio é um indicador para produção de lacases.

Esta análise permitiu inferir de forma prévia a capacidade lignocelulolítica de todos os fungos, funcionando como prova bioquímica necessária aos testes de produção posteriores.

Por meio dos gráficos de produção enzimática, foi possível analisar a atividade específica de cada enzima pelo total de proteínas extracelulares produzidas, caracterizando assim as curvas de atividades enzimáticas específicas para cada isolado e possibilitando compará-los entre si. Dessa forma, foi observado que *T. versicolor* apresentou as maiores atividades para endoglucanases e xilanases, e obteve a maior atividade para lacase. Este resultado é extensamente observado na literatura a respeito de fungos lignocelulolíticos, como nos estudos de Lekounougou *et al.* (2008) que avaliaram as enzimas extracelulares de *T. versicolor* envolvidas na degradação da madeira de *Fagus sylvatica* sob fermentação em estado sólido, considerando-o entre os melhores degradadores de lignocelulose, com produção de celulases e hemicelulases atuando sobre os polissacarídeos, e peroxidases e lacases relacionadas, principalmente, com a despolimerização da lignina.

Esta capacidade reflete o estilo de vida deste fungo, pois de acordo com Mir-Tutusaus *et al.* (2018) o termo “podridão branca” não é um agrupamento taxonômico e sim a representação de um conjunto de espécies de fungos capazes de degradar a lignina, principalmente Basidiomycota, cujas principais espécies são *P. chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum* e *Irpex lacteus*. Concluem, afirmando que no meio ambiente, eles são capazes de degradar eficientemente a lignina para facilitar o acesso aos carboidratos, os quais são mais facilmente metabolizados e que para isso contam

com um arsenal de enzimas extracelulares ligninolíticas como lacases, lignina-peroxidases, manganês-peroxidases e peroxidases versáteis. Contudo, destacaram que as condições de cultivo em diferentes substratos condicionam altamente a produção dessas enzimas.

A atividade enzimática específica de lacase também foi observada para o fungo *Auriculariales* permitindo correlacioná-lo também a esse grupo de fungos ligninolíticos. De acordo com a análise dos resultados, é possível considerar a hipótese preliminar deste fungo vir a ser *A. auricula-judae*, de acordo com o tipo de lacase que ele produz. Pois a identificação dos isolados pode ser corroborada em parte pelos dados de produção de lacases.

Segundo FAN *et al.* (2014) até a publicação de seus resultados, nenhum relato sobre lacases em *A. auricula-judae* havia sido divulgado. Seus estudos mostraram a presença de sete genes relacionados à expressão de lacases para este fungo. Através de análises filogenéticas, eles afirmaram que estas lacases se assemelham às produzidas por Ascomycota, sendo funcionalmente diferentes das de outros Basidiomycota. Eles avaliaram a expressão desses genes durante o processo de crescimento do fungo sobre a madeira e verificaram o maior nível de expressão relacionado à formação do basidioma e sua maturação.

Através da curva de crescimento de *Auriculariales* em meio mínimo com a serragem da madeira, foi observado que sua alta taxa de crescimento não significou maior atividade enzimática específica, esse fato reforça a possibilidade de que as lacases produzidas por este fungo estejam associadas principalmente ao seu crescimento.

Em relação às atividades específicas para endoglucanases, apresentaram-se baixas para todos os isolados nos primeiros dias de cultivo, o que pode estar relacionado à produção de outras enzimas pelos mesmos. *T. versicolor* e *G. trabeum* apresentaram as maiores atividades, corroborando o fato desses serem considerados entre os mais importantes fungos de podridão. Presley *et al.* (2016) assinalam que *G. trabeum* desenvolveu mecanismos específicos para remoção seletiva dos carboidratos da madeira acompanhados de perdas de genes relacionados à degradação da lignina.

Em estudos com os extratos extracelulares de *G. trabeum* cultivados por fermentação em estado sólido com *Pinus taeda*, Aguiar *et al.* (2013) observaram que este fungo produziu atividades hidrolíticas durante todo o processo de biodegradação e que ele apresentou maior atividade na conversão de carboximetilcelulose em açúcares redutores, permitindo sugerir uma predominância na atividade de endoglucanases.

Na análise da atividade específica de celulases totais sobre papel de filtro, *M. incrassata* apresentou curva superior aos demais, isso pode estar relacionado ao fato de que este isolado produz outras enzimas celulolíticas além das endoglucanases.

Para esse tipo de ensaio também é importante considerar que o substrato é insolúvel e complexo, o que pode justificar as menores atividades enzimáticas específicas observadas para os outros isolados. Para *G. trabeum*, como exemplo, Aguiar *et al.* (2013) descreveram que ele apresentou baixa capacidade de converter papel de filtro em açúcares redutores, ao avaliar seus extratos extracelulares da fermentação em estado sólido com a madeira de *Pinus taeda*.

As atividades xilanolíticas específicas dos isolados foram próximas e constantes e bem menores que a de *T. versicolor*. De maneira geral, tal fato pode estar relacionado ao tipo de substrato que para estes isolados, nas condições de cultivo, pode não ter sido um bom indutor dessas enzimas e também ao tempo de incubação, visto que nos mesmos estudos de Aguiar *et al.* (2013) a máxima atividade de *G. trabeum* na bioconversão de *Pinus taeda* foi relativa à produção de xilanases após quatro semanas de incubação.

É importante salientar que nas pesquisas de bioprospecção, diferentes tipos de substratos são avaliados como possíveis indutores, visto que a atividade específica das enzimas está correlacionada à composição do substrato. Nesses estudos, é comum a utilização de diferentes fontes de carbono na determinação do teor de enzimas, como nos estudos em processos bioquímicos de PELÁEZ *et al.* (2016) que avaliaram a capacidade de produção de enzimas lignocelulolíticas por Basidiomycota quando cultivados em diferentes formulações contendo resíduos lignocelulósicos da agroindústria.

Com exceção de Auriculariales, os demais fungos apresentaram curvas de crescimento próximas entre si, tal fato evidencia que não existe uma relação direta entre crescimento e atividade enzimática específica, pois nem sempre o que cresce mais (e conseqüentemente está produzindo mais proteínas) é o que apresenta maior atividade enzimática específica. O fungo *T. versicolor*, apesar de apresentar uma taxa de crescimento inferior à Auriculariales para o mesmo período de incubação, foi o que se destacou quanto às atividades enzimáticas específicas de modo geral.

Outra forma de avaliação da capacidade lignocelulolítica dos isolados se deu por meio do TDN, com conseqüente caracterização tecnológica da madeira teste, de acordo com norma padrão. O ensaio de apodrecimento acelerado é uma das formas clássicas de analisar a perda de massa ocasionada pela degradação biológica, especialmente de fungos lignocelulolíticos.

Dessa maneira, também responde como teste para avaliar as características biológicas inerentes a cada isolado fúngico, permitindo verificar o grau e as características da degradação causados à madeira.

O TDN, corroborando os demais dados de caracterização e autenticação da coleção, buscou avaliar a perda de massa na madeira de *S. psilonema* ocasionada pelos nove isolados selecionados. Dos quais, *S. commune* (WRF) e *C. puteana* (BRF) não colonizaram as placas suporte do ensaio, que permitem dar continuidade ao mesmo com posterior inserção dos corpos de prova da madeira a ser avaliada. Tal resultado não é comum, considerando que são fungos muito empregados na realização desses testes, com relatos de perda de massa superiores a 30%, de acordo com a espécie de madeira, como nos estudos de durabilidade frente a Basidiomycota de Plaschkies *et al.* (2014) com as espécies *C. puteana*, *T. versicolor* e *Oligoporus placenta*.

O fungo Auriculariales não apresentou perda de massa suficiente no controle do teste após 16 semanas, de forma que seu resultado não pode ser computado aos demais, de acordo com a norma ASTM 2017:05. Tal resultado pode estar relacionado ao fato deste isolado não corresponder ao isolado de origem da coleção: *B. fumosa*, apresentando características biológicas diferentes do mesmo, como evidenciado nas análises anteriores deste trabalho.

As perdas de massa ocasionadas por Polyporales e *G. trabeum* permitiram classificar a madeira de *S. psilonema* em moderadamente resistente. Ambos pertencem ao subfilo Agaricomycotina que incluem os principais decompositores de madeira (RILEY *et al.*, 2014b). O primeiro, depositado na coleção do LPF como *G. applanatum*, apesar de ter sido identificado como uma outra espécie, também degradou a madeira obedecendo ao padrão WRF. Foi observada a formação de estruturas morfológicas semelhantes aos basidiomas do políporo *H. fimbriatus* sobre os corpos de prova durante o ensaio acelerado com este fungo. Tal informação sugere a necessidade de estudos mais aprofundados de caracterização morfológica, fisiológica e genética do mesmo, já que nenhum desses fatores deve ser considerado isoladamente na determinação de uma espécie.

O fungo *G. trabeum* causou a maior perda de massa em *S. psilonema*. Causador de podridão parda, pertence aos conhecidos “políporos de brânquias da madeira” importantes economicamente em termos de biodeterioração (SCHMIDT, 2006). De acordo com Presley *et al.* (2016) os fungos de podridão parda são as principais causas de deterioração da madeira em serviço e desenvolveram mecanismos específicos de degradação seletiva dos carboidratos da parede celular.

O fungo *T. versicolor* é um dos mais estudados entre os lignocelulolíticos, sendo amplamente utilizado em ensaios de apodrecimento acelerado em laboratório (M.ABDEL-HAMID *et al.*, 2013). A madeira de *S. psilonema* testada neste trabalho foi considerada resistente à sua degradação e à de *P. sanguineus*, com perda de massa de 18,55% para ambos.

Com relação à degradação pelos fungos *P. chrysosporium* e *M. incrassata* a madeira teste foi classificada como altamente resistente, apresentando baixa perda de massa. O primeiro, em termos de estilo de vida, constitui o modelo de fungo de podridão branca, como já referenciado anteriormente, cujos mecanismos de ação das suas ligninases combinados à destacável atividade de suas outras enzimas torna esta espécie capaz de degradar vários tipos de compostos químicos (DE MATTOS-SHIPLEY *et al.*, 2016).

Já o BRF *M. incrassata*, considerado o parente filogenético Norte-Americano da espécie europeia *Serpula lacrymans*, é um fungo conhecido por promover um tipo de “podridão seca” na madeira e tem recebido considerável atenção nos últimos anos (SCHMIDT, 2007). É assim conhecido por ser resistente a baixas taxas de umidade, importante para que este fungo se dissemine através de materiais inertes como argamassa e tijolos conduzindo nutrientes por longas distâncias até as extremidades das hifas, possibilitando assim, uma maior colonização de substrato, sendo considerado, dessa forma, um sério problema em edificações (COLEMAN, 1999).

Stirling *et al.* (2017) descreveram diversos resultados de perda de massa em madeiras ocasionada por fungos em ensaios de apodrecimento acelerado, que variaram entre 9 e 59% para *M. incrassata*.

Carneiro *et al.* (2009), ao estudarem a durabilidade natural de vinte e oito espécies de madeiras da Amazônia por meio de ensaio de apodrecimento acelerado segundo a norma ASTM, verificaram que os maiores índices de degradação foram ocasionados por *M. incrassata* em relação aos demais fungos utilizados no teste, com os maiores valores de perda de massa entre 40 e 60%.

No entanto, ao considerarmos que este estudo utilizou a mesma madeira como substrato para todos os fungos em condições de teste padronizadas, e que estes apresentam estilos de vida e, conseqüentemente, mecanismos enzimáticos específicos, é possível inferir que a classificação de resistência da madeira em três categorias seja decorrente dessa diferença fisiológica entre os mesmos.

A característica de durabilidade de *S. psilonema* pode ser positivamente correlacionada aos dados da literatura sobre algumas de suas propriedades. Sendo importante analisar quais fatores estão relacionados a esta característica.

Os fatores endógenos dizem respeito às características da madeira em si como a densidade, composição química e concentração de extrativos, já os fatores exógenos relacionam-se ao ambiente onde a madeira é colocada em uso, à umidade local e à presença de organismos biodeterioradores. Todos eles, em conjunto, podem ser correlacionados com a durabilidade da mesma (SUNDARARAJ *et al.*, 2015).

Conforme os estudos de caracterização tecnológica de Carneiro *et al.* (2009), a perda de massa, o conteúdo de extrativos e o potencial de resistência estão diretamente relacionados, de modo que destacam a importância da quantidade e composição qualitativa dos extrativos como fatores que podem conferir resistência às madeiras contra a biodeterioração.

O gênero *Swartzia* tem sido caracterizado, por análises fitoquímicas, com a presença de diversos constituintes como saponinas triterpênicas, isoflavonóides e diterpenos aromáticos, para os quais foram descritas atividades antifúngicas, antimicrobianas e citotóxicas (MARQUI *et al.*, 2008). Entre algumas substâncias isoladas de sua madeira encontram-se flavonóides, saponinas e pterocarpanos (ARAÚJO, 2007).

De acordo com Sundararaj *et al.* (2015), esses metabólitos secundários de baixo peso molecular denominados extrativos, como alcalóides, fenóis, resinas, terpenos, óleos essenciais e quinonas, parecem desempenhar um papel vital para a durabilidade natural das espécies. Por fim, ressaltam que a presença de certos extrativos como flavonóides são essenciais contra a degradação por fungos, especialmente os causadores de podridões branca e parda, por romper as suas paredes celulares.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos de autenticação de coleções biológicas são fundamentais para a manutenção da viabilidade das mesmas. Dispondo de técnicas apropriadas, foi possível validar parte da Coleção de fungos xilófagos do LPF, para a qual obteve-se a confirmação da identificação a nível de espécie dos isolados *T. versicolor*, *S. commune*, *P. sanguineus*, *P. chrysosporium*, *C. puteana*, *G. trabeum* e *M. incrassata*, entre os nove avaliados.

A maioria correspondeu, em termos de suas identidades, aos mantidos pela coleção, conforme seus códigos de origem. Porém, dois deles foram identificados apenas a nível de ordem, um pertencente à ordem Auriculariales e outro à ordem Polyporales, diferindo da identificação de quando originalmente depositados na coleção, que correspondiam a *B. fumosa* e *G. applanatum*, respectivamente. Dessa forma, observa-se a necessidade de amplificar e sequenciar outras regiões gênicas do DNA para esses isolados, como RPB1 e TEF1, para alcançar a especificidade dos mesmos.

Por meio da caracterização enzimática de *T. versicolor*, Auriculariales, *G. trabeum* e *M. incrassata*, foi possível observar as atividades específicas de suas enzimas, relacionadas à degradação da biomassa lenhosa, para as quais *T. versicolor* apresentou as maiores atividades. Já o fungo Auriculariales apresentou a maior taxa de crescimento, em detrimento das menores atividades enzimáticas observadas. Todos os isolados apresentaram atividades específicas de celulases totais, endoglucanases e xilanases. Apenas em *T. versicolor* e Auriculariales foram observadas atividades de lacases.

A avaliação do potencial biodegradativo por meio de ensaio de apodrecimento acelerado permitiu atestar a viabilidade de *T. versicolor*, *P. sanguineus*, *P. chrysosporium*, Polyporales, *G. trabeum* e *M. incrassata*, que cresceram sobre os corpos de prova de *Cecropia* sp., *Pinus* sp. e *S. psilonema*, causando-lhes perdas de massa significativas. Os fungos *S. commune* e *C. puteana* não cresceram sobre as placas suporte do ensaio. O fungo Auriculariales, apesar do relativo crescimento, não causou perdas de massa significativas para o teste. As maiores perdas de massa foram registradas para *G. trabeum* e para o fungo não identificado a nível de espécie da ordem Polyporales. Esses resultados, além de promoverem a autenticação da coleção, corroboraram a caracterização tecnológica pioneira da madeira de *S. psilonema*, quanto à sua durabilidade, pois até o momento não há publicações comparáveis examinando sua resistência à degradação por fungos lignocelulolíticos.

Considerando os resultados em conjunto, é possível sugerir uma reformulação no processo de gerenciamento da Coleção, com o intuito de garantir a autenticidade e viabilidade

dos isolados. Portanto, recomenda-se a combinação de métodos adequados para a preservação a longo prazo, bem como, dispor do método considerado entre os mais eficazes para este grupo de fungos: a criopreservação em freezer a - 80 °C, a fim de promover uma maior segurança à Coleção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF. Anuário Estatístico-Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Anuário Estatístico ABRAF**, p. 146, 2013.

ABRAHÃO, M. C. **Diversidade e ecologia de Agaricomycetes lignolíticos do Cerrado da Reserva Biológica de Mogi-Guaçu, estado de São Paulo, Brasil (exceto Agaricales e Corticiales)**. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, p. 132, 2012.

ADAIR, S.; KIM, S. H.; BREUIL, C. A molecular approach for early monitoring of decay basidiomycetes in wood chips. **FEMS Microbiology Letters**, v. 211, n. 1, p. 117–122, 2002.

AGUIAR, A.; GAVIOLI, D.; FERRAZ, A. Extracellular activities and wood component losses during *Pinus taeda* biodegradation by the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 82, p. 187–191, 2013.

AN, H. *et al.* Molecular characterization of a novel thermostable laccase PPLCC2 from the brown rot fungus *Postia placenta* MAD-698-R. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2015.

ANGYALOSSY-ALFONSO, V.; MILLER, R. B. Wood anatomy of the Brazilian species of *Swartzia* and considerations within the tribe Swartzieae. **IAWA Journal**, v. 23, n. 4, p. 359–390, 2002.

APETORGBOR, M. M. *et al.* Biodeteriorating agents associated with three tropical timber species. **Forest Ecology and Management**, v. 195, n. 3, p. 311–323, 2004.

ARAÚJO, F. S.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V.; MARTINS, F. R. Repartição da flora lenhosa no domínio da Caatinga. In: ARAÚJO, F. S.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V. (Org.). **Análise das variações da biodiversidade do bioma Caatinga: suporte a estratégias regionais de conservação**. Brasília: MMA/SBF, 2005. p. 15-33.

ARAÚJO, M. F. DE. Estudo fitoquímico e avaliação biológica de *Swartzia apetala* var. *glabra*. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2007. p. 168.

ASTM. Standard Test Method of Accelerated Laboratory Test of Natural Decay Resistance of Woods ASTM 2017. **West Conshohocken**, 2005.

ÁVILA, J. M. M. P. M.; SIMIONI, F. J.; BATISTA, E. DE O. Importância e desempenho das florestas plantadas no contexto do agronegócio brasileiro. **Floresta**, v. 47, n. 1, p. 85–94, 2017.

BASHIR, H.; GANGWAR, R.; MISHRA, S. Differential production of lignocellulolytic enzymes by a white rot fungus *Termitomyces* sp. OE147 on cellulose and lactose. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, 2015.

BINDER, M. *et al.* Amylocorticiales ord. nov. and Jaapiales ord. nov.: Early diverging clades of Agaricomycetidae dominated by corticioid forms. **Mycologia**, v. 102, n. 4, p. 865–880,

2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRITO, L. D. Patologia em Estruturas de Madeira : Metodologia de Inspeção e Técnicas de Reabilitação. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. p. 502, 2014.

BRONDZ, I. FUNGI | Classification of the Basidiomycota. **Encyclopedia of Food Microbiology, Elsevier**, v. 2, p. 20–29, 2014.

CAJTHAML, T. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds by ligninolytic fungi: Mechanisms involved in the degradation. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 4822–4834, 2015.

CARDER, J. H. Detection and quantitation of cellulase by Congo red staining of substrates in a cup-plate diffusion assay. **Analytical Biochemistry**, v. 153, n. 1, p. 75–79, 1986.

CARLIER, F.-X. *et al.* Some Coniophoraceae (Basidiomycetes, Boletales) from the Ethiopian highlands: *Coniophora bimacrospora*, sp. nov. and a note on the phylogenetic relationships of *Serpula similis* and *Gyrodontium*. **Cryptogamie Mycologie**, v. 25, p. 261–275, 2004.

CARNEIRO, J. S. *et al.* Decay susceptibility of Amazon wood species from Brazil against white rot and brown rot decay fungi. **Holzforschung**, v. 63, n. 6, p. 767–772, 2009.

CARVALHO, W. *et al.* Uma Visão Sobre a Estrutura, Composição E Biodegradação Da Madeira Madeira: Estrutura E Composição Química. **Quim. Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191–2195, 2009.

CASTRO, C. Gestão florestal no Brasil colônia. **Gestão florestal no Brasil colônia**, p. 205, 2002.

CHOI, J.; KIM, S.-H. A genome Tree of Life for the Fungi kingdom. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 35, p. 201711939, 2017.

CHOWDHARY, A. *et al.* Clinical significance of filamentous basidiomycetes illustrated by isolates of the novel opportunist *Ceriporia lacerata* from the human respiratory tract. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 585–590, 2013.

COELHO, N. DA S.; HANADA, R. E.; DE JESUS, M. A. Identificação de fungos xilófagos depositados na Coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do INPA. p. 155–156, 2007.

COLEMAN, G. R. A podridão seca e o seu controle. **M.I.Biol.**, p. 1–13, 1999.

DE ARAUJO, V. A. *et al.* Importância da madeira de florestas plantadas para a indústria de manufaturados. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 90, p. 189, 2017.

DE MATTOS-SHIPLEY, K. M. J. *et al.* The good, the bad and the tasty: The many roles of

- mushrooms. **Studies in Mycology**, v. 85, n. Litten 1975, p. 125–157, 2016.
- DÉJARDIN, A. *et al.* Wood formation in Angiosperms. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 333, n. 4, p. 325–334, 2010.
- EDGAR, R. C. MUSCLE. Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 1792–1797, 2004.
- EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L. Preservation of basidiomycete strains on perlite using different protocols. **Mycoscience**, v. 55, n. 6, p. 439–448, 2014.
- FACKLER, K.; SCHWANNINGER, M. How spectroscopy and microspectroscopy of degraded wood contribute to understand fungal wood decay. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 587–599, 2012.
- FAN, X. *et al.* Cloning, expression and phylogenetic analysis of a divergent laccase multigene family in *Auricularia auricula-judae*. **Microbiological Research**, v. 169, n. 5–6, p. 453–462, 2014.
- FAO. Panorama Mundial. **Situación de los bosques del mundo 2007**, p. 64–71, 2007.
- FLOUDAS, D.; HIBBETT, D. S. Revisiting the taxonomy of *Phanerochaete* (Polyporales, Basidiomycota) using a four gene dataset and extensive ITS sampling. **Fungal Biology**, v. 119, n. 8, p. 679–719, 2015.
- FORZZA, R. C. *et al.* **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro: 2010. p. 876.
- FROESE, R. **Species 2000 & ITIS Catalogue of Life**. Disponível em: <[www.catalogueoflife.org/col/](http://www.catalogueoflife.org/col/)>. Acesso em: 28 jul. 2017.
- GARCIA-SANDOVAL, R. *et al.* Molecular phylogenetics of the Gloeophyllales and relative ages of clades of Agaricomycotina producing a brown rot. **Mycologia**, v. 103, n. 3, p. 510–524, 2011.
- GARCIA, T. A. Purificação e Caracterização das Lacases de *Pycnoporus sanguineus*. Universidade de Brasília: Departamento de Biologia Celular, 2006. p. 126.
- GARIGLIO, M. A. *et al.* **Uso sustentável e Conservação dos Recursos Florestais da Caatinga**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010. p. 368.
- GARIGLIO, M. A. **Estatística Florestal da Caatinga**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2015. v. 2, p. 142.
- GARNICA, S. *et al.* Reconstructing the evolution of agarics from nuclear gene sequences and basidiospore ultrastructure. **Mycological Research**, v. 111, n. 9, p. 1019–1029, 2007.
- GBIF. **GBIF Backbone Taxonomy**. Disponível em: <<https://doi.org/10.15468/39omei>>. Acesso em: 10 out. 2017.

GOMES, H. A. R. Revelando o potencial de *Clonostachys byssicola* em produzir enzimas holocelulolíticas. Universidade de Brasília: Biologia Molecular, p. 214, 2017.

HAGIWARA, Y. *et al.* Bleaching of leaf litter and associated microfungi in subboreal and subalpine forests. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 735–743, 2015.

HAMMOND, D. S. *et al.* A compilation of known Guianan timber trees and the significance of their dispersal mode, seed size and taxonomic affinity to tropical rain forest management. **Forest Ecology and Management**, v. 83, p. 99–16, 1996.

HEEGER, F. *et al.* Long-read DNA metabarcoding of ribosomal rRNA in the analysis of fungi from aquatic environments. **bioRxiv**, p. 283127, 2018.

HIBBETT, D. S. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509–547, 2007.

HISCOX, J.; O'LEARY, J.; BODDY, L. Fungus wars: basidiomycete battles in wood decay. **Studies in Mycology**, v. 89, p. 117–124, 2018.

HOAGLIN, D. C. .; IGLEWICZ, B. .; TUKEY, J. W. Performance of some resistant rules for outlier labeling, Journal of American Statistical Association. **Journal of American Statistical Association**, v. 81, n. 996–999, 1986.

HOMOLKA, L. Preservation of live cultures of basidiomycetes - Recent methods. **Fungal Biology**, v. 118, n. 2, p. 107–125, 2014.

IBÁ. - Indústria brasileira de Árvores. **Anuario estatístico da IBA: ano base 2014. 2015**, p. 100, 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística. **Estatísticas do registro civil 2014**, v. 41, p. 1–81, 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da extração vegetal e da silvicultura**, v. 31, p. 1–55, 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Contas Nacionais Trimestrais**, v. 1, p. 1–31, 2018.

JANG, Y. *et al.* Diversity of wood-inhabiting polyporoid and corticioid fungi in Odaesan National Park, Korea. **Mycobiology**, v. 44, n. 4, p. 217–236, 2016.

JASALAVICH, C. A.; OSTROFSKY, A.; JELLISON, J. Detection and Identification of Decay Fungi in Spruce Wood by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Genes Encoding rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4725–4734, 2000.

JUBILUT, P. R. **ANÉIS DE CRESCIMENTO: O ÁLBUM DE FOTOGRAFIAS DE UMA ÁRVORE**. Disponível em: <<http://ufpr.pecca.com.br/aneis-de-crescimento-o-album-de-fotografias-de-uma-arvore/>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

JUSTO, A. *et al.* A revised family-level classification of the Polyporales (Basidiomycota). **Fungal Biology**, v. 121, n. 9, p. 798–824, 2017.

JUSTO, A.; HIBBETT, D. S. Phylogenetic classification of *Trametes* (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset. **Taxon**, v. 60, n. 6, p. 1567–1583, 2011.

JUVENAL, T. L.; MATTOS, R. L. G. O setor Florestal no Brasil e importância do reflorestamento. **BNDES- Setorial**, v. 5, p. 3–30, 2002.

KANG, Y. *et al.* Screening of basidiomycetes and gene expression of selected lignin modifying enzymes of *Phlebia radiata* during biodeterioration of three wood types. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 7, p. 545–553, 2010.

KIRKER, G. T. Genetic Identification of Fungi Involved in Wood Decay Traditional Methods for Identification of Wood Decay. **Deterioration and Protection of Sustainable Biomaterials**, p. 81–91, 2014.

KOEBEL, B. M. *et al.* Productivity, resource endowment and trade performance of the wood product sector. **Journal of Forest Economics**, v. 22, p. 24–35, 2016.

KONSA, K.; TIRRUL, I.; HERMANN, A. Wooden objects in museums: Managing biodeterioration situation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 86, p. 165–170, 2014.

LE, A.; JOURDES, M.; TEISSEDRE, P. Polysaccharides and lignin from oak wood used in cooperage : Composition , interest , assays : A review. **Carbohydrate Research**, v. 417, p. 94–102, 2015.

LEITÃO, V. O. *et al.* Growth and expression of relevant metabolic genes of *Clostridium thermocellum* cultured on lignocellulosic residues. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 825–834, 2017.

LEKOUNOUGOU, S. *et al.* Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: Enzymatic characterization. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, p. 287–293, 2008.

LEVIN, L.; MELIGNANI, E.; RAMOS, A. M. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4554–4563, 2010.

LIND, M.; STENLID, J.; OLSON, Å. *Heterobasidion annosum* s.l. Genomics. **Advances in Botanical Research**, v. 70, p. 371–396, 2014.

LOPEZ, A.; GARCIA, J. *Hydnopolyporus fimbriatus* Poriales: Coriolaceae. **Fungal Veracruzana**, n. October, p. 4, 2011.

LORENZINI, M. *et al.* Polymorphism and phylogenetic species delimitation in filamentous fungi from predominant mycobiota in withered grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 56–62, 2016.

LOUREIRO, A. A.; RODRIGUES, W. A. Estudo anatômico da madeira do gênero *Swartzia* (Leguminosae) da Amazônia - I. **ACTA AMAZONICA**, v. 5, n. 1, p. 79–86, 1975.

LUNDELL, T. K. *et al.* Genomics, lifestyles and future prospects of wood-decay and litter-decomposing basidiomycota. **Advances in Botanical Research**, v. 70, p. 329-370, 2014.

LUTZONI, F. *et al.* Assembling the fungal tree of life: Progress, classification, and evolution of subcellular traits. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 10, p. 1446–1480, 2004.

M.ABDEL-HAMID, A.; O.SOLBIATI, J.; K.O.CANN., I. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. Volume 82, p. 28, 2013.

MACPHERSON, A. J. *et al.* The sustainability of timber production from Eastern Amazonian forests. **Land Use Policy**, v. 29, n. 2, p. 339–350, 2012.

MÄKELÄ, M. R.; DONOFRIO, N.; DE VRIES, R. P. Plant biomass degradation by fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 2–9, 2014.

MALYSHEVA, V.; SPIRIN, V. Taxonomy and phylogeny of the Auriculariales (Agaricomycetes, Basidiomycota) with stereoid basidiocarps. **Fungal Biology**, v. 121, n. 8, p. 689–715, 2017.

MANSANO, V. F.; LIMA, J. R. O gênero *Swartzia* schreb. (Leguminosae, Papilionoideae) no estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v. 58, n. 2, p. 469-483, 2007.

MANSANO, V. F.; TOZZI, A. M. G. A. The taxonomy of some Swartzieae (Leguminosae, subfam. Papilionoideae) from southeastern Brazil. **Brittonia**, v. 51, n. 2, p. 149–158, 1999.

MARQUI, S. R. DE *et al.* SAPONINAS ANTIFÚNGICAS DE *Swartzia langsdorffii*. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 828–831, 2008.

MARTIN, R. *et al.* Unexpected diversity of basidiomycetous endophytes in sapwood and leaves of *Hevea*. **Mycologia**, v. 107, n. 2, p. 284–297, 2015.

MARTÍNKOVÁ, L. *et al.* Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. **Chemosphere**, v. 149, p. 373–382, 2016.

MAY, T. W. The status of names and records of Australian macrofungi. **New Zealand Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 379–389, 2003.

MAYER, T. *et al.* Microbial succession in an inflated lunar/Mars analog habitat during a 30-day human occupation. **Microbiome**, v. 4, p. 1–17, 2016.

MEIRELLES, A. C.; SOUZA, L. A. G. Germinação natural de oito espécies de *Swartzia* (Fabaceae, Faboideae) da Amazônia. **Scientia Amazonia**, v. 4, n. 3, p. 84–92, 2015.

MELLEROWICZ, E. J.; SUNDBERG, B. Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 11, p. 293-300, 2008.

- MENDES, A. S.; ALVES, M. V. S. **A degradação da madeira e sua preservação**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, p. 58, 2002.
- MENDES, M. R. DE A.; CASTRO, A. A. J. F. Vascular flora of semi-arid region, São José do Piauí, state of Piauí, Brazil. **Check List**, v. 6, n. 1, p. 39–44, 2010.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MIR-TUTUSAUS, J. A. *et al.* Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. **Water Research**, v. 138, p. 137–151, 2018.
- MONCALVO, J. M. *et al.* One hundred and seventeen clades of euagarics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 23, n. 3, p. 357–400, 2002.
- MORETH, U.; SCHMIDT, O. Investigations on ribosomal DNA of indoor wood decay fungi for their characterization and identification. **Holzforschung**, v. 59, n. 1, p. 90–93, 2005.
- NIEMENMAA, O.; HATAKKA, P. A. Monitoring of Fungal Growth and Degradation of Wood. University of Helsinki, Finland: Department of Applied Chemistry and Microbiology, p. 73, 2008.
- NILSSON, T.; ROWELL, R. Historical wood – structure and properties. **Journal of Cultural Heritage**, v. 13, n. 3, p. S5–S9, 2012.
- OHM, R. A. *et al.* Genomics of wood-degrading fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 82–90, 2014.
- PELÁEZ, R. R. *et al.* **III Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia**. Lignocelulases de basidiomicetos cultivados em biomassas vegetais residuais da agroindústria do dendê. **Anais**, p. 306, 2016.
- PINHO, D. B.; MACHADO, A. R.; FIRMINO, A. L. Princípios e Métodos para Identificação Molecular de Fungos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds.). **Métodos em Fitopatologia**. 2<sup>a</sup> ed. Minas Gerais, Brasil: [s.n.]. p. 516, 2016.
- PLASCHKIES, K. *et al.* Investigations on natural durability of important European wood species against wood decay fungi. Part 1: Laboratory tests. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 90, p. 52–56, 2014.
- PRESLEY, G. N.; ZHANG, J.; SCHILLING, J. S. A genomics-informed study of oxalate and cellulase regulation by brown rot wood-degrading fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 112, p. 64–70, 2016.
- RAMAGE, M. H. *et al.* The wood from the trees: The use of timber in construction. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 68, n. September 2016, p. 333–359, 2017.
- RILEY, R. *et al.* Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. **Proceedings of the National**

**Academy of Sciences**, v. 111, n. 27, p. 9923–9928, 2014.

RUNGJINDAMAI, N. *et al.* Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. **Fungal diversity**, n. 1991, p. 139–161, 2008.

RYTIOJA, J. *et al.* Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 614–649, 2014.

SCHMIDT-DANNERT, C. Biocatalytic portfolio of Basidiomycota. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 31, p. 40–49, 2016.

SCHMIDT, O. Wood and Tree Fungi Biology, Damage, Protection, and Use. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, v. 1, p. 336, 2006.

SCHMIDT, O. Indoor wood-decay basidiomycetes: Damage, causal fungi, physiology, identification and characterization, prevention and control. **Mycological Progress**, v. 6, n. 4, p. 261–279, 2007.

SCHMIDT, O.; MORETH, U. Data bank of rDNA-ITS sequences from building-rot fungi for their identification. **Wood Science and Technology**, v. 36, n. 5, p. 429–433, 2002.

SCHMIDT, O.; MORETH, U. Ribosomal DNA intergenic spacer of indoor wood-decay fungi. **Holzforschung**, v. 62, n. 6, p. 759–764, 2008.

SHIROUZU, T. *et al.* Early-diverging wood-decaying fungi detected using three complementary sampling methods. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 98, p. 11–20, 2016.

SILVA, R. *et al.* Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 661–671, 2009.

SJOKVIST, E. *et al.* Stipitate stereoid basidiocarps have evolved multiple times. **Mycologia**, v. 104, n. 5, p. 1046–1055, 2012.

SMITH, D. Culture Collections. In: **Advances in Applied Microbiology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2012. v. 79, p. 73–118.

SNIF. **Produção Florestal**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, v. 1, p. 1–7, 2016a.

SNIF. **Recursos Florestais**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, v. 1, p. 1–7, 2016b.

SOUZA, E. P. DE. **Caracterização Anatômica do Lenho de 10 Espécies Florestais da Caatinga**. Project charter. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, Laboratório de Produtos Florestais, p. 23, 2017.

STANCHEVA, Y. *et al.* **Atlas of Wood Decaying Fungi**. 1st. ed. Bulgaria: Pensoft Publishers, 2009.

STIRLING, R.; STURROCK, R. N.; BRAYBROOKS, A. Fungal decay of western redcedar

wood products— a review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 125, p. 105–115, 2017.

SUNDARARAJ, R. *et al.* Natural durability of timbers under indian environmental conditions - an overview. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 103, p. 196–214, 2015.

TEIXEIRA, D. E.; GARLET, A.; SANCHES, K. L. R. Resistance of Particleboard Panels Made of Agricultural Residues and Bonded With Synthetic Resins or Pvc Plastic To Wood-Rotting Fungi. **Cerne**, v. 15, p. 413–420, 2015.

THORN, R. G. *et al.* Isolation of aphytic basidiomycetes from soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4288–4292, 1996.

TOUSSAINT, M. *et al.* Whole-cell biosensor of cellobiose and application to wood decay detection. **Journal of Biotechnology**, v. 239, p. 39–46, 2016.

VALENCIA, E. Y.; CHAMBERGO, F. S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 9–18, 2013.

VIALLE, A. *et al.* Evaluation of mitochondrial genes as DNA barcode for Basidiomycota. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. SUPPL. 1, p. 99–113, 2009.

WESTPHALEN, M. C. *et al.* *Bjerkandera* in the Neotropics: phylogenetic and morphological relations of *Tyromyces atroalbus* and description of a new species. **Mycological Progress**, v. 14, n. 11, 2015.

WORRALL, J. J.; ANAGNOST, S. E.; ZABEL, R. A. Comparison of Wood Decay among Diverse Lignicolous Fungi. **Mycologia**, v. 89, n. 2, p. 199, 1997.

WU, F. *et al.* Global diversity and taxonomy of the *Auricularia auricula-judae* complex (Auriculariales, Basidiomycota). **Mycological Progress**, v. 14, n. 10, 2015.

XAVIER-SANTOS, S. *et al.* Screening for Pectinolytic Activity of Wood-Rotting Basidiomycetes and Characterization of the Enzymes. **Folia Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 46–52, 2004.

XU, J.; ADAMOWICZ, S. Fungal DNA *barcoding* . **Genome**, v. 59, n. 11, p. 913–932, 2016.

YUAN, Z. L. *et al.* From pattern to process: Species and functional diversity in fungal endophytes of *Abies beshanzuensis*. **Fungal Biology**, v. 115, n. 3, p. 197–213, 2011.

ZABEL, R. A.; MORREL, J. J. **Wood Microbiology Decay and Its Prevention**. United States: Harcourt Brace Jovanovich, 1992.

ZENID, G. J. Espécies nativas com potencial madeireiro e moveleiro. **Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S. A. - IPT**, p. 17, 1997.

ZHANG, H. *et al.* Purification and characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus *Cerrena unicolor* BBP6 and its application in dye decolorization and denim

bleaching. **Process Biochemistry**, v. 66, n. September 2017, p. 222–229, 2018.

ZHOU, X. *et al.* Evaluating fast maximum likelihood-based phylogenetic programs using empirical phylogenomic data sets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 2, p. 486–503, 2018.