



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CRISTIANE MORENO MARTINS

**FUNGOS EMBOLORADORES E MANCHADORES
ASSOCIADOS À MADEIRA DE *Pinus* spp.:
GÊNEROS, ALTERAÇÕES E CONTROLE BIOLÓGICO**

Londrina
2007

CRISTIANE MORENO MARTINS

**FUNGOS EMBOLORADORES E MANCHADORES
ASSOCIADOS À MADEIRA DE *Pinus* spp.:
GÊNEROS, ALTERAÇÕES E CONTROLE BIOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Martin Homechin.

Londrina
2007

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M386f Martins, Cristiane Moreno.

Fungos emboloradores e manchadores associados à madeira de *Pinus* spp. : gêneros, alterações e controle biológico / Cristiane Moreno Martins. – Londrina, 2007.
147f. : il.

Orientador : Martin Homechin.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2007.

Bibliografia : f. 128-147.

1. Madeira – Fungos emboloradores – Teses. 2. Madeira – Fungos manchadores – Teses. 3. Madeira – Fungos – Controle biológico – Teses. 4. Fungos – Culturas e meios de cultura. I. Homechin, Martín. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 634.0.84

CRISTIANE MORENO MARTINS

**FUNGOS EMBOLORADORES E MANCHADORES
ASSOCIADOS À MADEIRA DE *Pinus* spp.:
GÊNEROS, ALTERAÇÕES E CONTROLE BIOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Martin Homechin – UEL

Profa. Dra. Débora Cristina Santiago – UEL

Prof. Dr. Edson Luiz Furtado – UNESP-
Botucatu

Prof. Dr. João Batista Vida (suplente) – UEM

Prof. Dr. Ézio de Pádua Fonseca (suplente) –
UEL

Prof. Dr. Martin Homechin – Orientador

Londrina, 02 de março de 2007.

*Ao meu pai,
Celso de Matos Martins,
pelo exemplo de luta, paciência e companheirismo,
dedico cada linha, pensamento e emoção contidos neste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guiou durante este estudo e me concedeu mais uma grande oportunidade de aprender através das adversidades.

Ao professor Doutor Martin Homechin, pela orientação e estímulo, sem os quais eu não teria obtido êxito.

Ao Curso de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), pelos conhecimentos que me foram transmitidos.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro para aquisição de material para a realização deste trabalho.

Ao Doutor Ludwig Heinrich Pfenning, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), por auxiliar e orientar os ensaios para a identificação dos fungos e, por dividir comigo um pouco de seus conhecimentos.

Aos Doutores Débora Cristina Santiago, Edson Luiz Furtado, João Batista Vida e Écio de Pádua Fonseca, por terem aceitado participar como integrantes da banca de qualificação e de defesa e, pelas sugestões apresentadas para a melhoria deste trabalho.

Aos meus pais, Leonilda Moreno Martins e Celso de Matos Martins, por todos os ensinamentos que me deram e que carregarei por toda a minha vida, pelo amor, carinho, incentivo e ao tempo a mim dispensados.

Ao Antonio Augusto Lazarini Barboza, meu companheiro, amigo, confidente e conselheiro, que a todo momento me auxiliou na realização desta pesquisa, mesmo após calorosos debates, além de ter me acalmado várias vezes com amor e carinho, alegrando-me e fortalecendo-me nos momentos difíceis, tornando assim essa experiência mais suave.

Ao meu cunhado Luis Fernando Lazarini Barbosa, de cuja amizade me orgulho, pelas horas de distração e risadas nas noites e finais de semana intermináveis na UEL.

Ao doutor Cristiano Souza Lima, ao doutorando Anderson Resende Almeida, a mestre Mírian Salgado, a mestranda Sarah da Silva Costa Guimarães, a estudante Larissa Gomes da Silva e ao Edson Luís Resende (Edinho), que gentilmente me auxiliaram durante a identificação das espécies fúngicas.

Ao agrônomo José Adolpho Bonadio Furtado (Zau), e aos alunos de Agronomia (iniciação científica) Amália Ferreira Pintar e Alexandre Takahashi, que

colaboraram na execução deste trabalho e, pelo companheirismo e amizade.

A Priscila B. Andrade e Cátia Cristina Sanzovo, pela ajuda na correção dos Abstracts e, a Maria Aparecida de Matos, pela ajuda nas análises estatísticas.

A Ana Carla, pela hospitalidade e pelas longas horas de conversa durante minha permanência em Lavras.

A todos que contribuíram, de forma direta ou indireta, para a realização deste trabalho.

“Mesmo quando todos os especialistas concordam, podem muito bem estar redondamente enganados”.

Bertrand Arthur William Russel

MARTINS, Cristiane Moreno. **Fungos emboloradores e manchadores associados à madeira de *Pinus* spp.:** gêneros, alterações e controle biológico. 2007. 159f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

Fungos pigmentadores ou descoloradores do alburno de *Pinus* spp. apresentam hifas e/ou esporos pigmentados ou ainda hifas hialinas secretoras de melanina; colonizam árvores recém-abatidas e madeiras de corte, levando ao aparecimento de áreas de coloração variável, superficiais ou profundas, cuja importância está relacionada à depreciação da qualidade e do valor comercial da madeira. O tratamento das madeiras é tradicionalmente realizado através do controle químico, com a aplicação de preservativos e fungicidas. Recentemente novos métodos para controle de fungos emboloradores e manchadores têm sido propostos, como o controle biológico, as medidas de bioproteção e a associação destes com métodos físicos. Este trabalho teve como objetivo (1) verificar a ocorrência e identificar os principais gêneros de fungos emboloradores e manchadores associados à madeira de *Pinus* spp., provenientes de lotes do Paraná, Santa Catarina e São Paulo; (2) determinar o potencial de manchamento, *in vitro* e *in natura*, desses isolados; (3) selecionar microrganismos biocontroladores, como bactérias e actinomicetes; (4) avaliar a qualidade das madeiras colonizadas por pigmentadores e tratadas com biocontroladores, quanto as alterações na coloração. Através do levantamento bibliográfico, bem como durante os trabalhos de isolamento destes microrganismos, foi possível a elaboração de protocolo para o isolamento de fungos emboloradores e manchadores de madeira. Dos 165 isolados causadores de pigmentação na madeira de *Pinus* spp. obtidos, 87 foram caracterizados como emboloradores, onde estavam presentes os gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* e, 78 isolados como sendo manchadores, contemplando os gêneros *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Epicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Paecilomyces*. Testes laboratoriais, *in vitro* e *in natura*, revelaram que é possível utilizar bactérias e actinomicetos como biocontroladores destes fungos. Isolados A6, A8, A16, DA5P (*in vitro*) e Pf1, P4, P3 e Débora (*in natura*), demonstraram efeito antagônico sobre os fungos emboloradores; já os isolados DA5P, A6, Esc. 2 (*in vitro*) e DA5P e Pf1 (*in natura*), apresentam grande efeito antagônico sobre os fungos manchadores.

Palavras-chave: Antagonismo. Bioproteção. Isolamento. Pigmentação da madeira.

MARTINS, Cristiane Moreno. **Mold and stain fungi associated to *Pinus* spp. wood:** genera, alterations and biological control. 2007. 159p. Dissertation (Master's Degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

Mold and stain fungi of *Pinus* spp. sapwood have pigmented hypha and/or spores or have hyaline hypha melanin secretion; they colonize fresh wood, leaving some areas with changeable coloration, as a superficial or deep stain, whose importance is related to the depreciation of the quality and the commercial value of the wood. The treatment of wood, traditionally, is done through the chemical control, with applications of wood preservatives and fungicides. Recently new methods for control of these fungi have been considered, as the biological control, measured of bioprotection and association of these with physical methods. This work had as objective (1) to verify the occurrence and identify mold and stain fungi associates to pinus wood, proceeding from lots of Paraná, Santa Catarina and São Paulo; (2) to determine the potential of staining, *in vitro* and *in natura*, of these; (3) to select antagonist microorganisms, as bacteria and actinomycetes; (4) to evaluate the quality of wood colonized by sapstain fungi and treated with antagonist, about their alterations in the color. Through the bibliographical search, as during the works of isolation of this microorganisms, it was possible to elaborate a protocol for the isolation of mold and sapstain fungi of wood. 165 fungi causes pigmentation of pinus wood were isolated, being 87 characterized as mold, of genera *Trichoderma*, *Penicillium* and *Aspergillus*, and 78 isolated ones as sapstaining of the wood, of the genera *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Epicoccum*, *Pestalotiopsis* and *Paecilomyces*. Laboratorial experiments, *in vitro* and *in natura*, had still disclosed that it is possible to use *Actinomycetes* and bacteria as biocontrollers of these fungi. Isolates A6, A8, A16, DA5P (*in vitro*) and Pf1, P4, P3 and Débora (*in natura*), had demonstrated antagonistic effect on the mold; already the isolates DA5P, A6, Esc. 2 (*in vitro*) and DA5P and Pf1 (*in natura*), present great antagonistic effect on the sapstaining fungi.

Keywords: Antagonism. Bioprotection. Isolation. Wood pigmentation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 6.1** – Madeira de *Pinus* spp. serrada apresentando alterações na coloração natural: sintomas de emboloramento superficial (A) e manchamento do alburno (B).....83
- Figura 6.2** – Remoção dos corpos de prova de madeiras apresentando sintomas típicos de manchamento, para o isolamento do agente causal da pigmentação (A). Em detalhe, corpo de prova (B)84
- Figura 6.3** – Fragmento retirado de corpo de prova sintomático e plaqueado em meio de cultura BDA85
- Figura 6.4** – Crescimento fúngico sobre meio de cultura BDA e fragmento de madeira após incubação por 10 dias (A). Isolamento das colônias, em meio de cultura BDA (B)86
- Figura 6.5** – Confeção dos blocos de madeira de *Pinus* spp. (A). Assepsia dos blocos através da imersão em álcool 70% (B)88
- Figura 6.6** – Discos de micélio sendo inoculados nos orifícios dos blocos de madeira de *Pinus* spp. (A). Detalhe da inoculação dos discos de micélio (B)88
- Figura 6.7** – Madeiras de *Pinus* spp. apresentando sintomas de emboloramento (A e B) e manchamento (B e C), estocadas em serrarias do Estado do Paraná.....93
- Figura 6.8** – Fragmentos de corpos de prova plaqueados em meio de Martin (A), BDA (B), extrato de malte-ágar 3% (C), ágar-ágar acidificado (D) e extrato de tomate (E), incubados durante dez dias, para isolamento de fungos manchadores e emboloradores da madeira de *Pinus* spp.....96
- Figura 6.9** – Blocos de madeira de *Pinus* spp. inoculados com fungos, apresentando sintomas de emboloramento (A) e manchamento (B). Testemunha não inoculada (C).....97
- Figura 7.1** – Tora (A) e madeira serrada (B) de *Pinus* spp. apresentando alteração na coloração natural, sintoma típico de emboloramento superficial107

Figura 7.2 – Madeira serrada de <i>Pinus</i> spp. apresentando alteração na coloração natural, sintoma típico de manchamento	107
Figura 7.3 – Remoção dos corpos de prova de madeiras apresentando sintomas típicos de manchamento (A e B). Em detalhe, corpo de prova (C)	108
Figura 7.4 – Corpo de prova (A). Fragmento retirado de corpo de prova e plaqueado em meio de cultura extrato de malte-ágar 3% (B)	108
Figura 7.5 – Crescimento fúngico sobre meio de cultura extrato de malte-ágar 3% e fragmento de madeira de <i>Pinus</i> spp., após incubação por dez dias (A). Isolamento do fungo crescido sobre o meio de cultura (B) e fragmento de madeira (C) em meio BDA	109
Figura 7.6 – Confecção dos blocos de madeira de <i>Pinus</i> spp. (A e B). Assepsia dos blocos através da imersão em álcool 70% e secagem sobre papel filtro (C e D).....	110
Figura 7.7 – Preparação dos discos de micélio (A). Detalhe da inoculação dos discos de micélio em blocos de madeira de <i>Pinus</i> spp. (B e C)	110
Figura 7.8 – Blocos de madeira de <i>Pinus</i> spp. inoculados com fungo causador de emboloramento (A) e com fungo causador de manchamento (B) e, testemunha não inoculada (C).....	115
Figura 7.9 – Isolado do fungo <i>Trichoderma atroviride</i> , causador de emboloramento. Aspecto da colônia em meio BDA (A). Região em esporulação (B).....	116
Figura 7.10 – Isolado do fungo <i>Penicillium citrinum</i> , causador de emboloramento. Conidióforo e conídios (A). Exudação micelial (B). Aspecto da colônia em meio BDA (C)	116
Figura 7.11 – Isolado do fungo embolorador <i>Aspergillus niger</i>	117
Figura 7.12 – Isolado do fungo <i>Pestalotiopsis palustris</i> , causador de manchamento. Conídios e apêndices apicais (A). Aspecto da colônia em meio de cultura BDA (B). Exudato (C)	118

- Figura 7.13** – Isolado do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, causador de manchamento. Exudato liberado pelo picnídio (A). Aspecto da colônia em meio de cultura BDA (B). Células conidiogênicas e conídios (C)..... 118
- Figura 7.14** – Isolado do fungo manchador *Epicoccum purpurascens*. Conídios (A). Aspecto da colônia em meio de cultura BDA (B). Micélio aéreo e exudatos (C) 119
- Figura 7.15** – Isolado do fungo manchador *Fusarium oxysporum*. Aspecto da colônia em meio de cultura BDA (A). Micélio aéreo (B) 120
- Figura 7.16** – Isolado do fungo manchador *Paecilomyces lilacinus*. Conidióforos (A), colônia em meio BDA (B) e, micélio em detalhe (C) 120
- Figura 7.17** – Fungo embolorador *Penicillium citrinum*, alterando a coloração do meio de cultura BDA (A). Fungo embolorador *Penicillium lividum*, não alterando a coloração do meio de cultura BDA (B) .. 122
- Figura 7.18** – Fungos manchadores *Fusarium oxysporum*, alterando a coloração do meio de cultura BDA (A) e, *Fusarium solani*, causando um leve escurecimento no meio de cultura, segundo Escala de notas descrita por Yang (1999) 123
- Figura 7.19** – Fungo manchador *Epicoccum purpurascens* em placa de Petri contendo meio de cultura BDA (A) e, produzindo manchas amareladas, quando inoculado em blocos de madeira de *Pinus* spp. (B). Isolado de *Lasiodiplodia theobromae* CM M 07, quando cultivado em meio de cultura (C) e, quando inoculado na madeira de *Pinus* spp., tornam-na enegrecida (D)..... 128
- Figura 8.1** – Esquema para montagem do experimento de culturas pareadas (MARIANO, 2002). Fungo embolorador ou manchador versus bactéria/actinomicete antagonista (A). Testemunha (B) 134
- Figura 8.2** – Isolados de bactérias e actinomicetes antagonistas em meio BD (batata e dextrose) e Jensen líquido (A). Filtragem da solução bacteriana e de actinomicetes, com o auxílio de Kitassato e membrana de celulose (B e C)..... 136

- Figura 8.3** – Inoculação dos discos de micélio de fungo embolorador em blocos de madeira de *Pinus* spp. (A). Bloco inoculado e vedado com filme plástico de PVC..... 137
- Figura 8.4** – Capacidade de antagonismo, *in vitro*, do isolado bacteriano DA5P contra o fungo embolorador do gênero *Trichoderma* (A). Testemunha (B) 139
- Figura 8.5** – Fungo *Epicoccum purpurascens* sendo antagonizado pelo isolado de actinomicete A16 (A) e, não sofrendo antagonismo significativo pelo isolado bacteriano P3 (B). Fungo *Lasiodiplodia theobromae* sendo antagonizado pelo isolado A16 (C) e, não sofrendo antagonismo pelo isolado de bactéria B3 (D)..... 140
- Figura 8.6** – Blocos de madeira de *Pinus* spp. inoculados com o fungo *Trichoderma pseudokoningii*, causador de emboloramento (testemunha) (A). Blocos tratados com exudatos bacterianos dos isolados de *Pseudomonas* sp. P4 (B) e *Pseudomonas fluorescens* Pf1 (C) 142
- Figura 8.7** – Blocos de madeira de *Pinus* spp. inoculados com o fungo manchador *Lasiodiplodia theobromae* e não tratado com exudatos bacterianos e de actinomicetes (testemunha) (A) e, tratado com exudato bacteriano do isolado DA5P (B) 144
- Figura 8.8** – Bloco de madeira de *Pinus* spp. inoculados com o fungo manchador *Fusarium oxysporum* e tratado com o exudato obtido da bactéria P4 (A) e, testemunha não tratada (B) 146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies de <i>Pinus</i> spp. adaptadas aos climas equatorial, tropical e temperado	26
Tabela 2 – Escala de Horsfall-Barrett, para percentual de câmbio colonizado por fungos emboloradores e manchadores.....	43
Tabela 3 – Escala de Manchamento proposta por Benko e Highley (1990c).....	43
Tabela 6.1 – Escala de notas descrita por Yang (1999)	90
Tabela 6.2 – Escala de Horsfall-Barrett, para percentual de câmbio colonizado por fungos pigmentadores da madeira.....	90
Tabela 6.3 – Escala de notas descrita por Henz e Cardoso (2005).....	90
Tabela 6.4 – Escala de Manchamento proposta por Benko e Highley (1990c).....	91
Tabela 6.5 – Escala de notas proposta por Held et al. (2003) com modificações, para avaliação da coloração do crescimento micelial e da madeira	91
Tabela 6.6 – Número de isolados crescidos em meio BDA a partir de quatro diferentes metodologias de assepsia dos corpos de prova de <i>Pinus</i> spp.	94
Tabela 6.7 – Número de isolados de fungos emboloradores e manchadores recuperados de madeira de <i>Pinus</i> spp. em cinco diferentes meios de cultura.....	95
Tabela 6.8 – Avaliação de fungos emboloradores e manchadores da madeira de <i>Pinus</i> spp., segundo escalas de notas existentes para determinação do grau de pigmentação de placas e madeiras, superfície colonizada e da coloração do micélio e da mancha induzida na madeira	99
Tabela 7.1 – Local de origem das amostras de madeira de <i>Pinus</i> spp. com sintomas característicos de emboloramento e manchamento	107
Tabela 7.2 – Escala de notas descrita por Yang (1999)	112
Tabela 7.3 – Escala de notas descrita por Henz e Cardoso (2005).....	113
Tabela 7.4 – Escala de Manchamento proposta por Benko e Highley (1990c).....	113

Tabela 7.5 – Escala de notas proposta por Held et al. (2003) com modificações, para avaliação da coloração do crescimento micelial e da madeira	114
Tabela 7.6 – Avaliação dos isolados de fungos emboloradores, segundo Escala de notas descrita por Yang (1999) para manchamento em meio de cultura.....	121
Tabela 7.7 – Avaliação dos isolados de fungos manchadores, segundo Escala de notas descrita por Yang (1999) para manchamento em meio de cultura.....	123
Tabela 7.8 – Avaliação do grau de emboloramento de blocos de madeira de <i>Pinus</i> spp. por isolados, segundo Escala de notas descrita por Yang (1999), Henz e Cardoso (2005) e Benko e Highley (1990).....	125
Tabela 7.9 – Avaliação do grau de emboloramento de blocos de madeira de <i>Pinus</i> spp. por isolados, segundo Escala de notas descrita por Held et al. (2003)	125
Tabela 7.10 – Avaliação do grau de manchamento de blocos de madeira de <i>Pinus</i> spp. por isolados, segundo Escala de notas descrita por Yang (1999), Henz e Cardoso (2005) e Benko e Highley (1990).....	127
Tabela 7.11 – Avaliação do grau de manchamento de blocos de madeira de <i>Pinus</i> spp. por isolados, segundo Escala de notas descrita por Held et al. (2003)	128
Tabela 8.1 – Isolados da Coleção de Microrganismos da Fitopatologia-Agronomia (UEL), testados quanto ao efeito antagonista contra fungos emboloradores e manchadores da madeira de <i>Pinus</i> spp.	133
Tabela 8.2 – Isolados de actinomicetes e bactérias obtidos a partir de amostras de madeira de <i>Pinus</i> spp. assintomática e, testados quanto ao efeito antagonista fungos emboloradores e manchadores	138
Tabela 8.3 – Inibição do crescimento vegetativo (%), provocada por isolados bacterianos e de actinomicetes sobre fungos emboloradores da madeira de <i>Pinus</i> spp., <i>in vitro</i>	139

Tabela 8.4 – Inibição do crescimento vegetativo (%), provocada por isolados bacterianos e de actinomicetes sobre fungos manchadores da madeira de <i>Pinus</i> spp., <i>in vitro</i>	141
Tabela 8.5 – Avaliação da capacidade de antagonismo de isolados bacterianos e de actinomicetes sobre a ação de fungos emboloradores inoculados em madeira de <i>Pinus</i> spp., segundo Escala de Manchamento de Benko e Highley (1990c).....	143
Tabela 8.6 – Avaliação da capacidade de antagonismo de isolados bacterianos e de actinomicetes sobre a ação de fungos manchadores inoculados em madeira de <i>Pinus</i> spp., segundo Escala de Manchamento de Benko e Highley (1990c).....	145

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	23
3 JUSTIFICATIVAS	24
4 REVISÃO DE LITERATURA	25
4.1 A CULTURA DE <i>Pinus</i> spp. NO BRASIL	25
4.1.1 Introdução da Pinocultura.....	25
4.1.2 Atual Situação da Pinocultura Brasileira.....	27
4.1.3 Comercialização da Madeira de <i>Pinus</i> e Abertura Comercial	28
4.2 DEGRADAÇÃO DA MADEIRA DE <i>Pinus</i> spp.....	31
4.3 MICRORGANISMOS PIGMENTADORES DA MADEIRA DE <i>Pinus</i> spp.....	33
4.3.1 Fungos Emboloradores	35
4.3.2 Fungos Manchadores.....	37
4.3.3 Fungos Azuladores	38
4.3.4 Mecanismo de Ação e Alterações Decorrentes da Infecção por Fungos Emboloradores/Manchadores.....	39
4.3.5 Manchamento da Madeira de <i>Pinus</i> spp. Recém Serrada	40
4.3.5.1 Manchamento superficial.....	41
4.3.5.2 Manchamento interno.....	41
4.4 MENSURAÇÃO DA INFECÇÃO E PIGMENTAÇÃO DO LENHO	42
4.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE MANCHADORES DA MADEIRA E INSETOS- PRAGA.....	44
4.6 TRATAMENTO DA MADEIRA DE <i>Pinus</i> spp.	46
4.6.1 Prevenção do Aparecimento de Manchas Através da Manipulação da Madeira e de Condições Ambientais	47
4.6.2 Metodologias Empregadas no Tratamento da Madeira.....	47
4.7 CONTROLE BIOLÓGICO DOS FUNGOS EMBOLORADORES E MANCHADORES	49
4.7.1 Controle Biológico Utilizando Cepas Fúngicas Albinas	51
4.7.2 Controle Biológico Utilizando Cepas Bacterianas	55
4.7.3 Indução de Resistência	56
4.8 OCORRÊNCIA DE EMBOLORADORES E MANCHADORES	59

4.8.1 Relatos em Coníferas e Eucalipto	59
4.8.2 Relatos em <i>Pinus</i> spp.....	61

5 ARTIGO A – FUNGOS EMBOLORADORES E MANCHADORES DA MADEIRA DE *Pinus* spp. E SEU CONTROLE – UMA ATUALIZAÇÃO.....

5.1 RESUMO	66
5.2 ABSTRACT	66
5.3 INTRODUÇÃO	67
5.4 FUNGOS EMBOLORADORES E MANCHADORES DA MADEIRA DE <i>pinus</i> spp.	68
5.4.1 Relatos Mundiais de Pigmentadores da Madeira de <i>Pinus</i> spp.	69
5.4.1.1 Fungos emboloradores.....	70
5.4.1.2 Fungos manchadores.....	71
5.4.1.3 Fungos azuladores.....	72
5.4.2 Mecanismo de Ação dos Fungos Emboloradores e Manchadores	73
5.4.3 Associação entre Fungos Manchadores e Insetos-praga.....	74
5.4.4 Mensuração da Infecção por Emboloradores e Manchadores	74
5.4.5 Tratamento da Madeira	75
5.4.6 Controle Biológico dos Fungos Manchadores da Madeira de <i>Pinus</i> spp	75
5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79

6 ARTIGO B – COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS E ELABORAÇÃO DE PROTOCOLO PARA O ISOLAMENTO DE FUNGOS EMBOLORADORES E MANCHADORES DA MADEIRA DE *Pinus* spp.

6.1 RESUMO	80
6.2 ABSTRACT	81
6.3 INTRODUÇÃO	81
6.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	83
6.4.1 Levantamento de Madeira de <i>Pinus</i> spp. Apresentando Manchas e/ou Emboloramento	83
6.4.2 Definição da Metodologia Empregada no Isolamento dos Fungos Emboloradores e Manchadores da Madeira de <i>Pinus</i> spp.	84
6.4.2.1 Método de assepsia	84

6.4.2.2 Meios de cultura	86
6.4.2.3 Inoculação em blocos de <i>Pinus</i> spp. e isolamento dos agentes causais	87
6.4.3 Comparação da Eficiência e da Praticidade entre as Escalas de Notas Propostas para a Avaliação do Emboloramento e Manchamento	89
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
6.5.1 Levantamento de Madeira de <i>Pinus</i> spp. Apresentando Manchas e/ou Emboloramento	92
6.5.2 Definição da Metodologia a Ser Empregada no Isolamento dos Fungos Emboloradores e Manchadores da Madeira de <i>Pinus</i> spp.	93
6.5.2.1 Método de assepsia	93
6.5.2.2 Meios de cultura	94
6.5.3 Comparação da Eficiência e da Praticidade de Escalas de Notas para a Avaliação do Emboloramento e Manchamento	97
6.5.4 Protocolo para Isolamento de Fungos Emboloradores e Manchadores da Madeira de <i>Pinus</i> spp.	99
6.5.4.1 Objetivos	99
6.5.4.2 Material necessário	100
6.5.4.3 Procedimento	101
6.6 CONCLUSÕES	103

7 ARTIGO C – OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS EMBOLORADORES E MANCHADORES DA MADEIRA DE <i>Pinus</i> spp. NOS ESTADOS DO PARANÁ, SANTA CATARINA E SÃO PAULO	104
7.1 RESUMO	104
7.2 ABSTRACT	104
7.3 INTRODUÇÃO	105
7.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	106
7.4.1 Levantamento de Madeira de <i>Pinus</i> spp. Apresentando Pigmentação	106
7.4.2 Isolamento dos Fungos Pigmentadores da Madeira de <i>Pinus</i> spp.....	108
7.4.3 Identificação dos Isolados Causadores de Emboloramento e Manchamento	111
7.4.4 Teste da Capacidade de Pigmentação <i>In Vitro</i> e <i>In Natura</i>	112

7.4.4.1 <i>In vitro</i> : capacidade do fungo emboloradores e manchadores em induzir pigmentação no meio de cultura	112
7.4.4.2 <i>In natura</i> : capacidade do fungo emboloradores e manchadores em induzir pigmentação em blocos de madeira de <i>Pinus</i> spp.....	112
7.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
7.5.1 Isolamento dos Fungos Pigmentadores da Madeira de <i>Pinus</i> spp.....	114
7.5.2 Identificação dos Isolados Causadores de Emboloramento e Manchamento	115
7.5.2.1 Fungos emboloradores.....	115
7.5.2.2 Fungos manchadores.....	117
7.5.3 Teste da Capacidade de Pigmentação <i>In Vitro</i>	121
7.5.3.1 Capacidade de fungos emboloradores em induzir pigmentação no meio de cultura	121
7.5.3.2 Capacidade de fungos manchadores em induzir pigmentação no meio de cultura	122
7.5.4 Teste da Capacidade de Pigmentação <i>In Natura</i>	124
7.5.4.1 Capacidade de fungos emboloradores em induzir pigmentação em blocos de madeira de <i>Pinus</i> spp.....	124
7.5.4.2 Capacidade de fungos manchadores em induzir pigmentação em blocos de madeira de <i>Pinus</i> spp.....	126
7.6 CONCLUSÕES	129
8 ARTIGO D – CONTROLE BIOLÓGICO DE FUNGOS EMBOLORADORES E MANCHADORES DA MADEIRA DE <i>Pinus</i> spp. <i>In Vitro</i> E <i>In Natura</i>	130
8.1 RESUMO	130
8.2 ABSTRACT	130
8.3 INTRODUÇÃO	131
8.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	132
8.4.1 Isolamento de Fungos Pigmentadores da Madeira de <i>Pinus</i> spp.	132
8.4.2 Isolamento e Seleção de Possíveis Biocontroladores de Fungos Emboloradores e Manchadores.....	133
8.4.3 Teste de Antagonismo a Fungos Emboloradores e Manchadores <i>In Vitro</i>	134

8.4.4 Biocontrole de Fungos Emboloradores e Manchadores em Blocos de <i>Pinus</i> spp.	135
8.4.4.1 Obtenção de solução de exudatos produzida por antagonistas	135
8.4.4.2 Teste de antagonismo a fungos pigmentadores <i>in natura</i>	136
8.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	138
8.5.1 Isolamento e Seleção de Possíveis Biocontroladores de Fungos Pigmentadores da Madeira de <i>Pinus</i> spp.	138
8.5.2 Teste de Antagonismo <i>In Vitro</i>	138
8.5.2.1 Fungos emboloradores	138
8.5.2.2 Fungos manchadores	140
8.5.3 Biocontrole em Blocos de <i>Pinus</i> spp.	142
8.5.3.1 Fungos Emboloradores	142
8.5.3.2 Fungos Manchadores	144
8.6 CONCLUSÕES	147
9 CONCLUSÕES GERAIS	148
REFERÊNCIAS	149
APÊNDICES	173
APÊNDICE A – Relação dos Isolados de Fungos Emboloradores	174
APÊNDICE B – Relação dos Isolados de Fungos Manchadores	177
ANEXOS	188
ANEXO A – Meios de Cultura Utilizados nos Experimentos	181

1 INTRODUÇÃO

O setor florestal apresenta grande importância para o desenvolvimento do Brasil, rendendo anualmente US\$ 36 bilhões, valor equivalente a 4,5% do PIB, sendo que destes US\$ 17,5 bilhões são provenientes do setor de florestas plantadas e US\$ 6,8 bilhões da pinocultura. No ano de 2005, esse setor foi responsável pela exportação de US\$ 7,2 bilhões (6,1% das exportações nacionais), sendo o terceiro complexo em exportado, superado apenas pelos complexos soja e carnes.

O setor de florestas plantadas se destaca no cenário sócio-econômico do país, pois além da agregação de valor, responsável pela geração de renda, contribui para a geração de tributos, divisas e empregos e, por estar integrado a várias cadeias produtivas, possui efeito multiplicador no panorama econômico nacional.

Atualmente o Brasil ocupa o sétimo lugar entre os países com maiores plantios florestais, possuindo 2,7% da área plantada mundialmente, ou uma área total de 5,2 milhões de hectares, representados principalmente por plantios de pinus e eucalipto, concentrada principalmente nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo, Minas Gerais e Bahia.

O *Pinus* spp. por possuir madeira leve, apresentar crescimento rápido e pode ser cultivado em grandes densidades populacionais, possui destaque comercial na produção de madeira, juntamente com o eucalipto. Dados disponíveis indicam que, somente na região sul, existem 1.060.000 ha. de plantios de pinus.

Dentre as barreiras limitantes para o desenvolvimento do setor florestal encontram-se a falta de recursos e de avanços tecnológicos, diante das novas oportunidades de mercado; de investimento, para a introdução de equipamentos e tecnologia avançada; além da necessidade da reestruturação do setor, através de parcerias com setores de pesquisa científica e tecnológica e do incremento da oferta de matéria-prima.

Grande parte da área coberta por *Pinus* spp. está vinculada a empresas verticalizadas, que necessitam da matéria-prima em suas atividades industriais. Este grupo de empresas inclui, basicamente, indústrias de celulose e

papel, de chapas e partículas de madeira aglomerada, serrarias, laminadoras e indústrias de processamento de resina. Infelizmente, essas desenvolvem e praticam regimes de desgaste que nem sempre são concebidos de forma adequada ou aplicados de maneira conveniente, levando ao aparecimento de problemas associados à madeira de corte e seus produtos, devido à ação de agentes degradadores ou modificadores de suas características.

Entre estes, encontram-se os fungos emboloradores e manchadores da madeira de *Pinus* spp., que geralmente são os primeiros a colonizar árvores recém-abatidas, devido a grande quantidade de substâncias de reserva e à elevada umidade. O alburno atacado por esses fungos apresenta áreas de coloração variável, geralmente de azul a cinza escuro, que podem ser observadas externamente ou em cortes transversais. Embora possam ser superficiais ou profundas, essas manchas depreciam a qualidade e o valor comercial da madeira.

Tratamentos tradicionais têm sido empregados para evitar a infecção da madeira por estes agentes, como a aplicação de produtos químicos à base de sais de sódio e de fenóis clorados, de fungicidas e outros métodos que envolvem a redução da umidade da madeira. Entretanto, recentemente surgiu a preocupação quanto à toxicidade destes produtos químicos, fato que levou ao estudo de novos métodos para controle dos fungos manchadores, principalmente aqueles envolvendo medidas de bioproteção, emprego de microrganismos antagônicos e interação desses com métodos físicos.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Verificar a ocorrência e promover a identificação dos principais gêneros de fungos emboloradores e manchadores associados à madeira de *Pinus* spp. proveniente dos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo;
- Determinar potenciais agentes biocontroladores (bactérias e actinomicetos) e, averiguar o potencial do uso de seus extratos e metabólitos no controle de fungos emboloradores e manchadores da madeira de *Pinus* spp., *in vitro* e *in natura*.

3 JUSTIFICATIVA

Durante o período de estocagem e secagem, toras e peças de madeira serrada de *Pinus* spp. comumente sofrem a ação de microrganismos biodeterioradores, principalmente por essas se encontrarem sob condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento destes, por tempo prolongado.

Geralmente os microrganismos pioneiros na colonização destas madeiras são os fungos emboloradores e manchadores, que além de se desenvolver na superfície da madeira, podem penetrar em camadas mais profundas (alburno), promovendo o manchamento interno e a deterioração da madeira de pinus. Esses microrganismos pigmentadores acarretam em perdas econômicas significantes para o setor madeireiro e para a economia nacional, uma vez que as manchas diminuem a qualidade visual e, conseqüentemente, o valor comercial da madeira. Assim sendo, fica clara a importância do estabelecimento de metodologias para a prevenção do estabelecimento desses fungos na madeira de *Pinus* spp.

As formas mais adotadas, para a prevenção e controle destes agentes, são os métodos de redução da umidade natural da madeira e os tratamentos químicos, como aplicação de preservativos e fungicidas. Porém, esses apresentam custo elevado, são inviáveis para o tratamento de peças grandes e de grandes quantidades, além de serem altamente tóxicos e biocidas.

Atualmente tem sido sugerido, como alternativa a estes métodos, o tratamento da madeira com microrganismos biocontroladores (fungos e bactérias). Embora inúmeras pesquisas em torno deste assunto tenham sido realizadas nos últimos anos, poucos produtos comerciais, formulados com esses agentes, estão disponíveis.

O controle biológico dos pigmentadores da madeira de *Pinus* spp., quando aplicado nas fases anteriores e iniciais do desenvolvimento de emboloradores e manchadores, pode levar ao estacionamento do desenvolvimento do agente causal e, conseqüentemente, da lesão; além de apresentar eficiência idêntica a outros métodos de tratamento, como os fungicidas.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 A CULTURA DE *Pinus* spp. NO BRASIL

O gênero *Pinus* L. pertence ao grupo das Gimnospermas, divisão Pinophyta e família Pinaceae, contando com aproximadamente 150 espécies, sendo a maioria originária do Hemisfério Norte (RICHARDSON, 1998; FARJON, 1984). Sua introdução, no Brasil, ocorreu principalmente em virtude da necessidade da produção de madeira para o abastecimento industrial, bem como de alternativa na falta da madeira do Pinheiro do Paraná (*Araucaria angustifolia*), considerada uma das melhores madeiras do mundo e que foi intensiva e abusivamente explorada (KRONKA et al., 2005).

A adaptação do pinus ao clima e aos solos ligeiramente ácidos, que compõem grande parte dos solos brasileiros, juntamente com a adoção de práticas silviculturais adequadas, permitiu a implantação deste gênero em extensas áreas, tornando-o importante fonte de matéria prima para a indústria madeireira (KRONKA et al., 2005).

4.1.1 Introdução da Pinocultura

A introdução do pinus, no Brasil, ocorreu primeiramente para fins ornamentais e de reflorestamento e, posteriormente, para fins silviculturais (PEREIRA, 1987). Os primeiros resultados de sua introdução foram apresentados no livro “Notas sobre as plantas exóticas introduzidas no Estado de São Paulo”, em 1906, pelo diretor do Instituto Florestal de São Paulo, Dr. A. Lofgren; neste primórdio da pinocultura, foram introduzidas dezesseis espécies de pinus (KRONKA et al., 2005).

Os primeiros estudos, em condições brasileiras, foram realizados a partir de 1936, pelo Instituto Florestal de São Paulo, com a introdução de sementes de *P. elliotii* var. *elliotti* e *P. taeda* (KRONKA et al., 2005). A partir de 1948, iniciou-

se um plano de incentivo ao reflorestamento, com distribuição de mudas de *Pinus radiata*; porém, esta demonstrou ser incapaz de se desenvolver sob as condições ambientais brasileiras (PIMENTEL, 2000).

Somente a partir de 1955, extensas áreas das Estações Experimentais do Instituto Florestal foram implantadas espécies de *Pinus* spp. mais adaptadas aos climas equatorial, tropical e temperado, como *P. caribaea* var. *caribaea*, *P. caribaea* var. *hondurensis*, *P. caribaea* var. *bahamensis*, *P. kesiya*, *P. patula*, *P. oocarpa*, *P. tecunumanii*, *P. strobus* e *P. maximinoi* (Tabela 1) (MARTO et al., 2006; KRONKA et al., 2005). E, a partir da década de 1960, surgiram os primeiros pomares de sementes clonais de pinus no Brasil, com o objetivo de atender a crescente demanda por sementes melhoradas quantitativa e qualitativamente (ABRAF, 2006); este fator, aliado ao plantio da espécie mais adequada para cada região ecológica, possibilitou a expansão da pinocultura para todo o território brasileiro (SHIMIZU, 2005).

Tabela 1 – Espécies de *Pinus* spp. adaptadas aos climas equatorial, tropical e temperado

Clima		
Equatorial	Tropical	Temperado
		<i>P. chiapensis</i>
		<i>P. echinata</i>
		<i>P. elliotii</i>
		<i>P. greggi</i>
		<i>P. hartwegii</i>
		<i>P. leiophylla</i>
	<i>P. kesiya</i>	<i>P. merkusii</i>
	<i>P. maximinoi</i>	<i>P. montezumae</i>
<i>P. caribaea</i> var. <i>bahamensis</i>	<i>P. oocarpa</i>	<i>P. palustris</i>
<i>P. caribaea</i> var. <i>caribaea</i>	<i>P. patula</i>	<i>P. pinea</i>
<i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i>	<i>P. pseudostrobus</i>	<i>P. pinester</i>
	<i>P. tecunumanii</i>	<i>P. ponderosa</i>
	<i>P. wallichiana</i>	<i>P. radiata</i>
		<i>P. roxburghii</i>
		<i>P. strobus</i>
		<i>P. sylverstris</i>
		<i>P. taeda</i>
		<i>P. virginiana</i>
		<i>P. wallichiana</i>

As implantações de florestas de pinus tiveram início em 1958, em Agudos-SP, com a introdução das espécies *P. elliotii* var. *elliotii*, *P. taeda*, *P. caribaea* var. *caribaea*, *P. caribaea* var. *bahamensis*, *P. kesiya*, *P. patula*, *P. occidentalis*, *P. maximinoi*, *P. strobus* var. *chiapensis*, *P. tenuifolia*, *P. montesumae*,

P. michoacana, *P. greguii* e *P. pinaster*, pelo Grupo Freudenberg (KRONKA et al., 2005).

A partir de então, ocorreu uma extraordinária ampliação das áreas plantadas com *Pinus* spp., cujo principais agentes motivadores foram a criação do Novo Código Florestal Brasileiro, em 1965, do Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF), pelo Decreto-Lei n° 289 em 1966, e do Programa de Incentivos Fiscais para o Reflorestamento, instituído pela Lei 5.106, também em 1966 (ALVES, 2006).

Durante o período de vigência dos incentivos, que se mantiveram até 1988, muitos empreendimentos se estabeleceram na região central de São Paulo, principalmente nos cerrados e campos, onde foram criados os Distritos Florestais. Em virtude disto, São Paulo tornou-se o pólo florestal mais importante de *Pinus* spp., na época, e contribuiu para o desenvolvimento de núcleos florestais no Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (KRONKA et al., 2005).

Na década de 1970, o plantio de pinus passou a ser direcionado somente para as espécies *Pinus elliottii* e *Pinus taeda*, provenientes dos Estados Unidos, que se adaptaram melhor às condições edafoclimáticas e atmosféricas do país (principalmente às regiões Sul e Sudeste) e, cujo plantio seria mais produtivo e rentável (ABRAF, 2006; SHIMIZU, 2005).

Embora o programa de incentivos fiscais para o plantio de pinus visasse suprir a oferta por matéria prima de árvores nativas e reduzir a dependência nacional de importação de celulose e resina (PEREIRA, 1987), este, nas décadas de 1980 e 90, acarretou na substituição da floresta de Araucária, que se tornou escassa na região sul do país (ABRAF, 2006).

4.1.2 Atual Situação da Pinocultura Brasileira

Por ser uma madeira leve, de crescimento rápido e que pode ser cultivada em grande densidade populacional, o pinus apresenta destaque comercial na produção de madeira, juntamente com o eucalipto (RICHARDSON, 1998; FARJON, 1984). Em virtude disto, a adoção de medidas visando a sua preservação é altamente necessária, garantindo assim uma maior durabilidade e economia na

utilização desse recurso (FURTADO, 2000).

O setor florestal brasileiro desenvolveu-se principalmente a partir da década de 1960, com a Lei nº. 5.106 de 2 de setembro de 1966, que viabilizou incentivos para o plantio florestal (ABRAF, 2006). Recentemente, desde o ano safra 2002/2003, o Governo Federal ofereceu dois programas de crédito rural, denominados PROPFLORA e PRONAF-Florestal, para estimular o reflorestamento; dados consolidados do resultado destes programas ainda não foram divulgados (BACHA; BARROS, 2004).

O Programa de Plantio Comercial e Recuperação de Florestas (PROPFLORA) têm como objetivos a implantação de florestas destinadas ao uso industrial, à recomposição e manutenção de áreas de preservação e da reserva florestal legal, além da implantação de projetos silvipastoris e agroflorestais, reduzindo assim o déficit existente no plantio de árvores utilizadas como matéria-prima pelas indústrias, diversificando as atividades produtivas no meio rural, gerando emprego e renda de forma descentralizada e, impulsionando o desenvolvimento tecnológico e comercial do setor (BNDES, 2007).

Embora o PRONAF-Florestal possua basicamente os mesmos objetivos do PROPFLORA, como estimular o plantio de espécies florestais, implementação de projetos de manejo sustentável, reflorestamento e sistemas agroflorestais, preservando assim as florestas nacionais e recuperando áreas degradadas, até o ano agrícola de 2002/2003 este programa estava restrito a áreas prioritárias para a conservação da Mata Atlântica. Somente a partir do ano agrícola 2003/2004 os créditos passaram a ser liberados para todos os municípios do país (PRONAF, 2007).

Segundo dados de 2005, o Brasil ocupa o sétimo lugar entre os países com maiores plantios florestais, possuindo 2,7% da área plantada mundialmente (FAO, 2006), sendo destes 4,9 milhões para produção de *Pinus* spp. e *Eucaliptus* spp. (ALVES et al., 2006). Dos US\$ 17,5 bilhões gerados pelo setor de florestas plantadas, aproximadamente US\$ 6,8 são provenientes da pinocultura (39%) (OLIVEIRA, 2005).

No país, o plantio de *Pinus* spp. concentra-se nos Estados do Paraná (37%), Santa Catarina (29%), Rio Grande do Sul (10%), São Paulo (10%) e Minas Gerais (10%), ocupando uma área estimada em 1.834.569 hectares; deste total, 35% estão localizados na região Sul (ABRAF, 2006).

Aproximadamente 34% (51,4 milhões m³) do total consumido de madeira, em toras, oriundas de florestas plantadas, para fins industriais, são compostos por madeira de *Pinus* spp. Quanto ao destino final desta madeira, 30% são consumidos pela indústria de celulose e papel, sendo este o principal segmento consumidor da madeira; em segundo lugar encontra-se a siderurgia (21%), seguida pela indústria de madeira serrada (19%) e pelas indústrias de compensado e de painéis reconstituídos (cerca de 10 %) (ABRAF, 2006).

Estimativas demonstram ainda que em 2005 a cadeia produtiva do setor de florestas plantadas (primário e transformação industrial), que reúne cerca de 30 mil empresas, foi responsável por cerca de 4,5 milhões de empregos, sendo deste 1 (um) milhão diretos e 3,5 milhões indiretos; esse total representa 11,5% da população economicamente ativa (PEA) do Brasil (LIMA, 2006; ABRAF, 2006).

Em 2005, o setor florestal exportou US\$ 7,4 bilhões, correspondente a 6,3% do total exportado pelo país; segundo a análise da Balança Comercial do Agronegócio, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), as exportações do grupo de produtos florestais, como celulose, papel, madeira e afins, corresponderam ao terceiro complexo em total exportado, tendo sido superado apenas pelos complexos soja e carnes. O setor de florestas plantadas, representado principalmente por pinus e eucaliptos, foi responsável por exportar um total de US\$ 4,7 bilhões, perfazendo 63,5% do total exportado pelo setor florestal (ABRAF, 2006).

De modo geral, o setor florestal brasileiro contribui com, aproximadamente, 4,5% na formação do PIB Nacional e com 6,1% nas exportações; gera 1,6 milhões de empregos diretos e 5,6 milhões de empregos indiretos e, possui receita anual de US\$ 36 bilhões (ABRAF, 2006). Contribui, ainda, na conservação de uma enorme diversidade biológica (2,6 milhões de hectares de florestas nativas) (CARVALHO et al., 2006).

4.1.3 Comercialização da Madeira de Pinus e Abertura Comercial

Embora existam cerca de dois milhões de hectares reflorestados com *Pinus* spp., grande parte encontra-se em alta densidade populacional e sob

regime de manejo inadequado, além de serem formados por um número restrito de espécies; estes fatores favorecem o aparecimento de surtos de doenças e pragas (IEDE et al., 2000).

Com a abertura comercial, o aumento no volume das importações e exportações mundiais e, o aumento do turismo internacional, ocorridos na década de 1990, a possibilidade da introdução de pragas exóticas no Brasil aumentou de forma alarmante (IEDE et al., 2000). O mesmo ocorreu em muitos países da América do Norte, América Latina, Europa e Ásia e, por esta razão, foi necessária a revisão das Normas Internacionais de Medidas Fitossanitárias (NIMF) e a intensificação da fiscalização sobre os produtos importados (GRIFFIN, 2000).

Entre os artigos utilizados no comércio internacional de diversas mercadorias encontram-se os suportes e embalagens de madeira, tais como estrados, tonéis, "pallets", cintas, caixas, tábuas, estojos e carretéis. Como estes podem estar associados a pragas, a NIMF n°. 15 da FAO preconiza o tratamento destes materiais no local de origem (LOPES; OLIVEIRA, 2002; FAO, 2005).

Do mesmo modo, o Ministério da Agricultura, através da Secretaria de Defesa Agropecuária e com base na Convenção Internacional de Proteção a Vegetais, instituiu procedimentos para a certificação fitossanitária de origem e transporte de produtos vegetais que possam causar a dispersão de pragas quarentenárias e não quarentenárias regulamentadas (RITTER, 2000).

Para o transporte de toras e de madeira serrada de pinus no Estado do Paraná, devem ser observados alguns procedimentos e normas instituídas pela Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná (SEAB), como a detenção do Certificado Fitossanitário de Origem (CFO) e do Certificado Fitossanitário de Origem Consolidado (CFOC), que têm por objetivo evitar a dispersão de pragas para áreas indenes, visando assim a manutenção do patrimônio fitossanitário nacional e a preservação da competitividade da agricultura, além de garantir sua credibilidade junto ao comércio nacional e internacional (RITTER, 2000).

Para a obtenção da CFOC é necessário que as unidades centralizadoras (serrarias) que pretendam comercializar produtos certificados, promovam seu cadastro junto a SEAB e, que os lotes de madeira serrada tenham a procedência da matéria prima, no caso, plantios ou florestas de pinus já certificados com CFO (RITTER, 2000).

Assim, grande importância deve ser dada às discussões sobre as doenças em *Pinus* spp. ainda não registradas no Brasil, pois essa atividade preconiza impedir a entrada de patógenos quarentenários, que possam comprometer a silvicultura nacional. Para isso, deve ser ressaltada a importância do importador de pinus em determinar a origem e obter a certificação da madeira a ser importada, e do exportador, que necessita de maiores informações de como tratar a madeira a ser enviada ao exterior, sem que cause impacto ambiental e comercial (AUER, 2000).

4.2 DEGRADAÇÃO DA MADEIRA DE *Pinus* spp.

Parte da produção total de madeira de pinus é perdida pelo processo de biodegradação (LIESE, 1975), sendo esse favorecido por condições de manejo que proporcionam condições ótimas de temperatura e umidade para o desenvolvimento de agentes biodegradadores (APETORGBOR et al., 2004).

A madeira, por ser anatômica e quimicamente complexa, pode sustentar uma vasta diversidade de microrganismos, como fungos e bactérias (DIX e WEBSTER, 1995). Por essa razão, diversas indústrias de processamento de madeira estão atentas à ação dos agentes biodeterioradores, que acarretam em perdas econômicas sérias à indústria madeireira (APETORGBOR et al., 2004).

Recentemente, devido à alta demanda internacional por madeira tropical, a colheita da madeira vem sendo realizada durante todo o ano, inclusive nos meses úmidos, ao invés de ocorrer somente nos meses secos. A elevada incidência de biodeterioradores também é exacerbada pelos métodos de extração utilizados por empreiteiros, onde, durante a extração, as madeiras cortadas são levadas para um pátio de armazenamento, onde podem permanecer por mais de um mês, deixando assim as toras expostas às condições climáticas adversas e à ação dos agentes biológicos (APETORGBOR et al., 2004).

Sabe-se que a retirada das toras dos campos de armazenamento deve ser o mais rápido possível sendo que, na maioria dos casos, estas não devem ultrapassar 48 horas armazenadas, antes de serem despachadas às serrarias, ao porto, ou a outro destino final. Entretanto, na maioria dos casos, a retirada das toras

do interior da floresta nem sempre é tão rápida como deveria ser, predispondo a madeira ao ataque de diversos agentes biológicos (IDE et al., 2000).

Logo após a derrubada, a madeira já está suscetível à colonização por fungos. A infecção frequentemente ocorre poucos dias após o corte e, pode continuar a progredir na madeira, mesmo que esta seja processada em produtos tratados com preservativos, tais como postes, lastros de estrada de ferro e madeiras de construção. A proteção de madeiras contra fungos não deve ser negligenciada, uma vez que a qualidade e a durabilidade dos produtos finais dependem de bons cuidados com as madeiras, principalmente durante as retiradas fora de época (BENKO; HIGHLEY, 1990a).

Os patógenos que atacam a madeira de pinus podem ser divididos entre aquele que após a infecção levam à morte da árvore e, os que afetam o valor comercial da madeira, podendo torná-la inutilizável. Dentre os microrganismos depreciadores da qualidade da madeira, encontram-se os fungos vulgarmente conhecidos como “emboloradores”, que provocam a descoloração superficial da madeira, e os “manchadores”, que penetram profundamente na mesma, produzindo manchas de cores variadas, sendo mais freqüente as azuladas (JANKOWSKY, 1990a).

Embora os fungos causem pouco ou nenhum dano aos elementos estruturais da madeira (BLANCHETTE et al., 1992), estes possuem efeito deteriorador no valor estético, devido à colonização pelo seu micélio pigmentado, que leva à produção e deposição de grânulos de melanina ao redor das hifas (BRISSON et al., 1996).

Estágios iniciais de decomposição, causadas tanto por fungos saprófitas como por fungos da podridão do cerne, são facilmente detectados devido à presença de linhas que demarcam a borda entre a madeira sadia e a madeira decomposta, ou entre dois fungos antagonistas. Estas linhas correspondem ao acúmulo de hifas e outros materiais pigmentados, tanto do fungo quanto da madeira.

A identificação destes é de grande importância, dependendo do uso final do produto (FURTADO, 2004).

Estas variações na coloração da madeira de *Pinus* spp. reduzem o valor estético e comercial da mesma, pois esta é classificada de acordo com a quantidade de nós e variações na coloração (FURTADO, 2004). Segundo estas características, que podem levar ao aparecimento e à presença de manchas, a

madeira pode ser classificada em super, extra, primeira, segunda ou terceira classes. É dita super quando não apresenta furos de insetos inativos, mancha azul ou marrom, de origem fúngica. Para ser classificada como de qualidade extra, a madeira não deve apresentar área superior a 15% da área da peça com furos de insetos inativos e, as manchas não devem ser superiores a 10% da área da peça. Madeira de primeira classe é aquela que pode conter furos de inseto inativos, desde que a área afetada não seja superior a 30% da área da peça e, mancha, desde que a área afetada não seja superior a 25% da área da peça. É, ainda, classificada como de segunda classe a madeira que possui furos de insetos inativos e manchas, desde que a área afetada por cada um desses problemas seja inferior ou igual a 50% da superfície da peça. A terceira classe de qualidade não admite defeitos que ultrapassem ao limites das classes imediatamente superiores, exceto aqueles que inviabilizam a utilização da peça da madeira, como, por exemplo, podridão em estado avançado de decomposição e furos de insetos ativos (ABPM, 2002).

4.3 MICRORGANISMOS PIGMENTADORES DA MADEIRA DE *Pinus* spp.

Cerca de 130 espécies de fungos causadores de descoloração/pigmentação do lenho, usualmente denominados fungos emboloradores e manchadores, já foram relatados no mundo, ocorrendo nas mais diversas espécies vegetais (ABRAHAM et al., 1997; JANKOWSKY, 1990b). Sob condições favoráveis de temperatura e umidade, a maioria dessas espécies é suscetível ao ataque de fungos xilófagos e, entre essas, encontram-se as espécies de *Pinus* (SALES-CAMPOS et al., 2000).

A maioria destes fungos pertence aos Ascomycotas e aos fungos imperfeitos anamorfos (ABRAHAM et al., 1997; DORADO et al., 2000). Dentre esses, destacam-se os fungos mitospóricos, capazes de penetrar profundamente na madeira, a exemplo dos gêneros *Ophiostoma*, *Ceratocystis*, *Lasiodiplodia*, *Graphium* e *Diplodia* (FURTADO, 2000).

A colonização da madeira recém serrada geralmente começa com a presença de organismos pioneiros, tais como os fungos manchadores e emboloradores, como *Trichoderma* sp. Os Basidiomycetes são considerados

colonizadores secundários nas sucessões microbiana na madeira, uma vez que estes organismos geralmente removem os extratos da madeira ou outros compostos tóxicos (KÄÄRIK, 1975). Entretanto, alguns Basidiomycetes colonizadores da madeira, tais como o *Phlebiopsis gigantea*, colonizam preferencialmente o alburno fresco, degradando a resina e outros extratos da madeira (BEHRENDT; BLANCHETTE, 1997).

A infecção da planta hospedeira por fungos emboloradores e manchadores, pode ocorrer tanto antes do abate quanto nas etapas posteriores: durante o corte, transporte, desdobramento, armazenamento e utilização final (FURTADO, 2000). Geralmente estes fungos são os primeiros a colonizar as árvores recém-abatidas, devido à grande quantidade de substâncias de reserva dos quais eles se nutrem e, a elevada umidade (OLIVEIRA et al., 1986).

A distinção entre emboloradores e manchadores é feita, primeiramente, com base na profundidade da descoloração, uma vez que geralmente ambos estão confinados a uma grande extensão do alburno e produzem coloração variada. Os típicos manchadores ou azuladores penetram profundamente no alburno e não podem ser removidos pelo aplainamento; quando vista em uma seção transversal da madeira, a mancha frequentemente aparece como cunhas torneadas (pie-shaped wedges) e orientadas radialmente, no sentido das fibras da madeira (HIGHLEY, 1999).

A descoloração provocada por manchadores pode ainda cobrir completamente o alburno, ocorrer como manchas, pontuações, estrias, ou ainda sinais de várias intensidades de cor. As manchas azuis, que variam do azul ao preto azulado e do cinza ao marrom, são o tipo mais comum, embora várias colorações de amarelo, alaranjado, roxo e vermelho possam ocorrer. A cor exata da mancha depende do desenvolvimento e da espécie do organismo infeccioso e, das condições de umidade da madeira (HIGHLEY, 1999).

Os emboloradores, por outro lado, causam descolorações de aspecto difuso ou pulverulento na superfície da madeira, embora as hifas possam penetrar profundamente a madeira. As manchas tendem a ocorrer em pontos, cuja concentração e tamanho variam conforme o tipo e padrão do crescimento superficial do agente causal. Entre as cores, são mais comuns as que variam do cinza claro ao preto e, entre as mais brilhantes, os tons de verde e amarelado. Em coníferas, a descoloração, provocada pelo crescimento do fungo, pode ser retirada facilmente,

através da escovação ou aplainamento (HIGHLEY, 1999).

Em segundo lugar, a distinção está baseada nas atividades enzimáticas fúngicas, as quais diferenciam os principais grupos fisiológicos que preenchem sucessivamente os diferentes nichos ecológicos existentes na madeira, não discriminando os grupos taxonômicos. Portanto o discernimento, se determinado fungo provoca bolor ou mancha na madeira, não é uma prática fácil, sendo em muitas vezes necessária à realização de estudo histológico prévio (KÄÄRIK, 1975).

A infecção por fungos pigmentadores da madeira não é fator limitante para muitos usos em que a aparência não é um fator importante e, uma vez que um pouco de pigmentação é permitido na classificação padrão. Entretanto, estoques com manchas e bolor podem ser insatisfatórios para a confecção de tapumes, guarnição e demais trabalhos em madeira para exteriores, devido a sua maior absorvência de água; além, a deterioração incipiente também pode estar presente, embora imperceptível, nas áreas descoloradas. Ambos os fatores aumentam a possibilidade de deterioração na madeira molhada pela chuva, a menos que a madeira seja tratada com os preservativos apropriados (HIGHLEY, 1999).

Como dito anteriormente, embora causem poucos danos aos elementos estruturais da madeira, possuem efeito nocivo principalmente ao seu valor estético (BRUCE et al., 2003), constituindo em um dos principais problemas das indústrias madeireiras de corte mundial e nacional, bem como para a produção de manufaturados (BEHRENDT et al., 1995a; BRUCE et al., 2003; LEE et al., 2002).

A adoção de medidas visando à sanidade da madeira é altamente necessária para garantia de maior durabilidade e economicidade na utilização desses recursos (BEHRENDT et al., 1995a; FURTADO, 2000).

4.3.1 Fungos Emboloradores

Como representantes deste grupo são relatados os fungos mitospóricos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*. Esses são cosmopolitas, saprófitas, possuem esporulação abundante e conídios de tamanho reduzido, são facilmente disseminados pelo ar e, considerados contaminantes aéreos de diversos ambientes (FURTADO, 2000).

Estes microrganismos induzem manchas superficiais de aspecto pulverulento e removível, constituídas de massas de esporos e, que comprometem principalmente o aspecto visual do lenho (FURTADO, 2000; OLIVEIRA et al., 1986). Embora as hifas possam penetrar profundamente no alburno, essas não afetam a coloração da madeira, pois são hialinas (OLIVEIRA et al., 1986) e, na maioria dos casos, o crescimento acentuado na superfície da madeira deixa-a com aspecto algodado (FURTADO, 2000).

A coloração dessas manchas varia de acordo com a espécie do fungo causador sendo que, entre as colorações encontradas, as mais comuns são cinza, verde e amarelo (FURTADO, 2000).

Os emboloradores nutrem-se de substâncias de reserva solúveis do lúmen celular (açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos), que extravasam das células parenquimatosas danificadas pelo corte e, por esta razão, não afetam a parede celular das células vegetal que permaneceram intactas, não acarretando em diminuição da resistência mecânica da madeira (FURTADO, 2000). Porém, estão relacionados à incidência de emboloradores a redução na resistência ao impacto (SCHEFFER, 1973) e o aumento na permeabilidade, fatos estes que prejudicam a absorção de preservativos e favorecem o apodrecimento, caso a madeira seja umedecida (OLIVEIRA et al., 1986).

Para que estes fungos possam se desenvolver na superfície da madeira, é necessário um ambiente quente, úmido e abafado; por esta razão, são encontrados mais facilmente em toras recém serradas ou estocadas em ambientes com alta saturação de umidade (GALVÃO; JANKOWSKY, 1985). Sob condições desfavoráveis, estes podem permanecer na madeira em estado latente, voltando a proliferarem caso a madeira seja umedecida novamente (CARLOS, 1981).

Para controle são utilizados a secagem da madeira, armazenamento em condições adequadas de temperatura e umidade e, aplicação de preservativos (FURTADO, 2000).

4.3.2 Fungos Manchadores

O manchamento é causado por fungos de colonização pioneira, tais como as espécies *Ceratocystis*, *Leptographium* e *Sphaeropsis*, que utilizam hidratos de carbono simples, ácidos graxos, triglicerídeos e outros componentes do alburno (BLANCHETTE et al., 1992; FARRELL et al., 1993; WANG et al., 1995). Os principais manchadores são fungos mitospóricos da Classe-forma Coelomycetes e, entre esses, encontram-se os gêneros *Lasiodiplodia*, *Ophiostoma*, *Graphium* e *Diplodia*.

Os fungos manchadores causam mancha na madeira devido à presença hifas pigmentadas, cujo interior possui melanina e compostos similares (OLIVEIRA et al., 1986; ZINK; FENGEL, 1988; ZIMMERMAN et al., 1993), ou de hifas hialinas, que secretam substâncias coloridas (OLIVEIRA et al., 1986).

Conforme o fungo cresce nas células da madeira, as hifas geram uma descoloração no alburno (OLIVEIRA et al., 1986; ZINK; FENGEL, 1988; BLANCHETTE et al., 1992), que por variar quanto à coloração, sendo mais comuns as que vão do azul ao cinza escuro e, que pode ser observada em cortes transversais, distribuídas radialmente (OLIVEIRA et al., 1986).

A presença de lignina, em alta quantidade, pode ser um fator limitante para o estabelecimento dos fungos emboloradores e manchadores, uma vez que estes geralmente não são capazes de degradá-la (LEPAGE, 1986 a e b). Estes patógenos também dependem de aberturas naturais, presentes entre as células, para penetrarem na madeira e, do rompimento mecânico das membranas das pontuações; apesar de menos comum, alguns são capazes de atravessar a parede celular do hospedeiro através de penetração mecânica, com a formação de apressórios (FURTADO, 2000).

Os manchadores se desenvolvem nas células parênquimais do alburno e nutrem-se de carboidratos presentes no lúmen celular. Em coníferas, as hifas colonizam exclusivamente células do parênquima radial e, raramente são observadas nos traqueídeos (FURTADO, 2000).

Estes agentes são encontrados, com maior frequência, em toras recém-serradas e em peças de madeira estocadas (antes ou após a secagem); são comuns em árvores senescentes ainda no campo (não abatidas) e em madeiras

atacadas pela vespa da madeira (*Sirex noctilio*) e, de baixa prevalência em árvores vivas e saudáveis (TALBOT, 1977).

Quanto às alterações, que promovem no alburno manchado de *Pinus* spp., encontram-se uma redução na resistência de 1 a 2%, de 2 a 10% na dureza, de 1 a 5% na resistência à flexão e, de 15 a 30% na resistência ao impacto (SCHEFFER, 1973; OLIVEIRA et al., 1986); além disso, esta madeira apresenta-se muito mais permeável que a sadia, fato este que restringe o seu uso (FURTADO, 2000).

Embora não sejam tidos como importantes comprometedores das propriedades de força e resistência da madeira, em estágios adiantados de colonização, a descoloração diminui o valor comercial das toras usadas para a produção de madeira serrada e de papel (ZABEL; MORRELL, 1992; SEIFERT, 1993). Portanto, é fundamental um estudo da avaliação dos danos provocados pelos fungos xilófagos, bem como das perdas econômicas decorrentes do ataque desses em toras estocadas nas indústrias madeireiras (HANADA et al., 2003).

4.3.3 Fungos Azuladores

Entre os fungos manchadores existe um grupo denominado “azuladores” ou “blue stain fungi”, devido à pigmentação que acarretam na madeira de diversas espécies vegetais, que pode variar do azul ao preto, dentre os quais se encontram as espécies dos gêneros *Ophiostoma* e *Ceratocystis* (BEHRENDT et al., 1995a).

Estes são colonizadores pioneiros de madeira recém-serrada e causam grandes perdas econômicas por reduzirem sua qualidade estética, produtos manufaturados e papéis de alta qualidade (CHIDESTER et al., 1938; ROFF et al., 1980; BLANCHETTE et al., 1992; SEIFERT, 1993), além de serem degradadores dos componentes da resina (FARRELL et al., 1993; WANG et al., 1995).

Outro problema associado a estes é que, além de colonizar diretamente as extremidades do lenho cortado, são capazes de invadir as laterais do lenho após o ataque de besouros da casca, como os dos gêneros *Ips* e *Dendroctonus*, que carregam os fungos manchadores diretamente para o alburno

(DOWDING, 1984; HARRINGTON, 1988 e 1993b).

Para manter as toras totalmente livre de azuladores é necessário controlar o ataque dos besouros e a consequente colonização fúngica (BEHRENDT et al., 1995a). Este controle pode ser realizado através da pulverização do lenho com água, para inibir a colonização por fungos em decorrência da queda na taxa de oxigênio (TAROCINSKI; ZIELINSKI, 1982; LIESE; PECK, 1984), e do tratamento com fungicidas, como o pentaclorofenol ou outro fungicida inibidor do crescimento fúngico (CIRELLI, 1978; TAROCINSKI; ZIELINSKI, 1982; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1984).

Embora o controle, em toras, dos azuladores seja eficaz quando se utiliza de fungicidas (TAROCINSKI; ZIELINSKI, 1982; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1984), preocupações atuais sobre a toxidez destes sobre o ambiente tornam necessário o desenvolvimento de novas metodologias, tais como o controle biológico e medidas de bioproteção (BEHRENDT et al., 1995b).

4.3.4 Mecanismo de Ação e Alterações Decorrentes da Infecção por Fungos Emboloradores/Manchadores

A colonização da madeira por agentes emboloradores e manchadores resulta na descoloração ou manchamento da madeira, devido à produção e deposição de metabólitos secundários, como grânulos de melanina (BRUCE et al., 2003; DOGRA; BREUIL, 2004). No alburno de coníferas estes fungos causam descoloração, pela colonização de células parenquimáticas e, durante os estádios tardios de ataque, pela penetração nos traqueídeos (LIESE; SCHMID, 1961; BALLARD et al., 1984).

O manchamento tende a ocorrer em pontos de concentração e em tamanhos variados, dependendo do tipo e do padrão de crescimento superficial e, sob condições favoráveis de umidade e temperatura, os fungos emboloradores e manchadores podem se estabelecer e desenvolver rapidamente no alburno de toras recém serradas (HIGHLEY, 1999). Madeira recém-serrada e estoques de madeira verde, empilhados durante clima quente e úmido, podem ser visivelmente

descolorados dentro de cinco ou seis dias (HIGHLEY, 1999). Essa pigmentação é responsável pela depreciação do valor comercial da madeira na forma *in natura*, bem como os móveis e "pallets" dela originados (BEHRENDT et al., 1995b; JANKOWSKY, 1990a).

No caso específico do *Pinus* spp., quando o alburno encontra-se descolorido, devido à presença de fungos manchadores e emboloradores, o mesmo pode apresentar redução na densidade, dureza (FURTADO, 2000). Porém, o maior efeito decorrente dessa infecção, está relacionado às propriedades de resistência, que determinam a resistência ao choque ou a tensão (HIGHLEY, 1999).

Eles microrganismos também aumentam a absorbância da madeira, acarretando em uma maior absorção de cola, tinta ou de preservativos de madeira, durante o processamento subsequente. A porosidade aumentada ainda torna a madeira mais suscetível, o que pode conduzir à colonização por fungos típicos da deterioração da madeira (HIGHLEY, 1999).

4.3.5 Manchamento da Madeira de *Pinus* spp. Recém Serrada

Como dito anteriormente, o manchamento da madeira é decorrente da pigmentação de hifas e da produção e liberação de melanina e compostos similares, pelos fungos manchadores. As manchas podem ocorrer superficialmente ou serem mais internas e, sua presença compromete o aspecto visual e comercial da madeira.

As manchas produzidas podem variar em cor e tonalidades, sendo mais comuns as colorações azul, cinza, marrom e preto, embora tonalidades de amarelo, alaranjado, roxo e vermelho possam ocorrer (HIGHLEY, 1999), e as tonalidades de azul-escuro, azul-acinzentado, amarronzado e púrpuro (HICKIN, 1971).

4.3.5.1 Manchamento superficial

O manchamento superficial é conseqüência da colonização da madeira por fungos emboloradores, cujas hifas se desenvolvem sobre a superfície do material orgânico em condições de alta umidade e pouca ventilação; como resultado o material apresenta aspecto lanoso ou empoeirado (HICKIN, 1971).

Entre os gêneros causadores de manchamento superficial encontram-se *Penicillium*, *Trichoderma* e *Gliocladium*, responsáveis pelas colorações verdes e, *Aspergillus* e *Rhizopus*, agentes da descoloração negra (SCHEFFER; LINDGREN, 1940).

Estes, como já dito anteriormente, apesar de penetrarem profundamente no alburno não afetam sua coloração, pois possuem hifas hialinas. Entretanto, comprometem visualmente o aspecto externo da madeira devido à formação de massas de esporos pigmentados na superfície colonizada (LEPAGE, 1986 a e b; ZABEL; MORRELL, 1992).

Entre os defeitos detrimenais causados pela presença desse tipo de manchamento encontram-se a maior permeabilidade da madeira (VERRALL, 1957; WEHR, 1985), como conseqüência da destruição das membranas e das pontuações (LINDGREN, 1952). A presença de emboloradores ainda aumenta a permeabilidade e a absorção de soluções preservativas oleosas pela madeira de pinus (NICHOLAS, 1973).

A maioria das espécies de bolores apresenta tolerância a diversos ingredientes ativos e a elevadas concentrações das soluções preservativas de madeira, usadas pela indústria florestal, sendo que algumas destas espécies são, inclusive, capazes de detoxificar alguns destes preservativos (SCHEFFER, 1973).

4.3.5.2 Manchamento interno

O manchamento interno, como descrito anteriormente, é causado por fungos manchadores, cujas hifas penetram profundamente na madeira, passando de célula a célula através de pontuações.

Sob condições ideais, os manchadores podem promover a descoloração de até 0,5 mm no plano tangencial, 1,0 mm no radial e, 5,0 mm no longitudinal, no decorrer de 24 horas, atingindo as camadas profundas do alburno (LINDGREN, 1942).

Manchas internas podem ser visualizadas em seções transversais de toras, devido à movimentação das hifas através das células dos raios. Após cinco a seis dias de se estabelecerem na madeira, as hifas desenvolvem pigmentação (ZABEL; MORRELL, 1992).

Quando a secagem da superfície da madeira ocorre de forma muito rápida, embora as manchas não sejam visíveis na superfície, podem estar presentes nas camadas mais profundas do alburno; este tipo de secagem promove a morte do fungo na superfície da madeira, antes que as hifas possam adquirir pigmentação (CAVALCANTE, 1982).

Embora as propriedades de resistência da madeira sofram pouca ou nenhuma alteração, sua permeabilidade pode aumentar significativamente (DA COSTA, 1999). Madeira atacada por mancha azul apresenta-se mais porosa e permeável do que a sadia devido à presença de aberturas feitas pela penetração das hifas fúngicas na sua microestrutura, facilitando assim a absorção de preservativo no interior da madeira seca, durante o tratamento (NICHOLAS, 1973).

4.4 MENSURAÇÃO DA INFECÇÃO E PIGMENTAÇÃO DO LENHO

Métodos de mensuração do fluxo de seiva pelo caule podem ser utilizados no estudo do efeito da infecção natural ou artificial de coníferas por fungos azuladores (HORNTVEDT et al., 1983; WANG, 1983; YAMAOKA et al., 1990).

Outras ferramentas também podem ser utilizadas para o estudo das interações patógeno-planta hospedeira, com a finalidade de comparar a patogenicidade de vários fungos azuladores com seus hospedeiros, além das medidas do fluxo da seiva, como método não-destrutivo do monitoramento dos efeitos da infecção fúngica na funcionalidade do alburno, descrito por Yamaoka et al. (1990). Entre estes se encontram o teste de condução de corante (BRAMBLE; HOLST, 1940; BASHAM, 1970; CHRISTIANSEN, 1992); aplicação de marcadores

radioativos, como o ^{82}Br (HORNTVEDT et al., 1983; WANG, 1983) e, o método de termo-dissipação (GRANIER, 1985).

Uma das escalas que dá notas, de 0 a 8, conforme o percentual de câmbio colonizado por fungos, é a Escala de Horsfall-Barrett (Tabela 2) (CAMPBELL; MADDEN, 1990). Outra escala que pode ser utilizada em testes de laboratório, quando se deseja verificar o potencial de manchamento de fungos em madeira, ou no estudo de antagonismo, é a Escala de Manchamento (Tabela 3), sugerida por Benko e Highley (BENKO; HIGHLEY, 1990c).

Tabela 2 – Escala de Horsfall-Barrett, para percentual de câmbio colonizado por fungos emboloradores e manchadores

Notas	Porcentual do Câmbio Colonizado
0	0%
1	0-3%
2	3-6%
3	6-12%
4	12-25%
5	25-50%
6	50-75%
7	75-88%
8	88-94%

Tabela 3 – Escala de Manchamento proposta por Benko e Highley (1990c)

Notas	Sinais e Manchas
0	<u>Sem mancha</u> Sem sinais visíveis de manchamento ou fungos na superfície
1	<u>Madeira ligeiramente manchada</u> Pontos minúsculos e individuais, com diâmetro máximo de 2 milímetros
2	<u>Madeira moderadamente manchada</u> Ao menos um terço da superfície manchada ou com manchas em linhas em até um meio da superfície; mancha e/ou fungos cobrindo ao menos um terço e até metade da superfície
3	<u>Madeira pesadamente manchada</u> Mais de um meio da superfície manchada; mancha e/ou mofos cobrem mais da metade da superfície

4.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE MANCHADORES DA MADEIRA E INSETOS-PRAGA

Plantas adultas de muitas espécies de coníferas são suscetíveis ao ataque de espécies agressivas de besouros (Coleoptera, Scolytidae), como as dos gêneros *Dendroctonus*, *Ips* e *Tomicus* (BERRYMAN, 1988). Estas, em sua maioria, são vetores de uma ou várias espécies de fungos manchadores dos gêneros *Ceratocystis*, *Ceratocystiopsis* e *Ophiostoma* (WHITNEY, 1982; WINGFIELD et al., 1993), ou estão relacionados aos gêneros anamorfos, tais como *Graphium* e *Leptographium* (HARRINGTON, 1993 a e b; WHITNEY, 1982).

A infecção por fungos manchadores dá-se pela invasão das laterais da árvore, após o ataque de besouros agressivos à casca da árvore, que possuem a capacidade de inocular uma ou mais espécies diretamente no xilema e floema (BEHRENDT et al., 1995a; FERNÁNDEZ et al., 2004; KIRISITS; OFFENTHALER, 2002).

Grande parte destes besouros transporta esporos de fungos azuladores fitopatogênicos (Ascomycetes, Ophiostomataceae) que, ao serem introduzidos no xilema e floema no momento do ataque, provavelmente auxiliam no estabelecimento das populações de pragas secundárias (BERRYMAN, 1972; WHITNEY, 1982; CHRISTIANSEN et al., 1987; PAINE et al., 1997). Além disso, estes fungos ainda contribuem para a exaustão da resistência da árvore e podem estar envolvidos no processo de morte da árvore (CHRISTIANSEN et al., 1987; PAINE et al., 1997; LIEUTIER, 2002; FERNÁNDEZ et al., 2004). Esta associação, entre insetos e fungos, ainda pode levar ao aparecimento de manchas vasculares e acarretar na interrupção do suprimento de água para a planta (KIRISITS; OFFENTHALER, 2002; NAGY et al., 2000; YAMAOKA et al., 2000; SOLHEIM et al., 2001).

A fitopatogenicidade dos fungos manchadores varia consideravelmente, mesmo entre os associados às espécies agressivas de besouros do córtex (HARRINGTON, 1993a; PAINE et al., 1997). Alguns fungos azuladores são relativamente patogênicos e, estudos de inoculação demonstraram que estes podem matar árvores maduras, mesmo na ausência de seus vetores (CHRISTIANSEN, 1985 a e b; SOLHEIM; SAFRANYIK, 1997).

Porém, na maioria dos casos, parece haver uma relação de

mutualismo entre besouros do córtex e fungos patogênicos causadores de manchamento, uma vez que um é capaz de reduzir as dificuldades encontradas pelo outro na colonização das hospedeiras (RAFFA; KLEPZIG, 1992).

Entre os benefícios desta relação, para os besouros, encontra-se o aumento da agressividade de cada besouro, assegurada pela colonização da madeira por manchadores, que lhes ajudam a esgotar as defesas da árvore (MALLOCH; BLACKWELL, 1993). Já a habilidade dos besouros em carregar esporos de azuladores (DOWDING, 1984; HARRINGTON, 1988 e 1993b) resultam na dispersão de esporos para toras com as quais os besouros entraram em contato ou construíram túneis (BEHRENDT et al., 1995a).

Ips typographus é um vetor bem conhecido de várias espécies de fungos azuladores (SOLHEIM, 1986; KIRISITS, 1996), entre os quais se destacam *Ceratocystis polonica*, que tem recebido considerada atenção por ser o fungo mais agressivo associado ao besouro do abeto (HORNTVEDT et al., 1983; SOLHEIM, 1988; KIRISITS, 1998).

Os esporos de *Ceratocystis polonica* estão presentes por toda a superfície do corpo do besouro do córtex *I. typographus* ou no intestino da maioria dos indivíduos desta espécie, sendo introduzidos no floema quando os besouros estabelecem galerias em árvores saudáveis. Em árvores atacadas com sucesso, o complexo besouro-fungo esgota rapidamente as defesas da árvore, coloniza o floema e o alburno e, impede o transporte da água à coroa (HORNTVEDT et al., 1983; SOLHEIM, 1992; KROKENE; SOLHEIM, 1998).

O besouro *Dendroctonus frontalis* Zimmermann (SPB) é o inseto-praga mais prejudicial de *Pinus* spp. no sudoeste dos Estados Unidos, sendo que três fungos estão intimamente associados a ele (KLEPZIG; WILKENS, 1997). Besouros fêmeas carregam dois fungos, *Ceratocystiopsis ranaculosus* Perry e Bridges e *Entomocorticium* sp. Ambos os fungos são carregados dentro de uma invaginação especializada da estrutura secretória, dentro do protórax da fêmea SPB, sendo inoculados com a oviposição no córtex e no floema de árvores hospedeiras (BARRAS; PERRY, 1972; BRAMBLE; HOLST, 1940). Após inoculação, eles se ramificam através de galerias das larvas em desenvolvimento, produzindo grandes quantidades de esporos (BARRAS; PERRY, 1972).

As larvas de SPB são conhecidas por obterem benefícios nutritivos destes fungos (BARRAS, 1973; BARRAS; PERRY, 1972; COPPEDGE et al, 1995),

uma vez que sua ingestão está associada com a maior fecundidade do besouro (BARRAS, 1973; GOLDHAMMER et al., 1990), aumento do peso e no tamanho da população e, no índice de lipídios (COPPEDGE et al, 1995) sendo, por estas razões, considerados mutualistas do SPB (KLEPZIG; WILKENS, 1997).

O terceiro fungo, *Ophiostoma minus* (Hedgc.) H. e P. Sydow, é carregado no exoesqueleto do SPB, estando intimamente associado a um ácaro (BRIDGES; MOSER, 1983). Este fungo também pode ser inoculado através do ataque de besouros em árvores hospedeiras, onde ele se frutifica e causa manchas azuis características no córtex, floema e xilema. Inicialmente, a associação *O. minus*-SPB pode levar a morte da árvore ou reduzir a condução de água através do floema (BASHAM, 1970). Entretanto, eventualmente, este fungo pode competir com o SPB por tecido hospedeiro não-colonizado (KLEPZIG; WILKENS, 1997).

Os fungos patogênicos azuladores associados a besouros do córtex, como o fungo *Leptographium terebrantis* e os besouros *D. valens*, *D. terebrans* e *Hylastes porculus* (HARRINGTON, 1993a; KLEPZIG et al., 1995), são bem adaptados à colonização de ambientes com índice elevado de pressão e de conteúdo de água e níveis baixos de oxigênio, encontrados em árvores parasitadas de *Picea abies* (SOLHEIM, 1993).

Entretanto, o desenvolvimento do besouro pode ser afetado negativamente pela presença de fungos manchadores; em áreas de tecido hospedeiro fortemente infectadas por este fungo, caracterizadas por áreas manchadas de azul, ocorre a inibição da produção de ovos e do crescimento e desenvolvimento larval de SPB (BARRAS, 1970; FRANKLIN, 1970). Nestas condições, *O. minus* é considerado antagonista do SPB (KLEPZIG; WILKENS, 1997).

4.6 TRATAMENTO DA MADEIRA DE *Pinus* spp.

Os manchadores podem ser prevenidos e/ou controlados, em madeira serrada, através de tratamentos que reduzem a umidade natural da madeira e aumentam sua resistência contra manchadores e decompositores (JANKOWSKY, 1990a). Outras medidas que podem ser tomadas e, que tem por objetivo evitar a

instalação destes microrganismos na madeira, são a eliminação do oxigênio e alterações no pH da madeira (DA COSTA, 1999).

4.6.1 Prevenção do Aparecimento de Manchas Através da Manipulação da Madeira e de Condições Ambientais

A maioria dos fungos confere caráter ácido ao substrato em que se desenvolvem, tendo preferência por meios que possuem essa característica. Embora os pontos ótimos, máximo e mínimo de pH, adequados para a instalação e desenvolvimento de xilófagos variem conforme a espécie (KATO; TAKEDA, 1970), o pH da madeira pode ser alterado, através do uso de nitrato de acrílico, até o ponto em que fornecerá proteção da madeira contra um determinado grupo de fungos emboloradores e manchadores; este método de tratamento possui custo relativamente elevado (MORESCHI, 1998).

Para evitar o ataque destes patógenos, a principal recomendação é que a colheita seja realizada no inverno, quando o inóculo e a atividade dos insetos (vespa e besouro da madeira) são baixos, de modo a retardar o manchamento da madeira (IDE et al., 2000).

Outra alternativa para promover a proteção contra insetos e fungos é a saturação das pilhas de toras pela aspersão de água (IDE et al., 2000). Para isso a umidade do alburno de *Pinus* spp. deve ser mantida entre 100 a 120%, em relação ao peso seco da madeira em estufa (SYME; SAUCIER, 1995). O armazenamento em água gera bons resultados, desde que na madeira saturada os níveis de oxigênio sejam reduzidos, privando os fungos da quantidade mínima de oxigênio necessária para seu desenvolvimento (IDE et al., 2000).

4.6.2 Metodologias Empregadas no Tratamento da Madeira

Dos fatores capazes de controlar o manchamento da madeira, os principais relacionam-se à rapidez no seu processamento, desde o abate da árvore

até a secagem do produto final, além do tratamento químico da madeira (DA COSTA, 1999).

Um dos motivos que favorecem o estabelecimento de agentes manchadores é o método de extração utilizado pelos empreiteiros, durante o período que compreende a extração e o desdobro de tora em serrarias, que pode variar entre 7 a 45 dias. Durante este período, as toras permanecem em um pátio de armazenamento central, sem receberem qualquer tipo de cuidado preventivo, deixando-as expostas às condições climáticas adversas e ação dos agentes biológicos (MILANO; VIANNA NETO, 1982; APETORGBOR et al., 2004).

Este fato contrapõe as indicações de que a extração da madeira e o desdobro das toras devem ocorrer no máximo após um período de 48 horas após o abate, de modo a evitar o estabelecimento de emboloradores e manchadores (IDE et al., 2000; MILANO; VIANNA NETO, 1982).

Outros tratamentos existentes atualmente, para a prevenção e controle dos manchadores, são os tratamentos por ar quente forçado e por calor, em estufas de secagem ou ao ar livre, ou tratamentos químicos (BEHRENDT et al., 1995b; FAO, 2005).

Como formas de tratamento químico, encontram-se a fumigação com brometo de metila e a aplicação de fungicidas (BEHRENDT et al., 1995b; FAO, 2005). A aplicação de preservativos, produtos químicos tóxicos oleosos ou hidrossolúveis, é um método preventivo contra a penetração destes patógenos na madeira; entre estes se encontram o creosoto, pentaclorofenol, CCA (cromo, cobre e arsênio), CCB (cromo, cobre e boro) e FCAP (flúor, cromo, arsênio e fenóis) (JANKOWSKY, 1990b).

Contudo, esses tratamentos apresentam desvantagens que devem ser levadas em consideração, uma vez que apresentam alto custo, tornando inviável o tratamento de peças grandes, assim como grandes quantidades. Além disso, o tratamento pode acarretar em defeitos no lenho, tais como o ressecamento, reduzindo o valor da madeira e, ainda, encontrar barreiras minuciosas na legislação sobre os tratamentos químicos, uma vez que os produtos utilizados são altamente biocidas (ABRAHAM et al., 1997).

De modo geral, os métodos empregados pelas indústrias madeireiras são, na maioria das vezes, insuficientes devido à falta de informação sobre os microrganismos que infectam a madeira e o uso dos preservativos

necessários (HANADA et al., 2003). Em conseqüência, as manchas têm sido controladas, tradicionalmente, com produtos químicos anti-manchas; entretanto, a toxidez e os efeitos ambientais de muitos produtos químicos usados alertaram para a busca de métodos alternativos do controle (HELD et al., 2003).

No Chile, por exemplo, as companhias florestais têm se preocupado há muito tempo com os fungos manchadores, especialmente com as espécies do gênero *Ceratocystis*. Neste país, o principal produto utilizado para evitar o manchamento da madeira era o pentaclorofenato de sódio, porém a partir de dezembro de 1999 o Serviço Agrícola e Pecuário (SAG) proibiu sua venda e uso, criando um grave problema aos produtores, que tiveram que procurar novos produtos, menos tóxicos, eficientes e de baixo custo. Atualmente as empresas florestais têm utilizado o MAD PLAS® (tribromofenol), utilizado em 90% da madeira tratada, e o Mitrol Q8® (quinolato de cobre) (IDE et al., 2000).

Uma nova opção para o tratamento da madeira contra os fungos manchadores é a implantação do uso de fungos como agentes de controle. Porém, estes podem desfigurar a madeira e a polpa, tornando-as pigmentadas por seus esporos. Para prevenir este efeito negativo, tem-se recorrido ao uso de cepas não-pigmentadas de manchadores; estratégia esta considerada ideal, uma vez que organismos sem pigmento de melanina são ecologicamente compatíveis com os fungos manchadores e podem ocupar o mesmo nicho (BLANCHETTE et al., 1992; BEHRENDT et al., 1995 a e b; CROAN, 1996; FARRELL et al., 1998).

4.7 CONTROLE BIOLÓGICO DOS FUNGOS EMBOLADORES E MANCHADORES

A deterioração da madeira é um processo biológico complexo que pode envolver uma grande variedade de microrganismos, geralmente interagindo e sendo influenciados pelas mudanças nas condições ambientais nas qual a madeira se encontra (EATON; HALE, 1993; ZABEL; MORRELL, 1992). Isso proporciona um desafio particular para os interessados em desenvolver uma estratégia de controle biológico para a proteção de produtos a base de madeira (BRUCE et al., 2003).

O agente de controle biológico, para ser considerado eficiente em condições de campo, deve ser capaz de colonizar madeira não-estéril, competir com

outros organismos pelo substrato, tolerar as variações constantes das condições ambientais e ser capaz de se estabelecer, uma vez inoculado, por um período prolongado (SEIFERT et al., 1988; FREITAG et al., 1991; BEHRENDT et al., 1995a). Para ser considerado eficaz em produtos manufaturados, é necessário que o mesmo seja efetivo contra todos os potenciais deterioradores das estruturas da madeira, seja compatível com o uso de outros produtos (como inseticidas) e que permaneça efetivo durante todo o tempo de vida útil da mercadoria (BRUCE et al., 2003).

Inúmeros autores têm pesquisado sobre o uso do controle biológico para fungos manchadores, sendo que a maioria dos agentes potenciais de controle inclui bactérias e o filtrado de suas culturas (BERNIER JÚNIOR et al., 1986; SEIFERT et al., 1988; BENKO, 1988 e 1989; BENKO; HIGHLEY, 1990b e c; CROAN; HIGHLEY, 1991a, 1992, 1994; HIGHLEY et al., 1991; KREBER; MORRELL, 1993; MORRELL; SEXTON, 1993; MORRELL; VELICHETI, 1995; JIN; MORRELL, 1996).

Outros trabalhos, entretanto, tem se concentrado no uso de uma variedade de fungos e filtrado de fungos para atuar como bioprotetores (KLINGSTROM; JOHANSSON, 1973; STRANKS, 1976; SEIFERT et al., 1988; BENKO; HENNINGSON, 1986; CROAN; HIGHLEY, 1991 b e c, 1993; KREBER; MORRELL, 1993; CHKRAVARTY et al., 1994; CHKRAVARTY; HIRATSUKA, 1994; HIRATSUKA et al., 1994; SCHOEMAN et al., 1994; JIN; MORRELL, 1996; YANG, 1998).

Embora revisões de literatura que examinam uma ampla gama de aplicações do controle biológico em produtos florestais, dando ênfase aos mecanismos pelos quais os agentes de controle biológico protegem a madeira, estejam disponíveis (BRUCE, 1998; SCHOEMAN et al., 1999) e diversos trabalhos tenham sido realizados nessa área, poucos produtos comerciais para o controle biológico têm sido desenvolvidos para a prevenção de manchadores (BRUCE et al., 2003).

Isso se deve, em parte, a falta de conhecimento dos efeitos no impacto ambiental dos agentes de controle biológico (MORRELL; DAWSON-ANDOH, 1998). Este fato pode ser reflexo da falta de conhecimento do mecanismo pelos quais os agentes de controle biológico atuam como inibidores a determinados fungos antagonistas ou competem com os fungos manchadores (BRUCE et al.,

2003); ou ainda, da dificuldade para determinação do papel da pigmentação na colonização da madeira e do mecanismo de produção e a trajetória da melanina, no fungo e na madeira (LOPPNAU et al., 2004).

Determinados grupos de bactérias, leveduras e fungos, usados no pré-tratamento de blocos de madeira, são reconhecidos devido à capacidade de reduzir significativamente a colonização da madeira por emboloradores e manchadores (PAYNE et al., 2000). Uma busca sistemática também pode ser capaz de identificar as espécies de manchadores que possuem potencial para o controle biológico (DORADO et al., 2000).

O uso de agentes de biocontrole na indústria madeireira requer experimentações e um período de adequação, uma vez que esta deve aceitar períodos mais curtos de armazenamento de toras (de dois a três meses, em vez de processar em seis meses) e os tratamentos das toras, com os fungos do biocontrole, deve ser mais rápidos (quase que imediatamente após o corte) (HELD et al., 2003).

4.7.1 Controle Biológico Utilizando Cepas Fúngicas Albinas

Na década de 1990, vários estudos foram realizados acerca da utilização de fungos emboloradores e manchadores atuando de maneira antagônica a fungos degradadores, principalmente quando estes são colonizadores pioneiros (HULME; SHIELDS, 1975).

O controle biológico dos fungos azuladores tem sido investigado em testes laboratoriais em blocos de madeira de *Pinus banksiana* usando várias cepas fúngicas, como *Gliocladium roseum*, *Hypocrea gelatinosa*, *Nectria cinnabarina*, *Trichoderma viride*, *T. polysporum* e *Tympanis* sp. (SEIFERT et al., 1988).

Existem relatos sobre o potencial do *Trichoderma viride* como antagonista a fungos degradadores de madeira (BROWN; BRUCE, 1998), da capacidade do *Trichoderma harzianum* em reduzir a quantidade de fungos apodrecedores em toras de *Pinus* sp. (SCHOEMAN et al., 1994) e, que madeiras infectadas com *T. harzianum* mostraram resistência a fungos degradadores, principalmente aos fungos da podridão parda (MESSNER et al., 1996). Porém, os níveis das enzimas quitinase e protease em *Pinus ponderosa* infectado com

Trichoderma harzianum, indicaram que estas enzimas não desempenham papel importante na proteção contra os fungos manchadores (LUI; MORRELL, 1997).

Um dos problemas no uso de fungos como agentes de controle é que estes podem desfigurar a madeira ou então a polpa pode ser pigmentada por seus esporos (CROAN, 1996). Porém, atualmente, diversas pesquisas têm sido realizadas sobre o uso de cepas não-pigmentadas de organismos manchadores; esta é tida como uma estratégia ideal, uma vez que organismos, sem pigmento de melanina, que causam manchamento são ecologicamente compatíveis com os fungos manchadores, podendo então ocupar o mesmo nicho, sem desfigurar a madeira (FARRELL et al., 1998).

Fungos manchadores são ideais para o pré-tratamento da madeira, porque são capazes de assimilar facilmente os nutrientes de carbono e nitrogênio presentes no parênquima celular, ductos resiníferos e outros tecidos da madeira. Adicionalmente, estes fungos podem colonizar rapidamente cavacos de madeira não-estéril (DORADO et al., 2000).

O controle biológico, que usa cepas albinas de fungos manchadores, é um novo método. Pesquisas usando cepas incolores de espécies de *Ophiostoma* foram bem sucedidas no controle das manchas (BLANCHETTE et al., 1992; FARRELL et al., 1993; BEHRENDT et al., 1995a, b; SCHMIDT; MÜLLER, 1996; WHITE-MCDOUGALL et al., 1998). Aplicando-se cepa incolor de *Ophiostoma* em toras recém serradas, este pode preferencialmente colonizar o alburno, capturando desse modo os recursos de nutrientes e inibindo a colonização subsequente por fungos causadores de mancha (HELD et al., 2003).

Os estudos precedentes mostraram que as cepas albinas de *Ophiostoma* são capazes de degradar extratos da madeira, incluindo triglicerídeos, gorduras e ácidos da resina (BLANCHETTE et al., 1992; FARRELL et al., 1993, 2000; BRUSH et al., 1994; WANG et al., 1995), reduzindo significativamente a colonização e o manchamento de toras de *Pinus radiata* (HELD et al., 2003).

Experimentos de antagonismo em laboratório demonstram que as cepas albinas de *Ophiostoma* podem ser eficazes em impedir o manchamento por diferentes espécies de fungos. Além de inibir um isolado de *O. piliferum* que causa a mancha escura, os isolados de *L. procerum* e *S. sapinea*, da Nova Zelândia e que causam manchas escuras, também foram inibidos. Estes resultados suportam observações precedentes, que mostraram sucesso usando cepa albina para

controlar o manchamento em experiências preliminares (BEHRENDT et al., 1995 a e b; MÜLLER; SCHMIDT, 1995; BLANCHETTE et al., 1997).

Espécies nativas mais prevalentes e agressivas de manchadores, presente em um país específico, como no caso cepas de *Ophiostoma* spp., podem ser usadas para obter cepas albinas para o controle biológico. Isto evita problemas associados com a introdução de cepas estrangeiras de fungos em áreas que não são nativas (HELD et al., 2003).

Cepas albinas de *Ophiostoma floccosum*, *Ophiostoma piceae* e *Ophiostoma pluriannulatum* também demonstraram serem bons agentes de controle biológico dos fungos manchadores *Leptographium procerum*, *Ophiostoma piliferum* e *Sphaeropsis sapinea*, em madeira de *Pinus radiata*. Os dois primeiro apresentaram grande porcentagem de isolados realizando total controle dos manchadores e outros controlando de modo eficaz, porém a madeira apresentava colorações leves (do cinza ao negro). *Ophiostoma pluriannulatum*, por outro lado, mostrou ser excelente controlador, com controle completo dos fungos manchadores escuros (HELD et al., 2003).

Até o momento, o controle biológico efetivo pode ser realizado, em toras recém serradas e madeira serrada, somente através do tratamento com o isolado não-pigmentado de *Ophiostoma piliferum* (Fries) Sydow e Sydow, comercialmente denominado Cartapip-97™ (Sandoz Chemicals Corporation, Charlotte, N. C.). Esta cepa coloniza rapidamente a madeira não-estéril, sem efeito detrimental aparente para a madeira, e compete com sucesso com fungos manchadores, inibindo também o tipo selvagem do fungo azulador, que pigmenta a madeira colonizada recém serrada toras em campo (BLANCHETTE et al., 1992 e 1993; FARRELL et al., 1993; BEHRENDT, 1994).

Este, assim como outras formas albinas derivadas de fungo manchadores, é considerado agente ideal para o biocontrole, uma vez que são biologicamente similares, com a exceção à pigmentação; colonizam rapidamente o substrato; resistem à substituição por outras espécies de manchadores, não afetam as propriedades estéticas da madeira e não causam efeito nocivo ao ambiente (LEE et al., 2002). A eficácia desta cepa para degradar triglicerídeos causando problemas tem sido demonstrada tanto em espécies de madeiras maleáveis (BRUSH et al., 1994), quanto em madeiras duras (ROCHELEAU et al., 1998).

Estudos mais recentes revelaram a existência de uma nova cepa

promissora de *Pestalotiopsis crassiuscula* para o controle de resina. Esta possui eficiência comparada ao comercial Cartapip-97™ (cepa comercial de *O. piliferum*), na redução de extratos contidos no alburno de pinus 'Scot' (de 76-97% após quatro semanas), porém é mais eficiente na degradação de ácidos resiníferos (61%) e esteróis (53-54%) (DORADO et al., 2000).

Phlebiopsis gigantea (Fr.) Jül. (sin. *Phanerochaete gigantea* e *Peniophora gigantea*), quando utilizado como pré-tratamento fúngico em toras de *Pinus resinosa* Aiton, atua como controlador biológico. É ideal para o tratamento de toras, uma vez que sua inoculação, imediatamente após o corte, assegura a colonização extensiva da madeira.

Durante quatro a doze semanas após a inoculação, período em que a tora encontra-se em trânsito para processamento ou armazenada para o uso futuro, modificações ocorrem na madeira de modo a melhorar a eficiência de transformação da madeira; ou seja, promove a degradação da resina e garante uma maior porosidade da parede celular. Assim, o crescimento deste fungo além de inibir a colonização e o desenvolvimento de fungos prejudiciais, como manchadores, acelera o processo de remoção dos besouros da madeira (BEHRENDT; BLANCHETTE, 1997).

A inoculação de *P. gigantea* em toras recém serradas de *Pinus resinosa* inibiu o crescimento e a colonização subseqüentes por fungos causadores de mancha azul do tipo selvagem. Em toras tratadas, nenhum fungo manchador foi isolado a partir do cepilho, enquanto 53% do cepilho, removido de toras não-inoculadas, apresentou fungos manchadores após doze semanas (BEHRENDT; BLANCHETTE, 1997).

Resultados obtidos por Held et al. (2003), contrapõem resultados anteriores obtidos por Kang e Morrell (2000), indicando que uma única cepa albina pode controlar diversos gêneros dos fungos manchadores geralmente encontrados em produtos de madeira da Nova Zelândia (FARRELL et al., 1997).

A época da inoculação do agente de biocontrole é crucial e deve ser feita imediatamente após o corte (BEHRENDT et al., 1995b). Experimentos adicionais a campo são necessários para elucidar os fatores ambientais que poderiam afetar o sucesso das cepas albinas e do resultado para um controle mais eficaz, contudo o controle biológico dos manchadores por um período acima de 6 meses é um período extremamente longo para que as cepas albinas permaneçam

eficazes (HELD et al., 2003).

Experimentos precedentes indicam que, a campo, as cepas albinas são bons agentes de biocontrole sobre um curto período (BEHRENDT et al., 1995 a e b). Porém, quando uma grande área de alburno está exposta, este método pode apresentar eficácia reduzida no controle de manchadores. Assim, métodos melhorados de inoculação e aplicação poderiam fornecer uma melhor cobertura e aderência às toras, aumentando a eficácia do processo (HELD et al., 2003).

4.7.2 Controle Biológico Utilizando Cepas Bacterianas

Alguns gêneros de bactéria, principalmente *Pseudomonas* e *Bacillus*, têm sido investigados em experimentos laboratoriais para controlar os fungos azuladores (BENKO, 1988 e 1989; SEIFERT et al., 1988; KREBER; MORRELL, 1993).

O controle biológico de agentes manchadores com *Pseudomonas cepacia* foi investigado, com blocos de madeira de *Pinus banksiana*, gerando bons resultados em testes laboratoriais; porém, em situação de campo, os resultados foram insatisfatórios, uma vez que de 30 a 50% das madeiras tratadas foram colonizadas por manchadores (BENKO, 1989).

Em 1990, Benko e Highley (1990c) propuseram o controle biológico do fungo manchador *Ceratocystis coerulescens* (Munch) Bakski (C-262) com um “pull” contendo seis bactérias (*Pseudomonas cepacia*, *Streptomyces chrestomycticus*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus*, *Streptoverticillium cinnamoneum* subsp. *azacoluta*, *Xenorhabdus luminescent*). A madeira de *Pinus* spp., previamente tratada com imersão, por uma hora, no caldo de carne em esporulação, era então exposta ao fungo.

O grau médio de manchamento por *Ceratocystis coerulescens* em blocos de madeira tratada com a mistura bacteriana variou de 0 a 3, ao passo que as amostras do controle foram manchadas fortemente, com grau médio de manchamento 3 (segundo Escala de Manchamento de Benko e Highley) (BENKO; HIGHLEY, 1990c).

Em outro experimento, esta mesma suspensão bacteriana foi usada

para testar o antagonismo contra *Ceratocystis coerulea*. Blocos de madeira tratados acarretaram no aparecimento de minúsculos pontos individuais manchados de azul, tendo como grau médio de manchamento 0; já amostras controle estavam pesadamente manchadas, com grau médio de manchamento 3 (BENKO; HIGHLEY, 1990c).

Quando em teste contra *Trichoderma harzianum*, a madeira apresentou pequenos sinais de descoloração, com média de manchamento de 0 a 1, o que significa que ocasionalmente ocorreram minúsculos pontos manchados de verdes nos blocos de pinus, mas estes não foram maiores que dois milímetros, enquanto que as amostras de controle estavam fortemente manchadas sobre toda a superfície, com grau médio de manchamento 3 (BENKO; HIGHLEY, 1990a).

Benko e Highley (1990c) demonstraram a importância da seleção dos meios para a avaliação do efeito antagonista de bactérias no controle de fungos que atacam a madeira. Embora os meios sugeridos para multiplicação de bactérias geralmente contenham componentes principais similares, uma pequena modificação destes componentes pode acarretar em uma diferença significativa na estimulação de metabólitos secundários, particularmente antibióticos, que possuem papel-chave no controle biológico.

Diversas espécies de bactérias são capazes de atuarem como agentes biológicos na preservação da madeira e, para que o controle seja efetivo a um amplo 'espectro' de fungos manchadores, é necessário o uso de combinações diferentes de bactérias, sendo muito improvável que uma única espécie bacteriana seja eficaz contra vários tipos de fungos que atacam a madeira (BENKO; HIGHLEY, 1990a).

4.7.3 Indução de Resistência

As coníferas possuem defesas constitutivas e induzidas bem desenvolvidas contra o ataque de inseto e à infecção do patógeno (BERRYMAN, 1972; CHRISTIANSEN et al., 1987). As defesas constitutivas são formadas pelos ductos e vesículas da resina, presentes no floema e no alburno (BERRYMAN, 1972) e de células especializadas do parênquima e floema, ricas em fenol (FRANCESCHI

et al., 1998).

A defesa induzida inclui resposta de hipersensibilidade, provocada por ferimentos ou por infecção do floema, seguido pela acumulação de terpenos e fenóis nas células que cercam o local de ataque e, da formação de zona necrótica (REID et al., 1967; RAFFA, 1991). Os mecanismos de resistência podem ser induzidos através da inoculação de suspensão de culturas, em diferentes espécies de *Pinus* (LESNEY, 1989; CAMPBELL; ELLIS, 1992; HOTTER, 1997).

Em coníferas, a eficácia destas defesas foi pouco demonstrada e estudada por depender de precedente exposição a um patógeno (CHRISTIANSEN et al., 1999). Um dos principais estudos a este respeito foi realizado com os abetos vermelhos da Noruega, *Picea abies* (L.) Karst., onde a resistência induzida foi obtida após pré-tratamento com lesões mecânicas ou após a infecção por patógeno (CHRISTIANSEN et al., 1999; KROKENE et al., 1999); árvores pré-inoculadas com baixas densidades do fungo causador da mancha azul, *Ceratocystis polonica* (Siem.) C. Moreau, bem como com os fungos *Heterobasidion annosum* e *Nectria fuckeliana*, se tornam resistentes a infecções maciças subseqüentes com o fungo *Ceratocystis polonica* (KROKENE et al., 1999; KROKENE et al., 2000).

Ainda trabalhando com *Picea abies*, Krokene et al. (1999) relataram que árvores pré-tratadas com doze feridas mecânicas no córtex (100 x 16 mm) exibiram, em uma faixa de 0,8 m, uma forte resistência à inoculação subseqüente com *C. polonica* (CHRISTIANSEN et al., 1999).

Em outro experimento, utilizando o pré-tratamento com *Heterobasidion annosum* e ágar estéril e medições da colonização fúngica, verificou-se que o pré-tratamento com inoculações fúngica e ágar estéril aumentou a resistência dos abetos vermelhos da Noruega a subseqüente inoculação com *C. polonica* (KROKENE et al., 1999).

Dosagens de idênticas do pré-tratamento demonstraram que inoculações fúngicas tiveram um efeito significativamente mais forte do que com inoculações estéreis - a dosagem fúngica baixa (1/5 da dosagem média) foi tão eficaz quanto à dosagem média de inoculação estéril, ou seja, inoculações fúngicas foram aproximadamente cinco vezes mais eficazes em induzir a resistência do que inoculações estéreis (KROKENE et al., 1999).

A dosagem média de pré-tratamento com *H. annosum* protegeu as árvores eficientemente, reduzindo os sintomas nas hospedeiras em 80% a 97%,

indicando que a proteção oferecida pelo pré-tratamento com *H. annosum* foi, ao menos, tão boa quanto aquela oferecida pelo *C. polonica*. Os resultados experimentais mostram claramente que a resistência ao fungo causador de manchamento *C. polonica* pode ser induzida em abetos vermelhos da Noruega e, que esta resistência induzida segue uma dose-resposta dinâmica, que não é específica ao pré-tratamento fúngico, não é sistêmica e está restrita à área pré-tratada do tronco (KROKENE et al., 1999).

Pesquisas realizadas com clones de árvores da espécie *Picea abies*, com 25 anos e infectadas com o fungo *Ceratocystis polonica*, caracterizaram os mecanismos de defesa dos abetos vermelhos da Noruega. Segundo dados obtidos, a resistência à inoculação maciça subsequente com *Ceratocystis polonica* foi significativamente maior em árvores pré-tratadas, com média de 0,5% do alburno apresentando manchamento, do que em árvores controle intactas, com média de 20,4% do alburno manchado (CHRISTIANSEN; KROKENE, 1999).

Efeitos secundários observados após o pré-tratamento das árvores foram a produção de resina secundária com maior poder fungistático do que a resina pré-formada (CHRISTIANSEN; KROKENE, 1999; SOLHEIM, 1991), provavelmente por conter fenóis e taninos adicionais produzidos por células parenquimáticas do floema (BRIGNOLAS et al., 1995; FRANCESCHI et al., 1998), e, possivelmente, pelas células epiteliais que alinham os dutos traumáticos (CHRISTIANSEN et al., 1999).

Estudos demonstraram que é possível induzir a resistência em *Pinus* sp. através da exposição prévia a patógenos infecciosos, de processos de proteção cruzada, antagonismo entre patógenos e, aquisição sistêmica de resistência; porém, os únicos exemplos bem documentados são o tratamento de sementes e o tratamento foliar de mudas de *Pinus radiata* D. Don (pinus 'Monterey') com ácido 5-clorosalicílico (REGLINSKI et al., 1998) e o tratamento mecânico em *Pinus sylvestris* L. (pinus 'Scot') após inoculação maciça com *Leptographium wingfieldii* Morelet (KROKENE et al., 2000).

O *Pinus contorta* Douglas é resistente ao fungo causador de manchas *Ceratocystis clavigera* Robinson et Davidson e, ao besouro da madeira *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, devido à produção de uma resinose secundária rápida e vigorosa, resultante da maior produção de terpenóides constitutivos (SHRIMPTON, 1973), com níveis elevados de α -pinene e limonene na resina

secundária, contida nos dutos de resina e, que é liberada no momento da infecção/ataque (RAFFA; BERRYMAN, 1983).

Quando esta espécie de *Pinus* é inoculada com *C. clavigera*, através de fragmento de pectina da parede celular da planta hospedeira ou fragmento da parede celular fúngica (chitosan), esta responde produzindo monoterpenos da resina no sítio de infecção ou em extensões maiores, sugerindo que pinus, assim como outros vegetais superiores, possui um mecanismo comum de reconhecimento-defesa (MILLER et al., 1986).

Dez dias após a infecção fúngica, o conteúdo de monoterpenos do tronco oleoresinoso do pinus foi examinado por GLC-MS; foram encontrados aumentos significativos nos níveis de monoterpenos, olefina, α - e β -pineno, 3-careno, e, β -felandreno (CROTEAU et al., 1987), substâncias tidas como tóxicas ao fungo *Ceratocystis clavigera* (RAFFA; BERRYMAN, 1983; SHRIMPTON, 1973).

Embora existam alguns trabalhos na área de indução de resistência em *Pinus* spp., a biosíntese dos terpenóides presentes na resina ainda é mal compreendida, assim como a bioquímica da reação da defesa; os conceitos atuais estão baseados, em sua maior parte, na analogia à produção de terpenóides e de fitoalexinas nas espécies herbáceas (JOHNSON; CROTEAU, 1987).

A falta de informações fundamentais sobre esta defesa é, em parte, resultado das dificuldades encontradas em experimentos com árvores adultas a campo, sistema em que o fenômeno foi descoberto e no qual a maioria das observações deve ser realizada (MILLER et al., 1986).

4.8 OCORRÊNCIA DE EMBOLADORES E MANCHADORES

4.8.1 Relatos em Coníferas e Eucalipto

No Brasil e na África foi relatada a ocorrência de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff et Maubl. como agente causal da mancha azul em madeiras (FOURGEROUSSE, 1958; ENCINAS, 1996), enquanto os fungos *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp., *Paecilomyces* spp. e *Penicillium* spp. foram citados como sendo

emboloradores de madeira (DIX e WEBSTER, 1995).

Já em Gana, os manchadores são representados por *L. theobromae* e *Ceratocystis fagacearum*, embora *Pterygota macrocarpo* também seja relatado como causador de mancha uniforme (APETORGBOR et al., 2004).

Os efeitos prejudiciais dos fungos manchadores são importantes na indústria canadense de produtos florestais, sendo que pesquisas recentes identificaram espécies de *Ophiostoma* como os organismos manchadores mais prevalentes (UZUNOVIC et al., 1999). As espécies *Ophiostoma picea* (Munch) H. & P. Sydow, *O. piliferum* (Fries) H. & P. Sydow, *O. picea-perda* (Rumb.) von Arx. e *O. coerulescens* (Munch) Nannf. foram identificadas como agentes de manchamento (mancha azul) associados ao besouro da casca, na Columbia Britânica, Canadá (SAFRANYIK et al., 1983).

Ophiostoma piceae é a espécie fúngica mais comum na madeira de coníferas, no Canadá (SEIFERT, 1993; UZUNOVIC et al., 1999), possuindo registros também como espécie manchadora do *Pinus banksiana* Lamb. (pinus Jack) (YANG, 2001). *O. minus* é uma espécie comum na América do Norte, sendo capaz de infectar muitas espécies de pinus, assim como o abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) e o abeto verdadeiro (*Abies lasiocarpa*) (FARR et al., 1989; UPADHYAY, 1981).

O fungo *Ceratocystis polonica* (Siemasko) C. Moreau é causador de manchas azuis em madeira (BRIGNOLAS et al., 1995; FRANCESCHI et al., 1998), sendo o fungo mais patogênico associado ao besouro da casca da madeira, *Ips typographus* L.; quando inoculado em doses elevadas pelo besouro, este fungo é capaz de matar árvores saudáveis de abetos (HORNTVEDT et al., 1983; CHRISTIANSEN, 1985b).

Besouros da casca adultos transportam esporos de fungos azuladores no aparelho reprodutor masculino, nos élitros e no trato digestivo (FURNISS et al., 1990). *Ceratocystis polonica*, bem como *Ophiostoma polonicum* Siemasko, é patogênico a abetos vermelhos de Noruega, *Picea abies* (L.) Karst., (HORNTVEDT et al., 1983; CHRISTIANSEN; SOLHEIM, 1990; HORNTVEDT; SOLHEIM, 1991), sendo esta considerada a espécie mais prejudicial de manchador.

A patogenicidade de *Ceratocystis polonica* está baseada em sua habilidade de crescer rapidamente através dos traqueídeos da madeira úmida e de bloquear o transporte da água na árvore, acarretando em níveis elevados de

mortalidade (CHRISTIANSEN, 1985b; KROKENE; SOLHEIM, 1998; SOLHEIM, 1991).

Já o *Ceratocystis eucalypti*, descrito como não-patogênico, pode ser agente de manchamento vascular em *Eucalyptus* spp. (BARNES et al., 2003). Já *C. coerulescens* é um importante fungo manchador de madeiras duras, tais como *Acer* spp., *Quercus* spp. e *Fagus* spp., podendo também ocorrer em espécies de madeira maleável, na América do Norte e na Europa (FARR et al., 1989).

C. pirilliformis e *C. fimbriata* produzem descoloração de rápido desenvolvimento na casca e albarno / floema de árvores, entretanto, a descoloração do primeiro agente está associada a tecidos mais superficiais que do segundo, que é associado ao manchamento vascular (ROUX et al., 2004).

Outra espécie de fungo causador de manchas no albarno é o *Leptographium abietinum* (Peck) Wingfield, que está associado com as galerias do besouro da casca (KENDRICK, 1962; PECK, 1879) e tem sido isolado de besouros em New Hampshire (HARRINGTON, 1988).

4.8.2 Relatos em *Pinus* spp.

No Canadá, os manchadores do pinus Jack têm um importante impacto econômico (UZUNOVIC et al., 1999; YANG, 1999) e, por essa razão, são bem relatados. Em estudo envolvendo várias madeiras moles, foram isoladas treze espécies de manchadores de lenho (de toras e madeira serrada), dentre os quais onze pertencentes aos gêneros *Ceratocystis* e *Ophiostoma*; o mesmo estudo ainda revelou que a diversidade fúngica é maior em toras do que na madeira serrada (UZUNOVIC et al., 1999).

O *Ceratocystis polonica* é agente causal de azulamento na Noruega (WANG, 1983), Escandinávia (CHRISTIANSEN, 1985b; SOLHEIM, 1988; HARDING, 1989; CHRISTIANSEN; SOLHEIM, 1990; KROKENE; SOLHEIM, 1998), na Europa Central (KIRISITS, 1998; KIRISITS et al., 2000) e no Japão (YAMAOKA et al., 2000).

Fungo manchador de madeiras duras *Ceratocystis coerulescens* também tem ocorrido em espécies de madeira maleável na América do Norte e na Europa (FARR et al., 1989), sendo que um número crescente de isolados deste

fungo têm sido encontrado no pinus Jack e em toras de abetos brancos e negros, no Canadá (UZUNOVIC et al., 1999).

Em 1967, Addo-Ashong observou que muitas espécies de madeira de Gana, especialmente as madeiras brancas, são atacadas por fungos azuladores logo após o corte, sendo o mais comumente isolado/encontrado o *Lasiodiplodia theobromae* (OFUSO-ASIEDU, 1973). Na Venezuela, este fungo é o principal agente causal do azulamento em *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* (Barr. e Golf.) (pinus do Caribe), principalmente na parte leste (HODGES; MCFADDEN, 1991; AGRIZONIS, 1992; MOHALI, 1993; ENCINAS, 1996).

O fungo *Sphaeropsis sapinae* (Fr.) Dyko e B. Sutton [sin. *Diplodia pinea* (Desm.) J. J. Kickx, Petr. e Syd.] também é agente causal de azulamento em madeiras de pinus do Caribe, na Venezuela (MOHALI, 1997), além de ser agente do “tip blight” em pinus jovens (HODGES; MCFADDEN, 1991).

O manchador *Ophiostoma minus* H. & P. Sydow (sin. *Ceratocystis minor* (Hedgecock) Hunt) está freqüentemente associado ao ataque de *Dendroctonus frontalis* Zimmerman, em *Pinus taeda* L. (BASHAM, 1970; BRIDGES et al., 1985; COOK; HAIN, 1985). Embora ataque preferencialmente toras, pode também afetar a madeira serrada (UPADHYAY, 1981).

Esta é uma espécie de fungo comum na América do Norte, em especial na costa ocidental. Há relatos de sua ocorrência no Novo México, Califórnia, Yukon, no norte Alaska (UPADHYAY, 1981), na Columbia britânica, em Alberta, em Saskatchewan, em Ontário, em Quebec e, em Novo Brunswick (UZUNOVIC et al., 1999). Além de afeta muitas espécies de pinus (*Pinus* spp.), é capaz de causar infecção no abeto Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) e no abeto verdadeiro (*Abies lasiocarpa*) (FARR et al., 1989; UPADHYAY, 1981).

Este fungo, *Ophiostoma minus*, se desenvolve principalmente no pinus Jack (UZUNOVIC et al., 1999), podendo transformar-se na principal causa de manchamento registrado no Canadá (YANG, 2001).

Ophiostoma piliferum causa mancha na madeira de várias espécies de coníferas e de madeiras duras, sendo encontrado principalmente no Canadá ocidental e central. Esta espécie cresce moderadamente em toras de pinus Jack, embora, em condições naturais, infecte principalmente a madeira serrada (UZUNOVIC et al., 1999).

O tipo selvagem do fungo *O. piliferum*, causador de mancha azul,

geralmente coloniza árvores recém serradas e cepilho de *Pinus resinosa*, causando descoloração do albúno, que deprecia a qualidade da polpa e da madeira (ROFF et al., 1980; SEIFERT, 1993), além de utilizar componentes da resina da madeira (BLANCHETTE et al., 1992; BRUSH et al., 1994; FARRELL et al., 1993; FISHER et al., 1994; WANG et al., 1995).

Embora *O. piliferum* e *O. minus* possam crescer em toras e madeira serrada de pinus Jack (YANG, 1999), *O. piliferum* coloniza mais rapidamente chapas do tipo “wafer” de madeira e, *O. minus* cresce em maior velocidade em billets. Estes dados testados em laboratório suportam o relato de sobrevivência em campo (UZUNOVIC et al., 1999), onde *O. piliferum* é três vezes mais frequentemente na madeira serrada do que em toras, visto que o *O. minus* é oito vezes mais frequentemente em toras do que na madeira serrada (YANG, 2001).

Outras espécies manchadoras importantes em toras de pinus Jack são, respectivamente, *C. coerulescens*, *O. ips*, *O. piceae* e *C. piceaperda*, causadores de uma intensa mancha negra na madeira (YANG, 2001).

Ophiostoma piceae é a espécie fúngica mais comuns na madeira de coníferas, no Canadá (SEIFERT, 1993; UZUNOVIC et al., 1999), possuindo registros como espécie manchadora do pinus Jack (YANG, 2001); esta espécie é considerada patógeno fraco do córtex (BRASIER; KIRK, 1993) e, de patogenicidade moderada em sementes de pinus branco oriental (*Pinus strobus*) (NEVILL; ALEXANDER, 1992).

Como em outras espécies de pinus de crescimento rápido, o *Pinus radiata* produz madeira formada principalmente pelo albúno, que apresenta suscetibilidade às descolorações escuras causadas por fungos manchadores. Em consequência destas descolorações, perdas significativas são incorridas pela indústria de produtos florestais da Nova Zelândia. As principais espécies destes fungos são *O. piliferum*, *Leptographium procerum* e *Sphaeropsis sapinea* (HELD et al., 2003).

Também em pinus do Caribe, da Venezuela, foi identificada a presença do fungo *Diplodia mutila* Fr. apud Mont. como causador de azulamento (MOHALI; ENCINAS, 2001).

Em caixas de madeira de *Pinus* spp. do tipo “K”, utilizadas para o transporte de produtos hortícolas, dois fungos são problemáticos e predominantes, o *Trichoderma harzianum*, que apresentou colônias esverdeadas a amareladas, e

Rhizopus stolonifer, com micélio aéreo abundante de cor esbranquiçada e esporos escuros típicos (DOMSCH et al., 1980). Embora estes dois fungos, predominantes na superfície da madeira de *Pinus* spp., não representem grande ameaça do ponto de vista fitopatológico, causam danos à aparência das caixas, propriamente ditas, além do que, o *Trichoderma harzianum* produz enzimas capazes de degradar celulose, afetando negativamente a qualidade da madeira e a possibilidade de reutilização (HENZ; CARDOSO, 2005).

Besouros de pinus se desenvolvem melhor no interior de tecidos predominantemente infectados com os fungos mutualistas *C. ranaculosus* e *Entomocorticium* sp., enquanto a presença do fungo *O. minus* leva ao desenvolvimento de antagonismo (BARRAS, 1970; 1973).

Raízes de *Pinus taeda* infectadas por fungos pertencentes aos gêneros *Leptographium* Lagerb. & Melin e *Ophiostoma* H. & P. Sydow têm sido amplamente estudadas a respeito com a sua relação com besouros da casca (HARRINGTON, 1988). Entre as espécies isoladas de amostras de raízes encontram-se os manchadores *O. ips*, *L. terebrantis* Barras & Perry e *L. procerum* (Kendr.) Wingfield (OTROSINA et al., 1997); estes fungos geralmente estão associados com os besouros da casca como patógenos ou em associações ocasionais encontradas nas galerias do besouro (HARRINGTON, 1988).

Os relacionamentos patológicos relativo à presença nas raízes e o papel na predisposição do ataque de coníferas pelos besouros ainda não foram estabelecidos para muitos destes fungos, principalmente quanto à associação destes fungos com raízes de pinus e seu possível papel nos processos envolvidos no ataque do besouro do pinus (SPB).

Há ainda, estudos que comprovam a existência de competição diferencial entre fungos manchadores. Essas interações foram elucidadas por Klepzig e Wilkens (1997), com isolados de *O. minus* e *C. ranaculosus* e, entre isolados de *O. minus* e *Entomocorticium* sp.

Tanto em meio artificial, quanto no hospedeiro natural (*Pinus* spp.), os três principais simbiotes do SPB competem pelo hospedeiro e, o vencedor nestas interações competitivas foi, invariavelmente, *O. minus*. Este antagonista de SPB superou ambos mutualistas, apresentando maior capacidade de capturar fontes não-colonizadas do que os outros dois fungos. Isto pode ser devido, em grande parte, à taxa de crescimento mais elevada de *O. minus*.

Informações a respeito dos atuais fungos causadores de mancha em madeira, incidência e prejuízos acarretados por eles, irão ajudar o desenvolvimento de estratégias de controle mais efetivas para a prevenção dos manchadores (YANG, 2001).

5 ARTIGO A – FUNGOS EMBOLORADORES E MANCHADORES DA MADEIRA DE *Pinus* spp. E SEU CONTROLE – UMA ATUALIZAÇÃO

5.1 RESUMO

A pinocultura é de suma importância para a economia brasileira, porém perdas significativas às indústrias madeireiras têm sido observadas decorrentes do processo de biodegradação e de más condições de manejo. Por ser anatômica e quimicamente complexa, a madeira de *Pinus* spp. pode ser colonizada por uma grande diversidade de microrganismos, dentre os quais encontram-se os principais agentes depreciadores do valor estético e comercial da madeira, denominados fungos emboloradores e manchadores. Atualmente são citadas cerca de 130 espécies de fungos causadores da descoloração ou pigmentação do lenho, ocorrendo nas mais diversas espécies vegetais. A adoção de medidas visando à sanidade da madeira é altamente necessária para a garantia de maior durabilidade e economicidade na utilização desses recursos, uma vez que, após terem se instalado na madeira, esses microrganismos apresentam difícil controle. Na presente revisão buscou-se reunir e discutir as informações existentes quanto às características, fisiologia, incidência, manejo e prejuízos causados pelos fungos emboloradores e manchadores, bem como alternativa para o seu controle.

Palavras-chave: Mancha azul. Biodeterioração. Preservação da madeira. Controle biológico.

5.2 ABSTRACT

The *Pinus* spp. culture presents great economic importance to Brazil, however significant losses to the lumber industries have been observed decurrent of the process of biodegradation and harmful handling conditions. By being anatomical and chemically complex, the pinus wood can be colonized by a great diversity of microrganisms, which can depreciated the aesthetic and commercial value of the wood, like mould and stain fungi. Currently, there are about 130 species of fungi

causing discolouration or pigmentation of the log, occurring in the most diverse vegetal species. The adoption of measures aiming at to the health of the wood is highly necessary for the guarantee of durability and economy in the use of these resources, once, after installed in the wood, these microorganisms are difficult to control. In this paper it is assembled and discussed information on the characteristics, physiology, incidence, handling and damages caused by mould and stain fungi, as well alternative controls for its.

Keywords: Blue stain. Biodeterioration. Wood preservation. Biological control.

5.3 INTRODUÇÃO

A introdução do *Pinus* spp., para cultivo no Brasil, ocorreu inicialmente para fins de ornamentação e reflorestamento (PEREIRA, 1987) e, a silvicultura, para fins industriais, teve início na década de 1960, com as espécies *P. elliottii* e *P. taeda* (SHIMIZU, 2005).

Atualmente, o país detém uma área de plantio de cerca de 1.834.569 hectares, localizados nos Estados do Paraná (37%), Santa Catarina (29%), Rio Grande do Sul (10%), São Paulo (10%) e Minas Gerais (10%), que representam 34% (51,4 milhões m³) da matéria prima, oriunda de florestas plantadas, destinada a indústria madeireira (ABRAF, 2006). O país ocupa o sétimo lugar dentre os maiores reflorestadores mundiais (FAO, 2005) e, o setor florestal brasileiro contribui com 5% do PIB Nacional e 7% das exportações, gerando 7,2 milhões de empregos diretos e indiretos, com receita anual de R\$ 20 bilhões (CARVALHO et al., 2006).

A abertura comercial, ocorrida na década de 1990, favoreceu a elevação das importações e exportações e, também, a introdução de pragas exóticas no país (IEDE et al., 2000). Situação idêntica ocorreu na América do Norte e Latina, Europa e Ásia, o que levou à revisão das Normas Internacionais de Medidas Fitossanitárias (NIMF) e a intensificação da fiscalização sobre os produtos importados. Como pragas e patógenos podem estar associadas a suportes e embalagens de madeira, como tonéis, "pallets", caixas e carretéis, a NIMF n°. 15 da FAO preconiza o tratamento destes no local de origem (FAO, 2005).

Com base na Convenção Internacional de Proteção a Vegetais, o Ministério da Agricultura, através da Secretaria de Defesa Agropecuária, instituiu a necessidade da obtenção do Certificado Fitossanitário de Origem (CFO) e do Certificado Fitossanitário de Origem Consolidado (CFOC), quando do transporte de toras e madeira serrada. Estes visam evitar a dispersão das pragas quarentenárias e não quarentenárias regulamentadas em áreas indenens, bem como manter o patrimônio fitossanitário nacional, preservar a competitividade e garantir a credibilidade junto ao mercado nacional e internacional (RITTER, 2000).

Cerca de um terço da madeira produzida é perdida pelo processo de biodegradação, favorecido por más condições de manejo (LIESE, 1975) e, responsável por elevadas perdas econômicas (APETORGBOR et al., 2004). Práticas como retirada e desdobro da madeira devem ser realizadas em até 48 horas após o abate, de modo a evitar-se a ação dos biodegradadores, como fungos denominados “emboloradores” e “manchadores” da madeira. Esses patógenos da madeira de *Pinus* spp., depreciam o valor comercial da madeira, tornando-a inutilizável (JANKOWSKY, 1990a; IDE et al., 2000).

5.4 FUNGOS EMBOLORADORES E MANCHADORES DA MADEIRA DE *Pinus* spp.

Cerca de 130 espécies de fungos causadores de descoloração e pigmentações do lenho tem sido relatada no mundo, ocorrendo em diferentes espécies vegetais (ABRAHAM et al., 1997) e, sob condições favoráveis de temperatura e umidade, a maioria das espécies vegetais é suscetível ao ataque dos fungos xilófagos (SALES-CAMPOS et al., 2000). A maioria das espécies pertence ao grupo Ascomycota, representado pelos gêneros *Ceratocystis*, *Ophiostoma*, *Lasiodiplodia*, *Graphium* e *Diplodia*, colonizadores profundos do lenho (ABRAHAM et al., 1997; DORADO et al., 2000; FURTADO, 2000).

5.4.1 Relatos Mundiais de Pigmentadores da Madeira de *Pinus* spp.

No Brasil e na África foi relatada a ocorrência de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., agente causal da mancha azul (ENCINAS, 1996) e, de *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. e *Paecilomyces* spp., emboloradores e manchadores da madeira de pinus (DIX E WEBSTER, 1995).

No Canadá os fungos manchadores de *Pinus banksiana* Lamb. (pinus Jack), principalmente dos gêneros *Ceratocystis* e *Ophiostoma*, causaram importante impacto econômico (UZUNOVIC et al., 1999; YANG, 1999). Na América do Norte e Europa, diferentes isolados de *Ceratocystis coerulescens* foram encontrados associados ao pinus Jack (UZUNOVIC et al., 1999). *Ophiostoma polonicum* Siemaszko [sin. *Ceratocystis polonica* (Siemaszko) C. Moreau] é relatado como agente causal de azulamento na Noruega (WANG, 1983), Escandinávia (KROKENE E SOLHEIM, 1998), Europa Central (KIRISITS et al., 2000) e Japão (YAMAOKA et al., 2000).

Ceratocystis minor (Hedgc.) J. Hunt [sin. *Ophiostoma minus* (Hedgc.) Syd. & P. Syd.] foi encontrado associado ao pinus Jack (UZUNOVIC et al., 1999) e ao besouro *Dendroctonus frontalis*, em *Pinus taeda* (BRIDGES et al., 1985; COOK e HAIN, 1985). A ocorrência deste fungo é considerada comum na costa ocidental da América do Norte, sendo também relatada nos Estados Unidos, Alaska (UPADHYAY, 1981) e Canadá (UZUNOVIC et al., 1999), onde é tido como a principal causa de manchamento (YANG, 2001). No Canadá, o *Ceratocystis pilifera* também foi encontrado infectando madeira de pinus Jack serrada (UZUNOVIC et al., 1999).

Embora considerado colonizador de toras e madeira serrada, *C. pilifera* pode colonizar rapidamente chapas de compensado do tipo “wafer” e, é cerca de três vezes mais freqüente em madeira serrada. O *C. minor* se associa mais facilmente em “billets” e é cerca de oito vezes mais freqüente em toras. Este fato caracteriza que espécies dentro de um mesmo gênero de fungo manchador atuam de modo diferenciado, em relação ao hospedeiro (YANG, 1999; YANG, 2001).

Outras espécies de manchadores, causadores da mancha negra intensa, são importantes em toras de pinus Jack. Destacam-se o *C. coerulescens*; *Ceratocystis ips* (Rumbold) C. Moreau [sin. *Ophiostoma ips* (Rumbold) Nannf.]

(YANG, 2001), geralmente associados a toras infestadas com *Ips* spp. (UPADHYAY, 1981). O *O. piceae* é considerado patógeno fraco do córtex (BRASIER e KIRK, 1993) e moderado em sementes de *Pinus strobus* (NEVILL e ALEXANDER, 1992).

Na Venezuela, o fungo *Lasiodiplodia theobromae* foi considerado o principal agente causal de azulamento em *Pinus caribaea* var. *hondurensis* (pinus do Caribe) (ENCINAS, 1996), sendo também relatados como promotores de azulamento os fungos *Sphaeropsis sapinea* (MOHALI, 1997) e *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker [sin. *Diplodia mutila* (Fr.) Mont.] (MOHALI e ENCINAS, 2001).

Na Nova Zelândia, perdas consideráveis pela indústria de produtos florestais têm ocorrido devido à suscetibilidade do *Pinus radiata* às descolorações escuras, causadas principalmente por espécies de fungos manchadores como *Ceratocystis pilifera*, *Leptographium procerum* e *Sphaeropsis sapinea* (HELD et al., 2003). Em caixas de madeira empregadas no transporte de produtos hortícolas, os fungos *Trichoderma harzianum* e *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. são predominantes e problemáticos (DOMSCH et al., 1980) pelo dano visual que causam. O *T. harzianum* produz ainda enzimas degradadoras da celulose, as quais alteram a qualidade da madeira e limitam sua reutilização (HENZ e CARDOSO, 2005).

5.4.1.1 Fungos emboloradores

Dentre os emboloradores encontram-se os fungos mitospóricos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*; microrganismos cosmopolitas, saprófitas, com esporulação abundante e, facilmente disseminada pelo ar. Estes causam mancha superficial de aspecto pulverulento, pela presença de massa de esporos, comprometendo principalmente o aspecto visual do lenho. As colorações mais comuns são cinza, verdes e amarelas (FURTADO, 2000).

Embora se desenvolvam na superfície da madeira, as hifas conferem um aspecto algodado à madeira e, quando hialinas podem penetrar profundamente no alburno, sem alterar a cor da mesma. Nutrem-se de substâncias de reserva solúveis, como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, presentes no lúmen celular, as quais extravasam a partir de células parenquimatosas danificadas pelo corte, sem afetar a parede celular e a resistência mecânica da madeira

(FURTADO, 2000).

Entretanto, pode-se correlacionar a incidência dos emboloradores com a redução da resistência ao impacto (SCHEFFER, 1973) e aumento da permeabilidade, o que prejudica a absorção de preservativos e favorece o apodrecimento, no caso de umedecimento da madeira (OLIVEIRA et al., 1986).

5.4.1.2 Fungos manchadores

Geralmente o manchamento é causado por fungos colonizadores pioneiros, destacando-se os pertencentes aos gêneros *Ceratocystis*, *Diplodia*, *Graphium*, *Lasiodiplodia*, *Leptographium*, *Ophiostoma* e *Sphaeropsis* (FARRELL et al., 1993; WANG et al., 1995), sendo mais freqüentes em toras e madeira recém serradas, antes ou após a secagem e, no período de armazenamento. Comumente são encontrados em árvores senescentes ou atacadas pela vespa da madeira (*Sirex noctilio*) e, pouco prevalentes em árvores vivas e saudáveis (TALBOT, 1977).

Para o processo de penetração na madeira, dependem de aberturas naturais existentes entre as células e do rompimento mecânico das membranas das pontuações; entretanto, alguns são capazes de penetrar a parede celular mecanicamente, pela formação de apressórios. Nas coníferas, as hifas colonizam exclusivamente as células do parênquima radial, onde se nutrem de carboidratos, ácidos graxos, triglicerídeos e outros componentes presentes no lúmen celular, sendo raramente observadas nos traqueídeos (FARRELL et al., 1993; WANG et al., 1995; FURTADO, 2000).

A presença de hifas pigmentadas pela melanina e compostos similares (ZIMMERMAN et al., 1993) e de hifas hialinas secretoras de substâncias coloridas nas células da madeira (BLANCHETTE et al., 1992) são responsáveis pela pigmentação do alburno. Essa pigmentação pode ser observada em cortes transversais e distribuída radialmente e, em cores variáveis do azul ao cinza escuro (OLIVEIRA et al., 1986). Essas alterações no alburno de *Pinus* spp. manchado podem reduzir a resistência em 1 a 2%; a dureza entre 2 a 10%; a resistência à flexão em 1 a 5% e, a resistência ao impacto em 15 a 30% (SCHEFFER, 1973; OLIVEIRA et al., 1986); também levam a madeira apresentar maior permeabilidade, restringindo sua utilização (FURTADO, 2000).

Embora não sejam considerados importantes comprometedores das propriedades de força e resistência, nos estágios adiantados de colonização a descoloração diminui o valor da madeira para serraria e fabricação de papel (SEIFERT, 1993). Assim, é fundamental a avaliação dos danos provocados pelos manchadores, bem como das perdas econômicas decorrentes do ataque desses agentes, em toras estocadas nas indústrias madeireiras (HANADA et al., 2003).

5.4.1.3 Fungos azuladores

Dentre os fungos manchadores, existe um grupo denominado “azuladores” ou “blue stain fungi”, que se caracterizam pela pigmentação produzida na madeira, com cores variáveis entre o azul e preto. São colonizadores pioneiros de madeira recém serrada e, causam perdas econômicas elevadas, devido a alterações na qualidade estética em toras, produtos manufaturados e papéis de alta qualidade (BLANCHETTE et al., 1992; SEIFERT, 1993). Além de colonizarem diretamente as extremidades do lenho, podem invadir sua lateral, tendo como portas de entrada galerias abertas por insetos transportadores de fungos manchadores (HARRINGTON, 1988 e 1993).

Espécies de fungos dos gêneros *Ophiostoma*, *Lasidiopodia* e *Ceratocystis* (BEHRENDT et al., 1995a), dentre outros, são representantes importantes. Estes podem utilizar componentes da resina (FARRELL et al., 1993) e aumentar a absorbância da madeira, fazendo com que esta passe a absorver mais cola, tinta ou preservativos de madeira, além de tornarem a madeira mais suscetível à colonização por fungos deterioradores devido ao aumento da porosidade (HIGHLEY, 1999; FURTADO, 2000).

Como exemplo, temos o tipo selvagem de *Ceratocystis pilifera* (Fr.) C. Moreau [sin. *Ophiostoma piliferum* (Fr.) Syd. & P. Syd], causador de mancha azul, que geralmente coloniza árvores recém serradas e cepilho de *Pinus resinosa*, descolorando o albarno e depreciando a qualidade da polpa e da madeira (SEIFERT, 1993).

5.4.2 Mecanismo de Ação dos Fungos Emboloradores e Manchadores

A colonização da madeira por emboloradores e manchadores leva a descoloração ou manchamento da madeira devido a produção e deposição de metabólitos secundários, os grânulos de melanina (BRUCE et al., 2003; DOGRA e BREUIL, 2004). Este fator deprecia o valor comercial da madeira, seja na forma "in natura", móveis ou "pallets" (BEHRENDT et al., 1995b; JANKOWSKY, 1990a).

A colonização pode ser por organismos pioneiros, como fungos manchadores e emboloradores, a exemplo de *Trichoderma* spp., os quais colonizam árvores recém-abatidas pelo fato destas disponibilizarem elevada quantidade de substâncias de reserva para nutrição e, elevada umidade (OLIVEIRA et al., 1986). Os colonizadores secundários, como a maioria dos Basidiomycetes, são responsáveis pela remoção de extratos da madeira ou compostos tóxicos (KÄÄRIK, 1975), embora existam Basidiomycetes, como *Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jülich, que colonizam preferencialmente o alburno fresco, degradando a resina e outros extratos da madeira (BEHRENDT e BLANCHETTE, 1997).

A distinção entre emboloradores e manchadores inicialmente é feita com base na profundidade da descoloração; geralmente ambos encontram-se confinados em grande extensão do alburno e, produzem coloração variada. Os manchadores penetram profundamente no alburno, não são removidos pelo aplainamento, e as manchas apresentam-se orientadas radialmente, no sentido das fibras da madeira. Os emboloradores, embora penetrem profundamente, acarretam em manchas superficiais e em forma de cunhas torneadas (pie-shaped wedges), podendo ser removidas através de escovação ou aplainamento (FURTADO, 2000; HIGHLEY, 1999).

Estes também podem ser distinguidos com base na atividade enzimática fúngica, a qual diferencia os principais grupos fisiológicos dos diversos nichos ecológicos existentes na madeira, sem distinção de grupos taxonômicos. Portanto, o real discernimento, se determinado fungo provoca bolor ou mancha na madeira, nem sempre é prática fácil e, na maioria dos casos, há necessidade de estudos histológicos (KÄÄRIK, 1975).

No alburno das coníferas a descoloração é resultante da colonização das células parenquimáticas e penetração nos traqueídeos (BALLARD et al., 1984).

E, pode ocorrer completa cobertura do alburno ou se desenvolver na forma de manchas, pontuações, estrias ou ainda sinais com tamanhos variáveis e com diferentes intensidades de cor, dependendo do tipo e padrão de crescimento superficial (HIGHLEY, 1999; FURTADO, 2000). A cor exata e a extensão das manchas podem variar com a espécie do agente infeccioso e a umidade da madeira (HIGHLEY, 1999).

5.4.3 Associação entre Fungos Manchadores e Insetos-praga

Na maioria das vezes, a infecção da madeira por fungos manchadores é precedida da invasão da casca da região lateral da árvore por besouros agressivos, principalmente dos pertencentes aos gêneros *Ips*, *Dendroctonus* e *Tomicus*, os quais podem inocular simultaneamente uma ou mais espécies de microrganismos manchadores diretamente no xilema e floema (BEHRENDT et al., 1995a; KIRISITS e OFFENTHALER, 2002).

A habilidade destes besouros para transportar esporos facilita a dispersão dos emboloradores e manchadores, o desenvolvimento de manchas vasculares e, a interrupção do suprimento de água para a planta (YAMAOKA et al., 2000; SOLHEIM et al., 2001; KIRISITS e OFFENTHALER, 2002). Facilitam ainda o estabelecimento de pragas secundárias, devido à redução da resistência da árvore; os manchadores podem ainda estarem envolvidos no processo de morte da árvore (PAINE et al., 1997; LIEUTIER, 2002).

5.4.4 Mensuração da Infecção por Emboloradores e Manchadores

Diferentes ferramentas estão disponíveis para o estudo das interações patógeno-planta hospedeira, bem como de determinar o efeito da infecção (natural ou artificial) de coníferas por fungos manchadores, monitorar estes efeitos no funcionamento do alburno e, comparar a patogenicidade desses fungos. Dentre estes se encontram os métodos como a mensuração do fluxo da seiva pelo caule (WANG, 1983; YAMAOKA et al., 1990) e, métodos não-destrutivos, como o teste de condução de corante (CHRISTIANSEN, 1992), aplicação de marcador

radioativo (^{82}Br) (WANG, 1983) e método de termo-dissipação (GRANIER, 1985).

5.4.5 Tratamento da Madeira

A prevenção e/ou controle dos causadores de emboloramento/manchamento, em madeira serrada, pode se dar através da redução da umidade natural da madeira (JANKOWSKY, 1990a); emprego de ar quente forçado; pelo calor, em estufas de secagem ou ao ar livre; alterações do pH com nitrato de acrílico (BEHRENDT et al., 1995b; FAO, 2006; MORESCHI, 1998); saturação de toras pela aspersão de água, privando os fungos da quantidade mínima de oxigênio necessária para seu desenvolvimento (IDE et al., 2000) e, aplicação de preservativos, a exemplo do brometo de metila, creosoto, pentaclorofenol, CCA (cromo, cobre e arsênio), CCB (cromo, cobre e boro) e FCAP (flúor, cromo, arsênio e fenóis) (JANKOWSKY, 1990b).

Porém, o tratamento químico da madeira com preservativos apresenta como desvantagens o custo elevado, o que torna inviável o tratamento de peças grandes e de grandes quantidades; geração de defeitos no lenho, devido ao ressecamento e, problemas de ordem legal, por serem altamente biocidas (ABRAHAM et al., 1997).

Tradicionalmente o controle de manchadores, pelas indústrias madeireiras, têm sido realizado com produtos químicos anti-manchas, entretanto a toxidez e os efeitos ambientais desses alertaram para a necessidade da busca de métodos alternativos para o controle (HELD et al., 2003). Entretanto, o desenvolvimento de estudos e metodologias ainda é escasso, sendo um dos fatores responsáveis pela falta de informações a respeito dos microrganismos que infectam a madeira (HANADA et al., 2003).

5.4.6 Controle Biológico dos Fungos Manchadores da Madeira de *Pinus* spp.

Inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos buscando viabilizar o emprego do controle biológico de fungos manchadores. Os agentes potenciais para biocontrole são as bactérias e filtrados de suas culturas (BENKO e HIGHLEY, 1990b).

e c; HIGHLEY et al., 1991; JIN e MORRELL, 1996) e fungos ou filtrados desses (CROAN e HIGHLEY, 1991; KREBER e MORRELL, 1993; YANG, 1998).

Produtos biológicos para o uso comercial como preventivos ainda são escassos (BRUCE et al., 2003), provavelmente devido à falta de maiores conhecimentos quanto ao efeito dos biocontroladores no impacto ambiental (MORRELL e DAWSON-ANDOH, 1998); dos mecanismos pelos quais atuam como biocontroladores dos emboloradores e manchadores (BRUCE et al., 2003) e, das dificuldades para determinação do papel da pigmentação e do mecanismo de produção e trajetória da melanina, no próprio fungo e na madeira (LOPPNAU et al., 2004).

Entende-se que para o emprego do biocontrole pela indústria madeireira, são necessárias experimentações e períodos de adequações, uma vez que o período de armazenagem das toras deve ser menor (de dois a três meses) e, o tratamento realizado quase que imediatamente após o corte (HELD et al., 2003).

O pré-tratamento de blocos de madeira, com bactérias, leveduras e fungos, tem sua eficiência reconhecida através da redução significativa da colonização pelos emboloradores e manchadores (PAYNE et al., 2000). Essa situação gera a necessidade de uma busca sistemática no sentido de isolar e identificar novas cepas potenciais para essa prática (DORADO et al., 2000).

Como fungos avaliados como agentes de controle podem alterar a madeira e mesmo pigmentar a polpa (CROAN, 1996), as pesquisas têm sido direcionadas para a obtenção e emprego de cepas não pigmentadas dos próprios manchadores. Esta estratégia pode ser considerada como ideal, pois estes organismos são ecologicamente compatíveis com manchadores, podendo ocupar o mesmo nicho (FARRELL et al., 1998), colonizar rapidamente o substrato e, resistirem à substituição nos sítios por outras espécies; e, o mais importante, não afetam as propriedades estéticas da madeira nem apresentam efeito nocivo ao ambiente (LEE et al., 2002). Essas cepas albinas podem ser obtidas a partir de isolados de espécies nativas e agressivas de manchadores, evitando assim a introdução de cepas de outras partes do mundo, para áreas não-indenes (HELD et al., 2003).

O biocontrole dos azuladores com cepas fúngicas de *Gliocladium roseum* Bainier, *Hypocrea gelatinosa* (Tode) Fr., *Nectria cinnabarina* (Tode) Fr., *Trichoderma viride* Pers., *Trichoderma polysporum* (Link) Rifai e *Tympanis* sp. foi

investigado por Seifert, sob condições de laboratório, em blocos de pinus Jack, com bons resultados (SEIFERT, 1993). Também o emprego de cepas incolores de *Ophiostoma* spp. para o controle de agentes pigmentadores do lenho foram bem sucedidas (BLANCHETTE et al., 1992; FARRELL et al., 1993).

Cepas albinas de *Ophiostoma piceae* (Münch) Syd. & P. Syd. (sin. *Ophiostoma floccosum* Math.-Käärrik) e *Ceratocystis pluriannulata* (Hedgc.) C. Moreau [sin. *Ophiostoma pluriannulatum* (Hedgc.) Syd. & P. Syd] mostraram serem bons biocontroladores de fungos manchadores, como *Leptographium procerum* (W. B. Kendr.) M. J. Wingf., *Ceratocystis pilifera* e *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton [sin. *Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx f.], em *Pinus radiata*.

As cepas de *Ophiostoma piceae* apresentaram grande porcentagem de isolados realizando total controle dos manchadores e, outras com controle mediano, onde a madeira apresentava apenas leve coloração. *Ceratocystis pluriannulata* também mostrou ser excelente biocontrolador de fungos manchadores escuros (BEHRENDT et al., 1995 a e b; BLANCHETTE et al., 1997; HELD et al., 2003).

Quando inoculado em toras de *Pinus resinosa* imediatamente após o corte, o *Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jülich atuou como biocontrolador, assegurando extensa colonização da madeira e proteção por quatro a doze semanas; melhora da eficiência do processamento da madeira, através da degradação da resina; aumentou a porosidade da parede celular e, inibiu a colonização e o desenvolvimento dos fungos prejudiciais e manchadores selvagens. Contribuiu ainda para acelerar o processo de remoção dos besouros da madeira (BEHRENDT e BLANCHETTE, 1997).

Atualmente, o controle biológico efetivo de manchadores de madeira pode ser realizado através do tratamento destas com o produto comercial denominado Cartapip-97TM (Sandoz Chemicals Corporation, Charlotte, N. C.), cujo agente é um isolado não-pigmentado de *Ophiostoma piliferum* (Fries) Sydow e Sydow. Essa coloniza rapidamente a madeira não-estéril, competindo com sucesso com os manchadores e inibindo os isolados selvagens. Não apresenta alteração detrimental aparente da madeira recém serrada ou de toras tratadas, em campo (BLANCHETTE et al., 1997; FARRELL et al., 1993; BEHRENDT, 1994).

Dorado et. al. (2000) obtiveram uma cepa de *Pestalotiopsis crassiuscula* Steyaert promissora para o biocontrole e com eficiência comparada ao

comercial Cartapip-97TM, quanto à redução do extrato contido no alburno de pinus 'Scot' (de 76-97%), porém mais eficiente na degradação dos ácidos resiníferos (61%) e esteróis (53-54%).

Um dos problemas práticos, quando do emprego de cepas fúngicas no biocontrole de pigmentadores do lenho, é a necessidade de se realizar a inoculação da madeira imediatamente ao corte e, a falta de conhecimentos a respeito da influencia de fatores ambientais no controle sob condições de campo (BEHRENDT et al., 1995b). Também o curto período de eficácia das cepas, pois períodos maiores que seis meses são considerados extremamente longos para a cobertura (BEHRENDT et al., 1995a; HELD et al., 2003), o que gera a necessidade do desenvolvimento de métodos melhorados de inoculação e aplicação, tendo em vista uma melhor cobertura e aderência às toras (HELD et al., 2003).

Além de fungos, espécies de bactérias também podem ser empregadas no biocontrole. Para que estas sejam efetivas contra uma ampla gama de agentes manchadores e emboloradores, há a necessidade de avaliações envolvendo o emprego de diferentes combinações bacterianas (BENKO e HIGHLEY, 1990a). Dentre as bactérias, os principais gêneros investigados para o controle dos manchadores e emboloradores são *Pseudomonas* e *Bacillus* (BENKO, 1989; KREBER e MORRELL, 1993).

Resultados positivos foram obtidos quando do tratamento de blocos de madeira de pinus com uma mistura de seis bactérias (*Pseudomonas cepacia*, *Streptomyces chrestomyceticus*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces rimosus* subsp. *paromomycinus*, *Streptoverticillium cinnamoneum* subsp. *azacoluta* e *Xenorhabdus luminescent*) para o controle de *Ceratocystis coerulescens* (Münch) B. K. Bakshi (C-262) e do *Trichoderma harzianum* Rifai.

Blocos tratados com o "pull" bacteriano apresentaram apenas minúsculos pontos individuais manchados ou embolorados, enquanto as testemunhas encontravam-se pesadamente manchadas (BENKO e HIGHLEY, 1990a e c). Sob condições de laboratório, blocos de madeira de pinus Jack tratados com *Pseudomonas cepacia* apresentaram resultados satisfatórios, porém o mesmo não foi observado sob condições de campo (BENKO, 1989).

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fungos emboloradores e manchadores do alburno de *Pinus* spp. constituem-se como um dos principais problemas para as indústrias de madeiras de corte e de produção de manufaturados, mundial e nacionalmente (BRUCE et al., 2003).

Conhecimentos quanto à realidade desses microrganismos, incidência e prejuízos causados, podem favorecer ao desenvolvimento de estratégias de controle mais efetivas para a sua prevenção (YANG, 2001), pois a adoção de medidas que garantam a sanidade de madeiras é altamente necessária para a maior durabilidade e economicidade na utilização desses recursos (FURTADO, 2000), além de auxiliarem a preservação do meio ambiente.

6 ARTIGO B – COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS E ELABORAÇÃO DE PROTOCOLO PARA ISOLAMENTO DE FUNGOS EMBOLORADORES E MANCHADORES DA MADEIRA DE *Pinus* spp.

6.1 RESUMO

Agentes biodeterioradores, como fungos emboloradores e manchadores de madeira de *Pinus* spp. podem acarretar perdas econômicas para a indústria madeireira, pois estes influenciam principalmente o valor estético da madeira. Como os estudos envolvendo pigmentadores do alburno de *Pinus* spp. ainda são recentes no Brasil, estão sendo utilizados um grande número de metodologias de isolamento e de avaliação da capacidade de pigmentação da madeira de pinus, sem que seja estabelecido uma metodologia padrão. Com a finalidade de estabelecer um protocolo para o isolamento de fungos emboloradores e manchadores e avaliação da pigmentação causada por estes agentes na madeira de *Pinus* spp., em condições brasileira, foram avaliadas diferentes metodologias. Através deste estudo foi possível observar como melhor método para a recuperação dos agentes causais de pigmentação do lenho a assepsia através da imersão de fragmentos de madeiras sintomáticas em álcool 70%, seguido de água-destilada estéril, por dois minutos e, o uso do meio de cultura extrato de malte-ágar 3%, com incubação a 22 °C (± 2 °C) durante 10 dias. Para comprovação da capacidade de pigmentar a madeira, observou-se que a inoculação dos isolados fúngicos em corpos de prova de *Pinus* spp. e, avaliação, aos 30 dias da inoculação, da capacidade de colonização do fungo sobre a madeira, através do emprego da Escala de manchamento de Benko e Highley (1990c) e, do grau de manchamento, segundo a Escala de notas proposta por Held et al. (2003), é uma metodologia que pode ser empregada em estudos.

Palavras-chave: Mancha. Assepsia. Meio de cultura. Colonização. Pigmentação.

6.2 ABSTRACT

Biodeterioration agents, as mold and sapstaining fungi of *Pinus* spp., can cause economic losses for the wood industry, therefore these has influence in the aesthetic value of the wood. As the studies involving mold and staining of the sapwood of *Pinus* spp. still are recent in Brazil, a great number of methodologies of isolation and evaluation of the capacity of staining the pinus wood are being used, without a established standard to be followed. With the purpose to establish a protocol for the isolation of mold and sapstain fungi and for the evaluation of the pigmentation caused by these agents in the pinus wood, in Brazilian conditions, different methodologies were avaluated. Through this experiment was possible to observe as better method for the recovery of the causal agents of staining of the log the asepsis by the immersion of pieces of symptomatic wood in alcohol 70%, followed by steril water, per two minutes and, the use of the culture media malt extract 3%, with incubation at 22 °C (± 2 °C) during 10 days. For evidence of the capacity to stain the wood, it was observed that the inoculation of fungi isolated in blocks of *Pinus* spp. and, evaluation, after 30 days of the inoculation, of the capacity of the fungi colonization on the wood, through the Scale of staining by Benko and Highley (1990c), and of the degree of staining, according to the Note scale by Held et al. (2003), it is a methodology that can be used in studies.

Keywords: Stain. Asepsis. Culture medium. Colonization. Pigmentation.

6.3 INTRODUÇÃO

A madeira de *Pinus* ssp. apresenta destaque na produção comercial, juntamente com o Eucalipto, por ser leve e de crescimento rápido, podendo ser cultivada em grande densidade populacional (RICHARDSON, 1998; FARJON, 1984). Atualmente existem no Brasil cerca de dois milhões de hectares reflorestados com *Pinus* spp., a maior parte encontra-se em alta densidade populacional e sob regime de manejo inadequado, fatores favorecedores de surtos de doenças e pragas (IEDE et al., 2000). Por este motivo, indústrias madeireiras e de processamento

devem estar atentas para a ocorrência de agentes biodeterioradores, principalmente fungos e bactérias, os quais podem gerar perdas econômicas consideráveis (APETORGBOR et al., 2004).

A pigmentação do lenho é um problema de ocorrência em âmbito internacional, sendo causada por fungos comumente denominados emboloradores e manchadores (ABRAHAM et al., 1997; JANKOWSKY, 1990b). A infecção do *Pinus* spp., por estes, pode ocorrer antes do abate ou nas etapas posteriores, como durante o corte, transporte, desdobramento, armazenamento e, utilização final (FURTADO, 2000).

A descoloração provocada por emboloradores geralmente apresenta-se com aspecto difuso ou pulverulento na superfície da madeira, enquanto a provocada por manchadores pode ocorrer na forma de manchas, pontuações, estrias, ou sinais (HIGHLEY, 1999). Mesmo causando poucos danos aos elementos estruturais da madeira, estes agentes depreciam o seu valor estético (BRUCE et al., 2003) e, constituem-se como um dos principais problemas para indústrias madeireiras de corte e de produção de manufaturados (BEHRENDT et al., 1995a; BRUCE et al., 2003; LEE et al., 2002).

Embora estudos sobre fungos emboloradores e manchadores da madeira de *Pinus* spp. estejam em fase avançada na Venezuela, América do Norte e Europa, no Brasil ainda são recentes. Dentre os problemas que dificultam a aquisição de conhecimentos em torno do assunto, encontra-se o grande número de metodologias utilizadas pelos autores para o isolamento e avaliação da capacidade de pigmentação da madeira de pinus, sem o estabelecimento de um padrão a ser seguido. Pela revisão de literatura observa-se a existência e o emprego de diferentes metodologias para o isolamento de fungos emboloradores e manchadores; dentre elas podem ser citadas o isolamento direto, através de fragmentos de madeira sintomática e, o indireto, com o auxílio da fricção do swab sobre material sintomático; assepsia da madeira através da imersão do material em água destilada estéril, hipoclorito de sódio, hipoclorito de sódio e água destilada estéril e, álcool 70%; e, plaqueamento em diferentes meios de cultura, como extrato de malte-ágar a 2 e 3%; batata dextrose ágar (BDA) e, ágar-água; com incubação para isolamento dos fungos sob temperaturas entre 20 a 30 °C, por períodos que variam entre cinco e trinta dias (HANADA et al., 2003; YANG, 2004; KREBER et al., 2001; ALEMÁN B. et al., 2003).

Tendo em vista estabelecer um protocolo para o isolamento de fungos emboloradores e manchadores e, avaliação do grau de pigmentação do alburno de *Pinus* spp. por estes agentes, em condições brasileiras, foram avaliadas diferentes metodologias.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1 Levantamento de Madeira de *Pinus* spp. Apresentando Manchas e/ou Emboloramento

Nos locais de armazenamento de madeira e, após uma prévia avaliação visual, foram coletadas amostras de toras e madeiras serradas (submetidas ou não a secagem), apresentando alterações na coloração natural da madeira, típicas de fungos emboloradores e manchadores, proveniente do Estado do Paraná (Fig. 6.1).

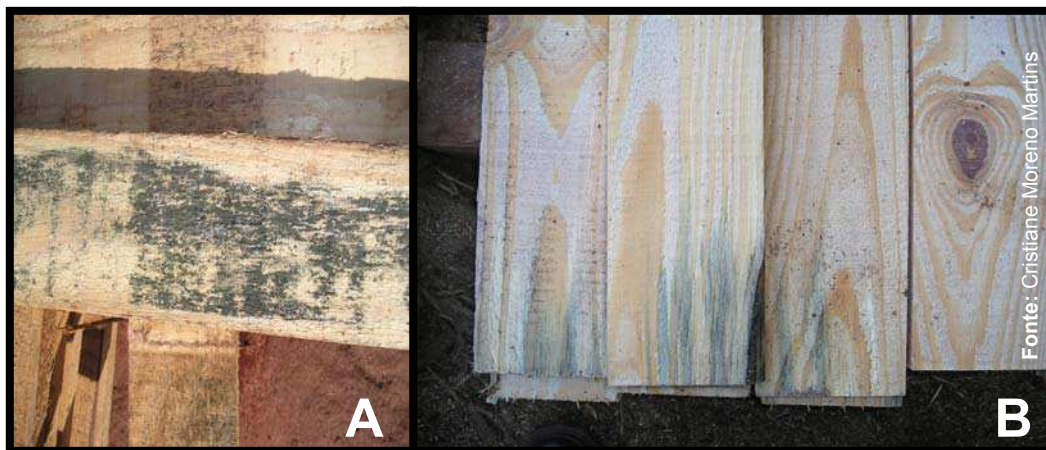


Figura 6.1 – Madeira de *Pinus* spp. serrada apresentando alterações na coloração natural: sintomas de emboloramento superficial (A) e manchamento do alburno (B).

Para as avaliações em laboratório e isolamento dos agentes causais dessas alterações, corpos de provas com dimensões de 5 x 5 x 2 cm foram retirados das amostras coletadas, com o auxílio de uma serra (Fig. 6.2), acondicionados em sacos de papel tipo “kraft”, identificados e levados para ambiente de laboratório de Fitopatologia, da Universidade Estadual de Londrina.

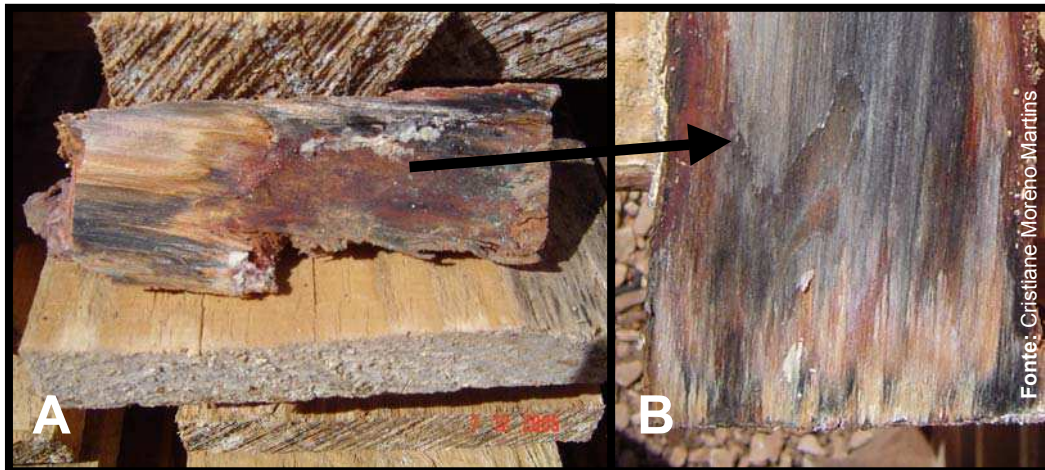


Figura 6.2 – Remoção dos corpos de prova de madeiras apresentando sintomas típicos de manchamento, para o isolamento do agente causal da pigmentação (A). Em detalhe, corpo de prova (B).

6.4.2 Definição da Metodologia a Ser Empregada no Isolamento dos Fungos Emboloradores e Manchadores da Madeira de *Pinus* spp.

Na busca da metodologia mais apropriada para a recuperação dos fungos emboloradores e manchadores a partir da madeira de *Pinus* spp., foi realizado um experimento prévio.

6.4.2.1 Método de assepsia

Para a definição do melhor método de assepsia, procedeu-se a retirada, com auxílio de uma serra manual, de cinco corpos de prova com dimensões de 5 x 5 x 2 cm, a partir de amostras do alburno de toras e madeiras serradas sintomáticas provenientes do Paraná. Estes foram submetidos a quatro diferentes métodos de assepsia: (a) desinfecção superficial através da aspensão de álcool 70%; (b) imersão em água destilada estéril, por dois minutos; (c) imersão em álcool 70%, seguido por lavagem em água destilada esterilizada, ambos por dois minutos; (d) imersão em solução de hipoclorito (20 ml de hipoclorito de sódio comercial em 100 ml de água destilada estéril), seguido de lavagem em água destilada estéril, por dois minutos.

Após esta etapa os corpos de prova foram dispostos sobre papel de filtro estéril, para retirada do excesso de água. Como testemunha foram utilizados corpos de prova não submetidos aos métodos de assepsia citados.

Na seqüência, com o auxílio de um estilete, pequenos fragmentos (1,5 x 1 cm) foram retirados dos corpos de prova e, depositados no centro de placas de Petri sobre o meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) (Fig. 6.3) e incubados durante dez dias sob temperatura ambiente. Para cada método de assepsia foram avaliadas dez repetições.

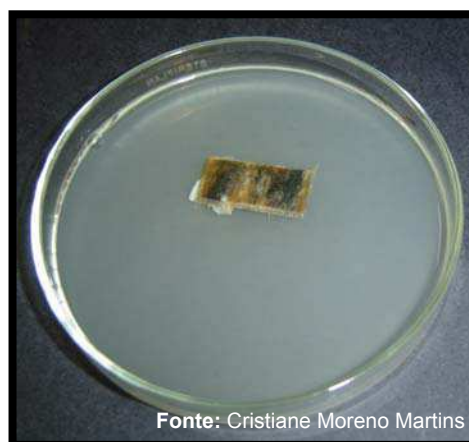


Figura 6.3 – Fragmento retirado de corpo de prova sintomático e plaqueado em meio de cultura BDA.

Ao final do período de incubação, avaliou-se a presença de crescimento fúngico sobre o meio de cultura e fragmento da madeira. Das colônias desenvolvidas procedeu-se o isolamento para placas de Petri contendo meio BDA, com incubação em câmara de crescimento tipo BOD, a 22 °C (± 2 °C), sob fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias (Fig. 6.4). Após o desenvolvimento das colônias, procedeu-se a repicagem para tubos de ensaio com meio BDA.

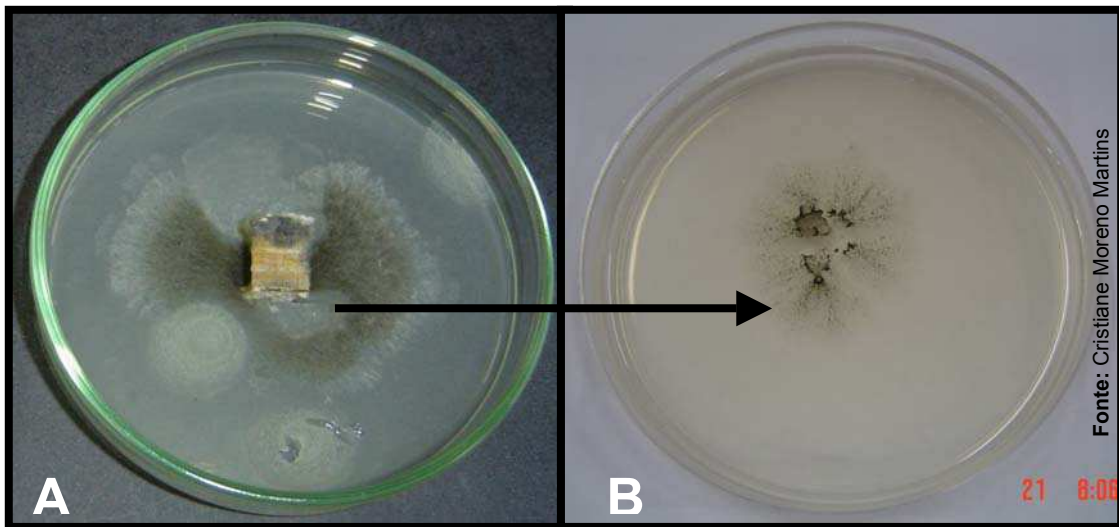


Figura 6.4 – Crescimento fúngico sobre meio de cultura BDA e fragmento de madeira, após incubação por 10 dias (A). Isolamento das colônias, em meio de cultura BDA (B).

Na definição do método de assepsia mais eficiente para isolamento de fungos emboloradores e manchadores da madeira de *Pinus* spp., os isolados obtidos foram inoculados em corpos de prova de madeira de *Pinus* spp. assintomáticas, verificando a repetição dos sintomas. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SISVAR versão 4.6 e os resultados obtidos foram comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

6.4.2.2 Meios de cultura

Na determinação do melhor meio de cultura para isolamento de fungos emboloradores e manchadores da madeira de *Pinus* spp., corpos de prova retirados das amostras de campo foram submetidos a assepsia através da imersão em álcool 70%, seguido por imersão em água destilada estéril, por dois minutos. Após, fragmentos com dimensões de 1,5 x 1 cm retirados desses corpos de prova foram plaqueados ao centro de placas de Petri contendo os meios de cultura: (a) meio de Martin modificado (WARCUP, 1955); (b) meio batata dextrose ágar (BDA); (c) meio extrato de malte-ágar 3%; (d) meio ágar-água acidificado (pH 4,5) e, (e) meio de extrato de tomate.

Para cada meio de cultura foram avaliadas dez repetições, cada uma constituída por uma placa. A incubação foi a temperatura de ambiente de

laboratório, sendo que 50% das placas permaneceram sob presença de luz e 50% em escuro contínuo, durante dez dias. Exceção para o meio de Martin, no qual as placas foram incubadas somente no escuro, uma vez que este meio contém Rosa de Bengala, o qual se torna fungicida quando exposto à luz.

Após a incubação, os microrganismos fúngicos desenvolvidos nos meios de cultivo e/ou sobre os fragmentos de madeira foram isolados em meio de cultura BDA, incubados em câmara de crescimento a temperatura de 22 °C (\pm 2 °C) e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias.

Conforme descrito no ensaio anterior, os isolados obtidos foram re-inoculados em corpos de prova de *Pinus* spp., para comprovação da sua patogenicidade, verificada através da reprodução dos sintomas. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SISVAR versão 4.6 e os resultados obtidos foram comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

6.4.2.3 Inoculação em blocos de *Pinus* spp. e isolamento dos agentes causais

Para comprovar que os isolados de fungos obtidos através dos isolamentos descritos nos dois ensaios anteriores (itens 6.4.2.1 e 6.4.2.2) são agentes causais das pigmentações observadas nos corpos de prova, procedeu-se a inoculação dos mesmos em blocos de *Pinus* spp. assintomáticos, para verificação da reprodução ou não dos sintomas observados inicialmente e, realização de novos isolamentos.

Blocos de *Pinus* spp. medindo 5 x 4 e 2,5 cm de espessura foram previamente perfurados em dois pontos eqüidistantes com o auxílio de furadeira, tendo cada orifício 0,8 mm de diâmetro e 1,25 cm de profundidade. Após, foram imersos em álcool 70% e, em seguida, em água destilada estéril, ambos por 2 minutos, e depositados sobre folhas de papel filtro estéril para retirada do excesso de água (Fig. 6.5).

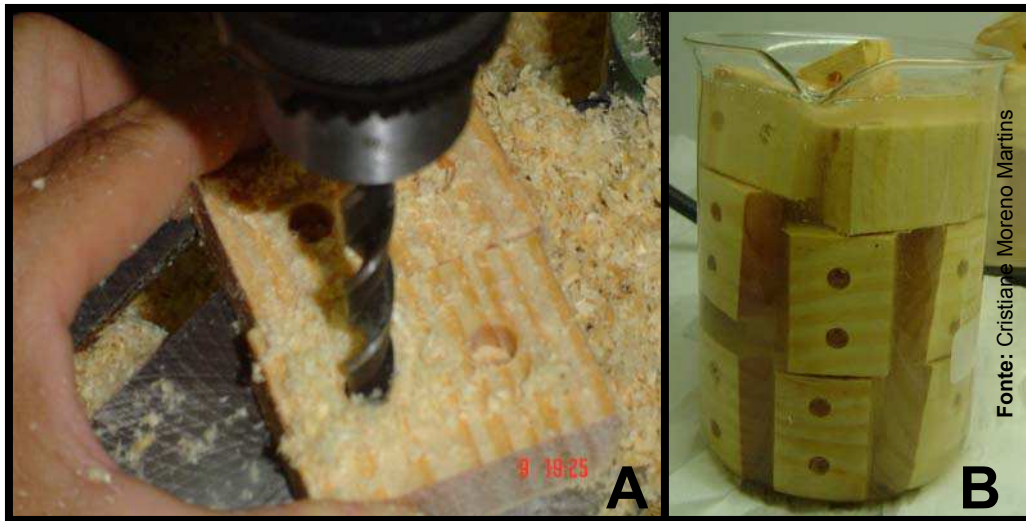


Figura 6.5 – Confeção dos blocos de madeira de *Pinus* spp. (A). Assepsia dos blocos através da imersão em álcool 70% (B).

Na inoculação, dois discos de micélio, com aproximadamente 0,8 cm de diâmetro, de cada isolado foram retirados de colônias desenvolvidas durante sete dias em meio BDA e depositados em cada orifício dos blocos e, em seguida vedados com filme plástico de PVC, para evitar contaminação externa (Fig. 6.6). Todo o processo descrito acima foi realizado sob condição de câmara de fluxo laminar, para evitar possíveis contaminações. Para cada isolado foram realizadas quatro repetições e, os blocos testemunha receberam apenas discos do meio de cultura, sem crescimento fúngico.

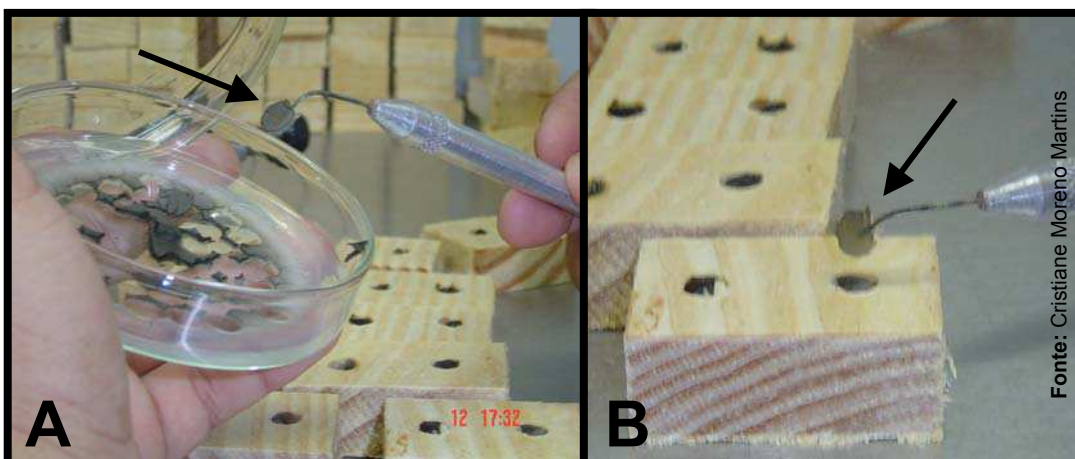


Figura 6.6 – Discos de micélio sendo inoculados nos orifícios dos blocos de madeira de *Pinus* spp. (A). Detalhe da inoculação dos discos de micélio (B).

A incubação dos blocos foi sob condições e temperatura de laboratório. Na avaliação, constatou-se a presença ou ausência do crescimento dos

fungos, bem como das alterações da coloração das fibras, através da realização de leituras periódicas. Decorridos 30 dias da inoculação, os blocos foram analisados externamente para verificar a presença ou não de bolores. Após essa avaliação, os blocos foram seccionados longitudinalmente (no sentido da espessura) e, procedeu-se a visualização da presença de manchas ou escurecimento interno da madeira.

Quando constatada a presença de emboloramento ou manchamento, pequenos fragmentos dessas áreas apresentando alterações foram retirados, submetidos à assepsia e transferidos para o meio de cultura BDA. Ao quarto dia de incubação, a 22 °C (± 2 °C) sob fotoperíodo de 12 horas, foram confeccionadas lâminas, coradas com azul de algodão, das colônias crescidas e, as estruturas avaliadas sob microscópio óptico. Nos casos em que os fungos obtidos eram semelhantes (de mesma espécie) aos obtidos inicialmente, no isolamento do material sintomático coletado a campo, estes foram considerados como agentes causais da alteração da madeira.

6.4.3 Comparação da Eficiência e da Praticidade entre as Escalas de Notas Propostas para a Avaliação do Emboloramento e Manchamento

Dentre as escalas de notas existentes para a realização das avaliações do percentual do câmbio colonizado e, do grau de emboloramento e manchamento da madeira, encontram-se: a escala de notas de Yang (1999), utilizada para a avaliação da presença ou ausência de pigmentação na colônia e de alterações no meio de cultura (Tabela 6.1); a escala de Horsfall-Barrett (CAMPBELL e MADDEN, 1990) (Tabela 6.2) e a escala de notas descrita por Henz e Cardoso (2005) (Tabela 6.3), ambas utilizadas para a mensuração da superfície de madeira colonizada por fungos emboloradores e manchadores; a escala proposta por Benko e Highley (1990c) (Tabela 6.4), que combina o grau de superfície embolorada ou manchada e a superfície colonizada pelos agentes e, a escala de notas proposta por Held *et al.* (2003), que avalia a coloração do crescimento micelial e da madeira (Tabela 6.5).

Tabela 6.1 – Escala de notas descrita por Yang (1999)

Nota	Superfície Manchada
0	Não pigmentada
1	Pigmentação leve
2	Pigmentação moderada
3	Pesadamente pigmentada

Tabela 6.2 – Escala de Horsfall-Barrett, para percentual de câmbio colonizado por fungos pigmentadores da madeira

Notas	Porcentual do Câmbio Colonizado
0	0%
1	0-3%
2	3-6%
3	6-12%
4	12-25%
5	25-50%
6	50-75%
7	75-88%
8	88-94%

Tabela 6.3 – Escala de notas descrita por Henz e Cardoso (2005)

Nota	Superfície Colonizada por Fungos
0	Sem crescimento
1	Crescimento em até 10% da superfície da madeira
2	Crescimento sobre 11 a 50% da superfície
3	Mais de 51% da superfície colonizada

Tabela 6.4 – Escala de Manchamento proposta por Benko e Highley (1990c)

Notas	Sinais e Manchas
0	<u>Sem mancha</u> sem sinais visíveis de manchamento ou fungos na superfície
1	<u>Madeira ligeiramente manchada</u> pontos minúsculos e individuais, com diâmetro máximo de 2 milímetros
2	<u>Madeira moderadamente manchada</u> ao menos um terço da superfície manchada ou com manchas em linhas em até um meio da superfície; mancha e/ou fungos cobrindo ao menos um terço e até metade da superfície
3	<u>Madeira pesadamente manchada</u> mais de um meio da superfície manchada; mancha e/ou mofos cobrem mais da metade da superfície

Tabela 6.5 – Escala de notas proposta por Held et al. (2003) com modificações, para avaliação da coloração do crescimento micelial e da madeira

Notas	Coloração Micelial e da Madeira
1	Micélio branco e madeira não-manchada
2	Micélio escuro (do cinza ao negro) e madeira ligeiramente cinza
3	Micélio escuro e madeira tendendo ao cinza
4	Micélio escuro e madeira cinza escuro
5	Micélio negro e madeira enegrecida
6	Micélio do amarelo ao marrom e madeira amarelada
7	Micélio variando do vermelho ao roxo e madeira tendendo ao rosa/roxo
8	Micélio em tons de verde e madeira esverdeada

Neste experimento, para a avaliação do emboloramento e do manchamento em madeira de *Pinus* spp. e comparação da eficiência e da praticidade das escalas, foram selecionadas três diferentes gêneros de fungos emboloradores (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp.) e três de fungos manchadores (*Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Lasiodiplodia* sp.).

Ao sétimo dia de cultivo dos isolados em placa de Petri com meio de cultura BDA, foram realizadas avaliações quanto a presença ou ausência de pigmentação da colônia e de alterações do meio de cultura, através da visualização do crescimento micelial e da produção de exudatos coloridos no meio, conforme a escala de notas de Yang (1999). E, após 30 dias da inoculação dos blocos de madeira de *Pinus* spp. com isolados de emboloradores e manchadores, conforme descrito no item 6.4.2.3, foi realizada a mensuração da superfície de madeira colonizada, segundo escalas de Horsfall-Barrett e escala de notas descrita por Henz e Cardoso; o grau de superfície manchada e a coloração do crescimento micelial e da madeira, através das escalas a escala proposta por Benko e Highley e escala de notas proposta por Held et al., sendo para isso os blocos analisados externamente e, após, partidos no sentido da espessura e observados longitudinalmente. Todas as avaliações foram realizadas com quatro repetições.

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.5.1 Levantamento de Madeira de *Pinus* spp. Apresentando Manchas e/ou Emboloramento

No levantamento de madeiras pigmentadas, provenientes de diferentes localidades do Estado do Paraná, foi observada elevada incidência de madeiras (de 10 a 30%) de *Pinus* spp. apresentando sintomas típicos de emboloramento e manchamento, principalmente naquelas recém-serradas empilhadas e estocadas à sombra (Fig. 6.7). Oliveira et al. (1986) e Apetorgbor et al. (2004) salientaram que, madeiras recém-serradas mantidas em locais com temperatura entre 20 e 30 °C e, que mantenham a alta umidade natural da madeira, são rapidamente colonizadas por agentes biodegradadores, devido à presença de grande quantidade de substâncias de reserva.

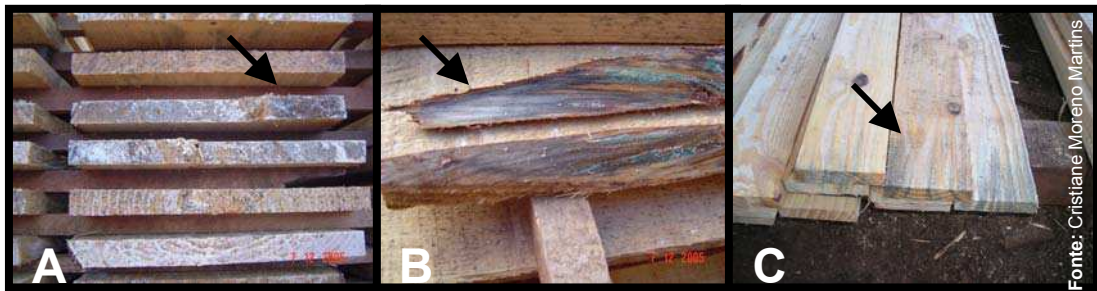


Figura 6.7 – Madeiras de *Pinus* spp. apresentando sintomas de emboloramento (A e B) e manchamento (B e C), estocadas em serrarias do Estado do Paraná.

6.5.2 Definição da Metodologia a Ser Empregada no Isolamento dos Fungos Emboloradores e Manchadores da Madeira de *Pinus* spp.

6.5.2.1 Método de assepsia

Os dados obtidos mostram que a metodologia mais eficaz para a assepsia e isolamento de ambos agentes causais, emboloradores e manchadores, foi a imersão dos corpos de prova em álcool 70% seguido pela imersão em água destilada estéril, por dois minutos, o qual permitiu a recuperação de 29,5% do total dos fungos emboloradores obtidos e, 31,8% dos fungos manchadores. Outro método de assepsia que se destacou foi a imersão dos blocos de madeira em solução de hipoclorito, recuperando 24,5% e 22,9% respectivamente.

As técnicas de desinfecção superficial com álcool 70% e imersão em água destilada estéril foram os menos eficientes, com resultados inferiores ao obtido através do isolamento realizado a partir dos corpos de prova não submetidos à assepsia, utilizados neste teste como testemunhas.

A partir dos corpos de prova, retirados de amostras de madeira de *Pinus* spp. coletadas a campo, foram realizados assepsia dos corpos de prova (imersão em álcool 70%), plaqueamento de fragmentos sintomáticos em meio de cultura BDA, isolamento de cada microrganismo desenvolvido e, inoculação em blocos de madeira previamente desinfestados; ao final deste processo, observou-se que, após a incubação dos blocos inoculados, foram recuperados 61 isolados de fungos emboloradores e 74 isolados de fungos manchadores, totalizando assim 135 agentes causais de pigmentação do lenho de *Pinus* spp. (Tabela 6.6).

Tabela 6.6 – Número de isolados crescidos em meio BDA a partir de quatro diferentes metodologias de assepsia dos corpos de prova de *Pinus* spp.

Método de Assepsia	Emboloradores*	Manchadores*
Desinfecção superficial com álcool 70%	10 bc B	12 bc A
Imersão em água destilada estéril	8 c B	9 c A
Imersão em álcool 70%	18 a B	23 a A
Imersão em solução de hipoclorito	15 ab B	17 ab A
Sem assepsia	10 bc B	13 bc A
CV (%)	29,17	29,88
DMS	0,55	0,68
TOTAL DE ISOLADOS	61	74

* Valores totais seguidos pela mesma letra minúscula no sentido vertical e maiúscula no sentido horizontal não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 1% de significância.

6.5.2.2 Meios de cultura

Após o teste preliminar, que indicou como método de assepsia mais eficaz para o isolamento de fungos pigmentadores do lenho a imersão dos corpos de prova em álcool 70% seguido pela imersão em água destilada estéril, foi realizado um ensaio com materiais provenientes do Estado do Paraná, com a finalidade de escolher qual o meio de cultura mais adequado para o isolamento destes microrganismos.

Através dos isolamentos e inoculações em blocos de *Pinus* spp. para a confirmação da patogenicidade, foram obtidos 111 fungos pigmentadores do lenho de *Pinus* spp., sendo que destes 61 eram agentes causais do emboloramento e 50 do manchamento (Tabela 6.7).

Tabela 6.7 – Número de isolados de fungos emboloradores e manchadores recuperados de madeira de *Pinus* spp. em cinco diferentes meios de cultura

Meios de Cultura	Isolados Emboloradores**	Isolados Manchadores**
Meio de Martin modificado*	8 cd A	7 b B
Meio batata dextrose ágar (BDA)	16 b A	12 b B
Meio extrato de malte-ágar 3%	25 a A	21 a B
Meio ágar-água acidificado	2 d B	4 b A
Meio de extrato de tomate	10 bc A	6 b B
CV (%)	34,78	50,07
DMS	0,6578	0,8273
TOTAL DE ISOLADOS	61	50

* Foram confeccionadas 10 placas de Petri com Meio de Martin e, estas foram incubadas somente no escuro. ** Valores totais seguidos pela mesma letra minúscula no sentido vertical e maiúsculas no sentido horizontal não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 1% de significância.

O meio de cultura mais eficiente para o isolamento de ambos agentes causais foi o de extrato de malte-ágar 3%, o qual permitiu a recuperação de 40,9% do total dos emboloradores e 42% dos manchadores; o segundo meio mais eficiente foi o BDA, com 26,2% e 24%, respectivamente; seguido do meio de extrato de tomate, com recuperação de 16,3% dos emboloradores e 12% dos manchadores; o meio de Martin, por 13,1% e 14% e, o meio de ágar-água acidificado foi menos eficiente, com apenas 3,2% e 8%, respectivamente (Fig. 6.8).

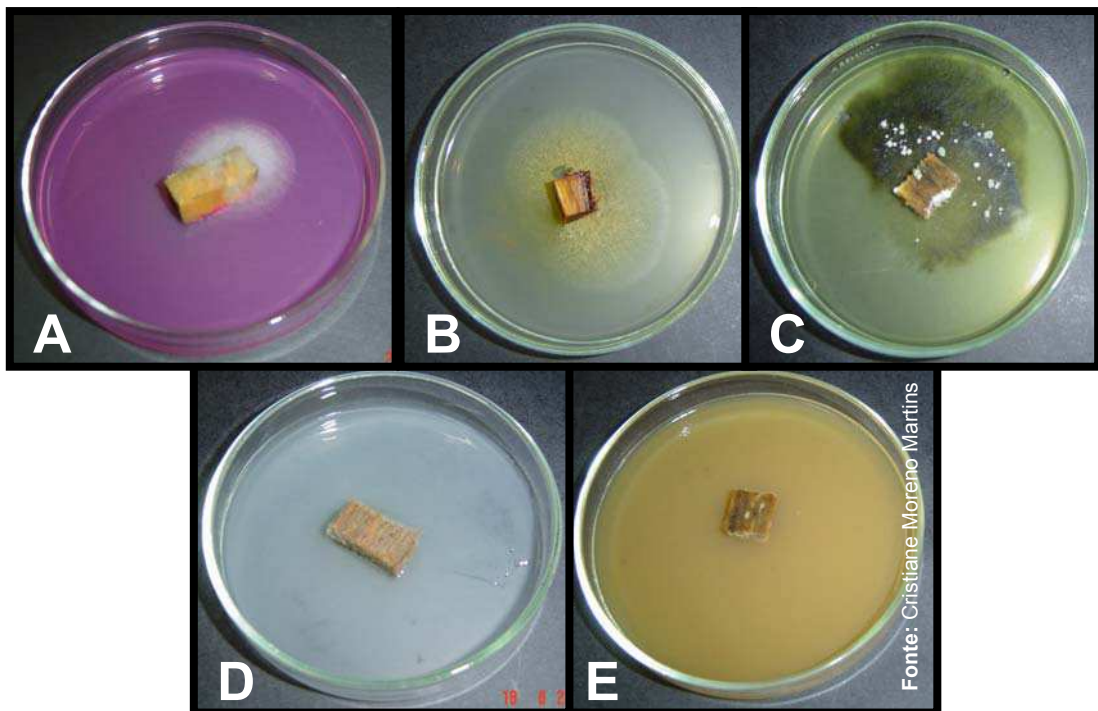


Figura 6.8 – Fragmentos de corpos de prova plaqueados em meio de Martin (A), BDA (B), extrato de malte-ágar 3% (C), ágar-água acidificado (D) e extrato de tomate (E), incubados durante dez dias, para isolamento de fungos manchadores e emboloradores da madeira de *Pinus* spp.

O meio de cultura extrato de malte-ágar 3% foi, então, considerado padrão, por garantir melhores resultados no isolamento de emboloradores e manchadores, para as condições em que foi realizado este trabalho. Como 67,2% dos fungos emboloradores e 58% dos fungos manchadores foram obtidos em condições normais, expostos a períodos alternados de claro e escuro, elegeu-se o fotoperíodo de 12 horas como melhor (Fig. 6.9).

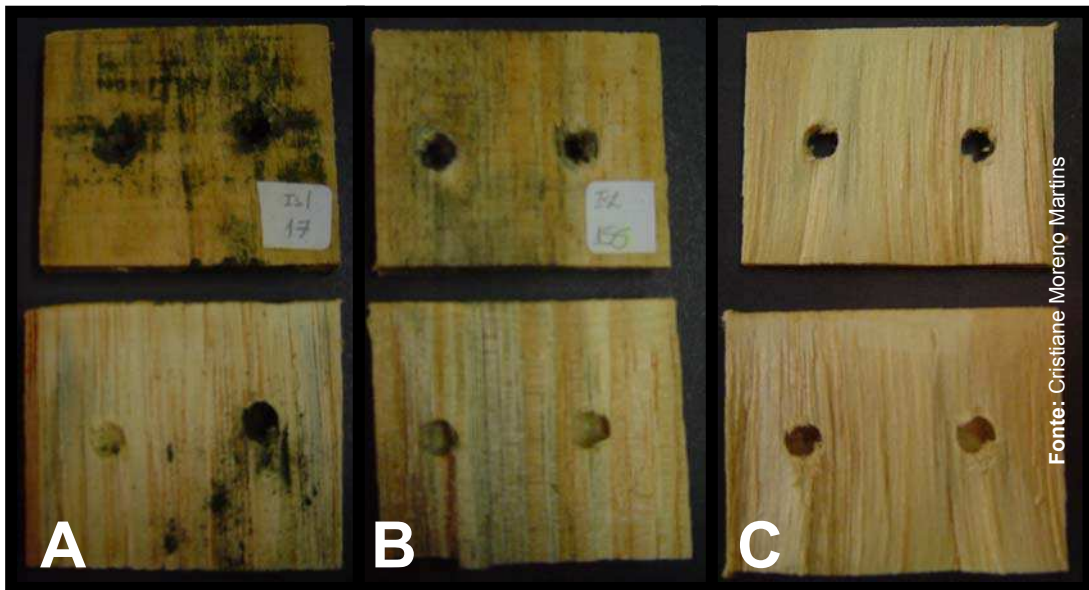


Figura 6.9 – Blocos de madeira de *Pinus* spp. inoculados com fungos, apresentando sintomas de emboloramento (A) e manchamento (B). Testemunha não inoculada (C).

Os resultados obtidos permitem indicar como assepsia mais eficaz a imersão dos corpos de prova em álcool 70% seguido por imersão em água destilada estéril, por dois minutos; como meio de cultura, o extrato de malte-ágar 3% e, para a incubação de fungos manchadores e embolorados, quer em placas ou inoculadas na madeira de *Pinus* spp., o fotoperíodo de 12 horas; estes resultados servem como base para a elaboração de um protocolo eficiente para o isolamento dos fungos emboloradores e manchadores a partir da madeira de *Pinus* spp.

6.5.3 Comparação da Eficiência e da Praticidade de Escalas de Notas para a Avaliação do Emboloramento e Manchamento

Com base na avaliação de três diferentes gêneros de fungos emboloradores (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp.) e três manchadores (*Fusarium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Lasiodiplodia* sp.), crescidos em meio de cultura BDA, verificou-se que a presença de pigmentação da colônia e as alterações do meio de cultura, observados no verso das placas, não são caracteres determinatórios para a classificação de fungos, quer como agentes de emboloramento ou manchamento, o que leva a concluir que a escala de notas descrita por Yang (1999) não deve ser o único parâmetro empregado quando da

classificação de fungos emboloradores e manchadores da madeira de *Pinus* spp. Entretanto, esta pode ser útil quando da diferenciação entre isolados de fungos previamente reconhecidos como causadores de pigmentação do lenho.

A escala de Horsfall-Barrett (CAMPBELL e MADDEN, 1990), embora apresente uma escala bem definida, o que possibilita distinguir os diferentes percentuais de câmbio colonizado e, baseado neste, a definição de quais cepas são mais ou menos agressivas dentro de uma mesma espécie, possui valores (em percentuais) difíceis de serem distinguidos a olho nú. Para que o uso desta escala não leve a erros experimentais, exige-se que a avaliação seja realizada por pesquisador bem preparado e experiente, ou então através de software de computador, capaz de digitalizar a imagem dos blocos sintomáticos e calcular precisamente a área colonizada pelos fungos emboloradores e manchadores.

As escalas de notas propostas por Henz e Cardoso (2005) e Benko e Highley (1990c) são próximas à escala de Horsfall-Barrett, entretanto estas são simplificadas e mais fáceis para emprego em grandes experimentos. Outra vantagem da escala de Benko e Highley é que ela correlaciona a superfície colonizada pelos fungos com a área da madeira que apresenta pigmentação, permitindo a classificação da madeira em não manchada e ligeiramente, moderadamente ou pesadamente manchada.

A escala de notas proposta por Held *et al.* (2003), a qual avalia a coloração do crescimento micelial e da madeira é extremamente útil. Embora tendo como ponto negativo a necessidade de se desenvolver o agente causal em meio de cultura e inocular na madeira, verificando assim a produção ou não sintomas, ela indica precisamente se o fungo em avaliação é ou não agente causal de pigmentação do lenho e, auxilia na classificação da coloração da madeira, caráter estes não mencionado em outras escalas (Tabela 6.8).

Tabela 6.8– Avaliação de fungos emboloradores e manchadores da madeira de *Pinus* spp., segundo escalas de notas existentes para determinação do grau de pigmentação de placas e madeiras, superfície colonizada e da coloração do micélio e da mancha induzida na madeira

Gêneros	Notas					
	Yang		Horsfall- Barrett	Henz e Cardoso	Benko e Highley	Held <i>et al.</i>
	Placa ¹	Bloco ²				
<i>Aspergillus</i> sp.	0	2	4	2	3	3
<i>Penicillium</i> sp.	0	2	4	2	2	8
<i>Trichoderma</i> sp.	1	3	6	3	3	8
<i>Fusarium</i> sp.	3	3	6	3	3	7
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	3	3	7	3	3	5
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1	3	8	3	3	3

¹ – Placas de Petri contendo meio de cultura BDA

² – Blocos de madeira de *Pinus* spp. assintomáticos

Conclui-se, pelas avaliações, que as escalas de Benko e Highley e de Held et al., quando utilizadas em conjunto, podem ser as mais indicadas para a determinação de um fungo como agente causal de pigmentação do lenho de *Pinus* spp., ou na avaliação de experimentos onde se pretende caracterizar o emboloramento/manchamento e diferenciar isolados, pelo fato de tornarem as avaliações do experimento mais fáceis, práticas e seguras.

6.5.4 Protocolo para Isolamento de Fungos Emboloradores e Manchadores da Madeira de *Pinus* spp.

6.5.4.1 Objetivos

Estabelecer os procedimentos utilizados para o isolamento fungos emboloradores e manchadores, a partir de amostras sintomáticas de madeira de *Pinus* spp., e padronizar o uso de escalas de notas para a avaliação da capacidade da colonização e pigmentação da madeira por estes agentes, em condições brasileiras.

6.5.4.2 Material necessário

Reagentes

- Álcool comercial diluído 70%
- Ágar
- Ágar bacteriológico
- Água destilada estéril
- Água do cozimento de batata filtrada (250 g de batata para 1 l de água)
- Dextrose
- Extrato de malte
- Glucose
- Peptona
- Solução de hipoclorito (100 ml de água destilada para 20 ml de hipoclorito comercial)

Outros

- Alça de platina;
- Balança;
- Becker de 500 ml e de 1 l;
- Câmara de crescimento;
- Corante azul de algodão
- Etiqueta de identificação;
- Estilete
- Filme plástico de PVC;
- Fluxo laminar;
- Furadeira;
- Lâmina
- Lamínula
- Madeira de *Pinus* spp. sintomática;
- Microscópio óptico
- Óleo de imersão
- Papel filtro estéril
- Pinça;
- Proveta de 500 ml;
- Régua de 15 cm
- Sacos de papel Kraft;
- Serra para madeira ou formão;
- Blocos de *Pinus* spp. com 5 x 4 x 2,5 cm de espessura;
- Placas de Petri contendo meios de cultura extrato de malte-ágar 3% e BDA.

6.5.4.3 Procedimento

Isolamento do agente causal de emboloramento ou manchamento

1. A partir de toras ou madeira serrada de *Pinus* spp. apresentando alterações na coloração natural, demarque uma área sintomática livre de sujeiras e contaminantes;
2. Com o auxílio de uma serra ou formão, retire desta área corpos de prova de aproximadamente 5 x 5 x 2 cm;
3. Acondicione as amostras em sacos de papel tipo Kraft, identificando a procedência do material, sintomas encontrados e data da coleta;
4. Em fluxo laminar, mergulhar o corpo de prova em álcool 70% e, após, em água destilada estéril à temperatura ambiente, por 2 minutos;
5. Com o auxílio de uma pinça, depositar o corpo de prova sobre folhas de papel filtro estéril, para retirar o excesso de água;
6. Após secos, retirar dos corpos de prova pequenos fragmentos de aproximadamente 1,5 x 1 cm da área sintomática, com o auxílio de um estilete estéril;
7. Depositar o fragmento no centro de uma placa de Petri contendo meio de cultura extrato de malte-ágar 3%;
8. Incubar o material em câmara de crescimento a 22 °C (\pm 2 °C), sob fotoperíodo de doze horas, durante dez dias;
9. Após o período de incubação, com o auxílio de uma alça de platina estéril, realizar a repicagem das colônias, crescidas sobre o meio de cultura e sobre o fragmento de madeira, individualmente para placas de Petri contendo o meio BDA;
10. Incubar o material durante sete dias, a 22 °C (\pm 2 °C) e fotoperíodo de doze horas;
11. No sexto dia de incubação do material isolado, proceder à confecção de blocos de madeira assintomática de *Pinus* spp. (dar preferência para madeiras recém-serradas). Para isso, cortar pequenos blocos com 5 x 4 x 2,5 cm de espessura e, com o auxílio de uma furadeira, perfurar dois pontos equidistantes, com 0,8 cm de diâmetro e 1,25 cm de profundidade;

12. Em fluxo laminar, realizar a assepsia destes blocos através da imersão em álcool 70%, seguido de água destilada estéril em temperatura ambiente, por 2 minutos e, em seguida, depositá-los sobre folhas de papel filtro estéril;
13. Manter os blocos em fluxo laminar, sobre luz ultravioleta, pelo período de oito a dez horas;
14. Inocular dois discos de micélio de aproximadamente 0,8 cm de diâmetro, provenientes de isolado cultivado em meio BDA por sete dias, em cada um dos orifícios do bloco de madeira, tendo o cuidado de manter o micélio voltado para o interior dos orifícios;
15. Vedar os orifícios com filme plástico de PVC, para evitar contaminação externa, e identificar os blocos com o código do isolado inoculado;
16. Incubar os blocos em condições de laboratório de fitopatologia, a temperatura ambiente, por 30 dias;
17. Após este período, analisar o bloco externamente e internamente (utilizar serra para partir os blocos no sentido longitudinal), visando verificar a presença de fungos emboloradores ou manchadores ou a presença de emboloramento ou manchamento;
18. Caso seja constatada a presença de bolor ou de manchador, repetir os passos descritos nos itens 4 a 8;
19. Após a incubação durante quatro a sete dias, dependendo da velocidade de crescimento do fungo em questão, confeccionar lâminas com azul de algodão, glicerina ou água e álcool para a visualização em microscópio óptico;
20. Comparar o isolado obtido com o primeiro isolado, obtido através do isolamento de madeira de *Pinus* spp. sintomática coletada a campo;
21. Caso os dois isolados apresentem as mesmas características, ou seja, pertençam à mesma espécie, esta então é considerada agente causal do sintoma observado (fungo embolorador ou manchador).
22. Se necessário determinar a extensão da área colonizada pelo fungo ou área embolorada/manchada, utilizar a Escala de Manchamento proposta por Benko e Highley (1990c), caso deseje classificar o agente causal ou a pigmentação através da coloração produzida, utilize a Escala de notas proposta por Held et al. (2003).

6.6 CONCLUSÕES

O método mais eficaz para o isolamento de fungos emboloradores e manchadores do lenho de *Pinus* spp., em condições brasileiras, são assepsia do material sintomático através da imersão em álcool 70%, seguido por lavagem em água destilada esterilizada, por dois minutos; plaqueamento de fragmentos de madeira em meio extrato de malte-ágar 3% e, incubação a 22 °C (± 2 °C) por 10 dias.

Para a avaliação da capacidade de colonização do fungo sobre a madeira e da capacidade de pigmentação, isolados de fungos pigmentadores devem ser inoculados em corpos de prova de *Pinus* spp. e, após 30 dias, avaliados através da Escala de Manchamento de Benko e Highley (1990c) e da Escala de notas proposta por Held et al. (2003).

7 ARTIGO C- OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS EMBOLORADORES E MANCHADORES DA MADEIRA DE *Pinus* spp. NOS ESTADOS DO PARANÁ, SANTA CATARINA E SÃO PAULO.

7.1 RESUMO

Fungos emboloradores e manchadores causam pigmentação na madeira devido à presença de esporos pigmentados e hifas pigmentadas ou hialinas, que secretam substâncias coloridas; a presença desse tipo de alteração na madeira de *Pinus* spp. pode acarretar em perdas econômicas para a indústria madeireira, pois estas diminuem o valor estético e comercial de toras utilizadas para a produção de madeira serrada e de papel. Com o objetivo de verificar a ocorrência de fungos emboloradores e manchadores, através de uma busca sistemática por madeiras sintomáticas em pátios de serrarias localizadas nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, foi realizado o isolamento em meio extrato de malte-ágar, a identificação e caracterização destes agentes causais e, avaliações quanto à coloração e a superfície de madeira pigmentada. A partir do material coletado foram obtidos 165 agentes causais da pigmentação do lenho, sendo 87 isolados causadores de emboloramento e 78 causadores de manchamento. Após a averiguação dos principais gêneros, com base na incidência, foram identificados os emboloradores *Trichoderma* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp.; e, os manchadores *Epicoccum* spp., *Fusarium* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Paecilomyces* spp. e *Pestalotiopsis* spp.

Palavras-chave: Azulamento. Isolamento. Teste de patogenicidade. *Penicillium*. *Trichoderma*. *Fusarium*. *Lasiodiplodia*. *Pestalotiopsis*.

7.2 ABSTRACT

Mold and stain fungi causes pigmentation in the wood due to presence of pigmented or hyalines spore and hyphas, that can eliminate colorful substances; the presence of these alterations in the pinus wood can cause economic losses for the wood industry,

therefore it diminishes the aesthetic and commercial value of the logs used for the production of sawed wooden and paper. With the objective to verify the occurrence of mold and staining fungi, through a systematic search for symptomatic wood in garth of wood industry of the States of Paraná, Santa Catarina and São Paulo, was carried through the isolation and the identification of the causal agents of staining and evaluations of the potential of coloration and molding in the wood surface. From the collected material, 165 causal agents of the pigmentation of the log were obtained, being 87 isolated causers of mold and 78 causers of stain. After this, based on the incidence, the mold genera *Trichoderma*, *Penicillium* and *Aspergillus* and, the stain genera *Epicoccum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Paecilomyces* and *Pestalotiopsis* were identified.

Keywords: Blue stain. Isolation. Patogenicity test. *Penicillium*. *Trichoderma*. *Fusarium*. *Lasiodiplodia*. *Pestalotiopsis*.

7.3 INTRODUÇÃO

Existem aproximadamente 130 espécies de fungos causadores de pigmentação do lenho, usualmente denominados fungos emboloradores e manchadores (ABRAHAM et al., 1997; JANKOWSKY, 1990b). Sob condições favoráveis de temperatura e umidade, a maioria das espécies vegetais é suscetível ao ataque de fungos xilófagos e, entre essas, encontram-se as espécies de *Pinus* spp. (SALES-CAMPOS et al., 2000).

A infecção da planta por fungos emboloradores e manchadores pode ocorrer antes do abate ou durante as etapas de corte, transporte, desdobramento, armazenamento e da utilização final (FURTADO, 2000). Em geral estes fungos são os primeiros a colonizar as árvores recém-abatidas, devido à elevada umidade (OLIVEIRA et al., 1986) e, da grande quantidade de substâncias de reserva dos quais se nutrem, como hidratos de carbono simples, ácidos graxos, triglicerídeos e outros componentes do alburno (OLIVEIRA et al., 1986, BLANCHETTE et al., 1992; FARRELL et al., 1993; WANG et al., 1995).

Estes agentes causais são encontrados, com maior frequência, em toras recém-serradas e em peças de madeira serrada e estocada; são comuns em

árvores senescentes não abatidas e em madeiras atacadas pela vespa da madeira (*Sirex noctilio*) (TALBOT, 1977).

Os emboloradores causam descolorações de aspecto difuso, pulverulento ou algodado na superfície da madeira, embora as hifas possam penetrar profundamente na mesma, as manchas superficiais podem ser facilmente removidas através da escovação ou aplainamento (HIGHLEY, 1999; FURTADO, 2000; OLIVEIRA et al., 1986). Os manchadores se desenvolvem nas células parênquimais do alburno e, suas hifas colonizam células do parênquima radial (FURTADO, 2000), gerando uma descoloração no alburno; esta pode ser observada em cortes transversais, distribuída radialmente (ZINK e FENGEL, 1988; BLANCHETTE et al., 1992; OLIVEIRA et al., 1986).

Estes agentes biodeterioradores da madeira de *Pinus* spp. estão relacionados com a redução na resistência ao impacto e à flexão (SCHEFFER, 1973; OLIVEIRA et al., 1986) e, ao aumento na permeabilidade, fato estes que prejudicam a absorção de preservativos e restringem seu uso (OLIVEIRA et al., 1986; FURTADO, 2000). Podem ainda acarretar perdas econômicas para a indústria madeireira, pois a pigmentação diminui principalmente o valor estético e comercial da madeira (SEIFERT, 1993; HANADA et al., 2003).

Este trabalho teve como objetivo verificar a ocorrência e identificar a ação de fungos emboloradores e manchadores da madeira de *Pinus* spp., em serrarias localizadas nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo.

7.4 MATERIAL E MÉTODOS

7.4.1 Levantamento de Madeira de *Pinus* spp. Apresentando Pigmentação

Para verificar a ocorrência de fungos emboloradores manchadores da madeira de *Pinus* spp. nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo foram coletadas, no ano de 2005, amostras de toras e madeiras serradas (submetidas ou não a secagem) apresentando alterações na coloração natural da madeira, sintomas típicos de emboloramento e manchamento (Fig. 7.1 e 7.2) em madeiras armazenadas em pátios de serrarias e na Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC – Cascavel). Estas foram então divididas em quatro lotes,

conforme o local de procedência (Tabela 7.1).

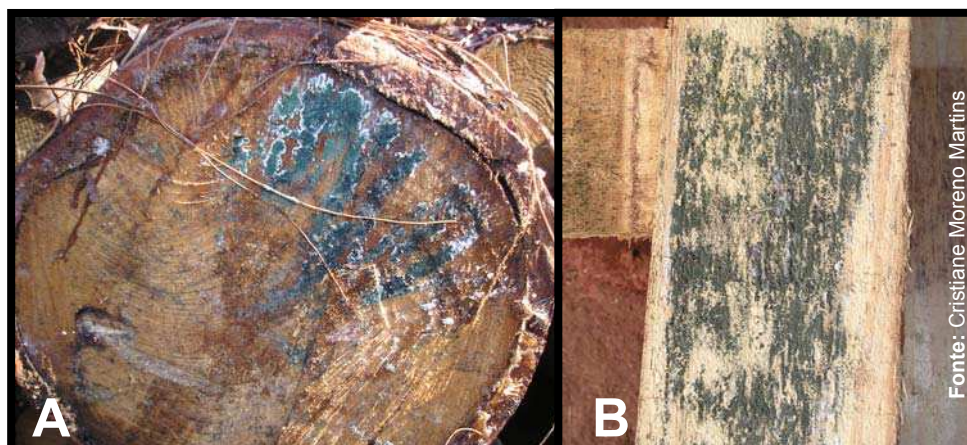


Figura 7.1 – Tora (A) e madeira serrada (B) de *Pinus* spp. apresentando alteração na coloração natural, sintoma típico de emboloramento superficial.

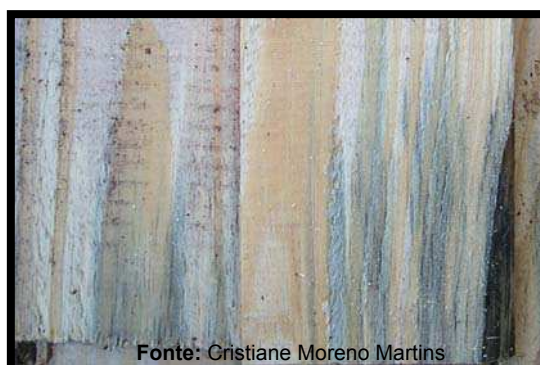


Figura 7.2 – Madeira serrada de *Pinus* spp. apresentando alteração na coloração natural, sintoma típico de manchamento.

Tabela 7.1 – Local de origem das amostras de madeira de *Pinus* spp. com sintomas característicos de emboloramento e manchamento

Lotes	Origem da Madeira Sintomática	Número de Amostras	Número de Pátios Visitados
01	PARANÁ – Londrina	6	3
02	PARANÁ – Cascavel	2	2
03	SANTA CATARINA	2	2
04	SÃO PAULO	5	2

Para a realização de avaliações em laboratório e isolamento dos agentes causais dessa alteração, foram coletados dos materiais sintomáticos corpos de prova, com dimensões de 5 x 5 x 2 cm, com o auxílio de uma serra (Fig. 7.3) e, estes acondicionados em sacos de papel tipo “kraft”, identificados e levados ao laboratório de Fitopatologia, da Universidade Estadual de Londrina.

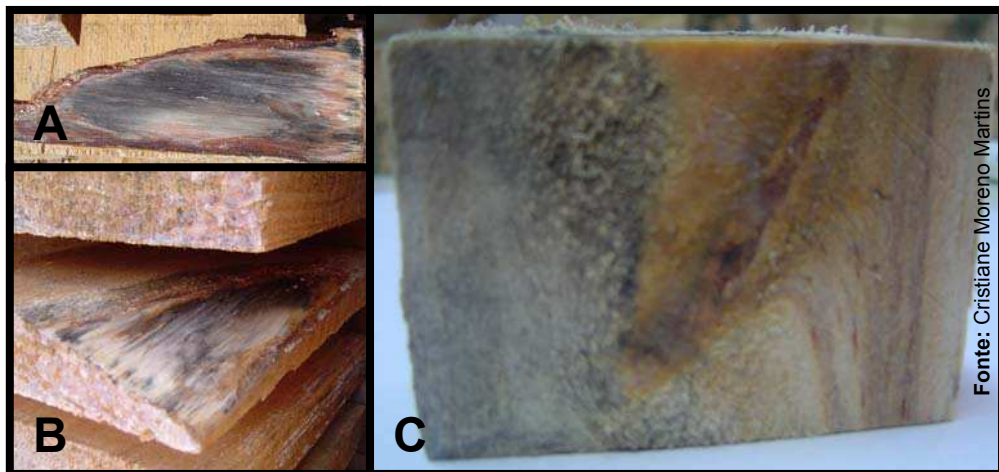


Figura 7.3 – Remoção dos corpos de prova de madeiras apresentando sintomas típicos de manchamento (A e B). Em detalhe, corpo de prova (C).

7.4.2 Isolamento dos Fungos Pigmentadores da Madeira de *Pinus* spp.

Para o isolamento dos possíveis fungos emboloradores e manchadores, os corpos de prova foram desinfestados através da imersão em álcool 70%, seguido por lavagem em água destilada estéril, ambos por dois minutos, e dispostos sobre papel de filtro estéril, para retirada do excesso de água. Na seqüência, pequenos fragmentos de madeira de 1,5 x 1 cm foram retirados dos corpos de prova com o auxílio de um estilete e, depositados ao centro de placas de Petri sobre o meio de cultura extrato de malte-ágar 3% (Fig. 7.4); após, este material foi incubado a temperatura ambiente por dez dias.

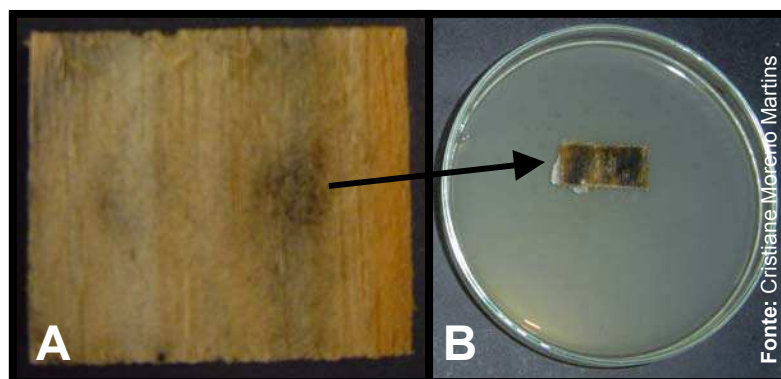


Figura 7.4 – Corpo de prova (A). Fragmento retirado de corpo de prova e plaqueado em meio de cultura extrato de malte-ágar 3% (B).

Neste experimento foram utilizados cinco corpos de prova de cada

amostra (Tabela 7.1), sendo plaqueados quatro fragmentos por corpo de prova, totalizando 300 placas. A incubação se deu em câmaras de crescimento tipo BOD, a temperatura de 22 °C (\pm 2 °C) e fotoperíodo de 12 horas, por 20 dias.

Colônias desenvolvidas sobre o meio de cultura e fragmentos de madeira foram isoladas para placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), através de repicagens periódicas e, incubadas em câmaras de crescimento sob fotoperíodo de 12 horas, a 22 °C (\pm 2 °C), visando à obtenção de colônias puras (Fig. 7.5).

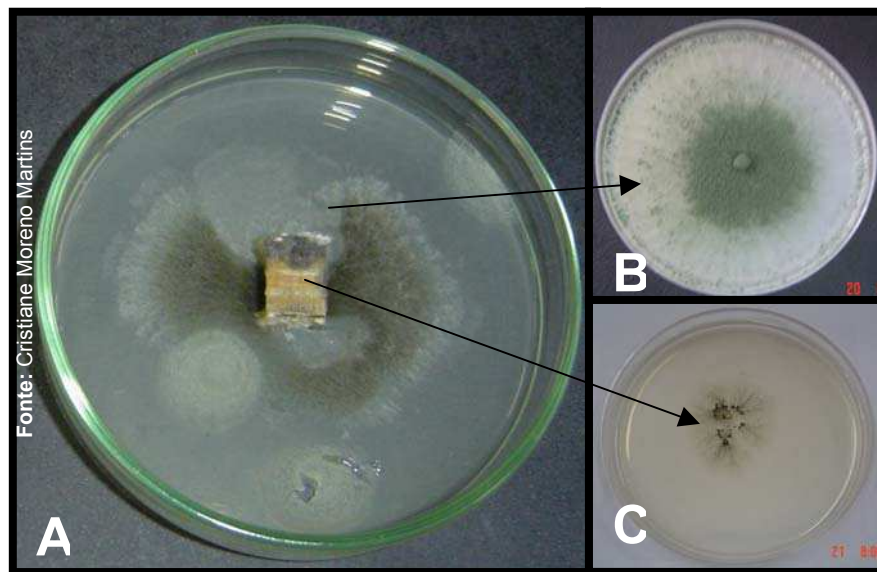


Figura 7.5 – Crescimento fúngico sobre meio de cultura extrato de malte-ágar 3% e fragmento de madeira de *Pinus* spp., após incubação por dez dias (A). Isolamento do fungo crescido sobre o meio de cultura (B) e fragmento de madeira (C) em meio BDA.

Após a obtenção de colônias puras, os isolados foram repicados para tubos de ensaio contendo BDA inclinado e, mantidos a 18 °C (\pm 2 °C), para identificação dos mesmos; este processo foi realizado em duplicata.

Para confirmar que os isolados obtidos, através da metodologia descrita acima, eram agentes do emboloramento e manchamento de *Pinus* spp., procedeu-se a inoculação destes em blocos de madeira assintomáticos, com dimensões de 5 x 4 x 2,5 cm de espessura, previamente perfurados em dois pontos equidistantes, com o auxílio de furadeira, tendo cada orifício 0,8 mm de diâmetro e 1,25 cm de profundidade. A assepsia dos blocos se deu através da imersão em álcool 70% e, em seguida, em água destilada estéril, ambos por 2 minutos, e deposição destes sobre folhas de papel filtro estéril para retirada do excesso de

água (Fig. 7.6).

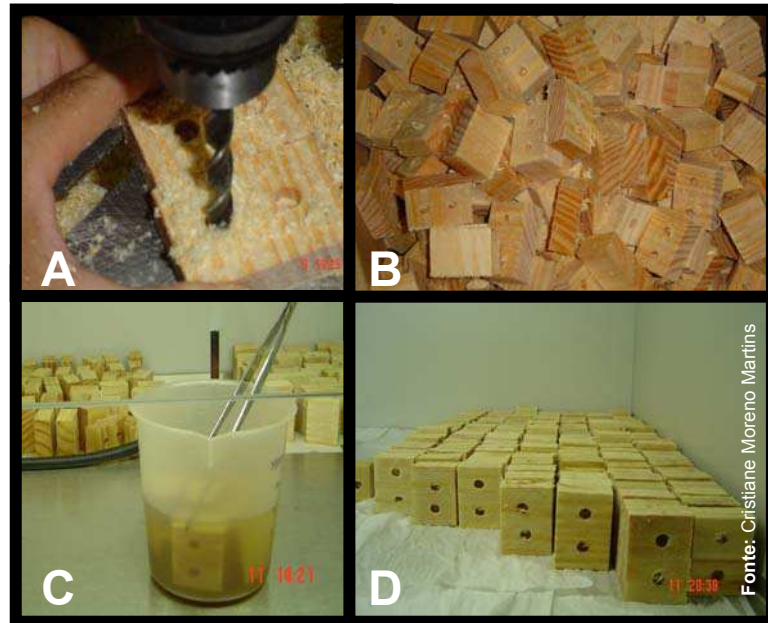


Figura 7.6 – Confeção dos blocos de madeira de *Pinus* spp. (A e B). Assepsia dos blocos através da imersão em álcool 70% e secagem sobre papel filtro (C e D).

Na seqüência, cada orifício dos blocos de madeira de *Pinus* spp. foi inoculado com dois discos de micélio de 0,8 cm de diâmetro, retirados de colônias desenvolvidas durante sete dias em meio BDA, sendo então vedados com filme plástico de PVC para evitar contaminação externa (Fig. 7.7).

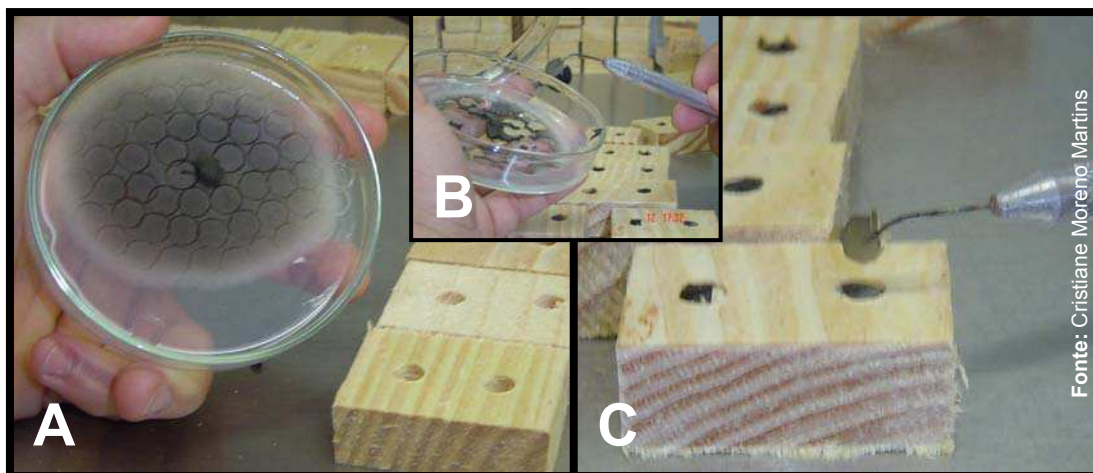


Figura 7.7 – Preparação dos discos de micélio (A). Detalhe da inoculação dos discos de micélio em blocos de madeira de *Pinus* spp. (B e C).

O processo descrito acima foi realizado sob condição de fluxo laminar, para evitar possíveis contaminações. Para cada isolado foram realizadas quatro repetições, sendo que a testemunha recebeu apenas discos do meio de

cultura estéril.

A incubação ocorreu sob condições e temperatura de laboratório de fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina. Para verificação da presença ou ausência do crescimento dos fungos, foram realizadas leituras periódicas e, após trinta dias, os blocos foram analisados externamente e internamente, para verificar a presença ou não de emboloramento e manchamento.

A partir da visualização de alterações na coloração dos blocos e, para comprovar que os isolados fúngicos são causadores de emboloramento e manchamento, foram realizados novos isolamentos a partir da área pigmentada destes blocos, sendo os fungos obtidos comparados macro e microscopicamente aos inoculados nos blocos.

7.4.3 Identificação dos Isolados Causadores de Emboloramento e Manchamento

Esta etapa do trabalho foi realizada na Universidade Federal de Lavras – UFLA, Minas Gerais, nos Laboratórios de Sistemática e Ecologia de fungos e Patologia Florestal, com o apoio e orientação do Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning.

A identificação dos agentes causais de emboloramento e manchamento da madeira de *Pinus* spp. foi realizada com base nas características macro e microscópicas dos isolados. Fungos cultivados em meio BDA e extrato de malte-ágar 3% foram observados macroscopicamente, verificando-se o aspecto da colônia, a coloração e da taxa de crescimento e, ao microscópio estereoscópico foram observadas a presença ou não de estruturas especializadas e o aspecto morfológico das hifas.

Para a observação das estruturas reprodutivas (sexuais e assexuais), disposição e septação de hifas e, demais estruturas e detalhes particularmente importantes na delimitação das espécies, foram confeccionadas lâminas semipermanentes, preparadas com água e glicerol ou corante azul de algodão, e estas observadas ao microscópio óptico. Através dessas avaliações foi possível determinar o gênero dos isolados.

Para a confirmação das espécies, fungos do gênero *Trichoderma* foram cultivados em meio AO; os do gênero *Penicillium*, nos meios diferenciadores

CYA, G25N e MEA; isolados do gênero *Fusarium* foram cultivados em meio SNA e, os dos gêneros *Lasiodiplodia* e *Epicoccum*, em meio OA.

Ao final, as características pertinentes a cada um dos fungos foram comparadas com as descritas em bibliografia especializada (KIRK et al., 2001; ELLIS, 1993; KLICH, 2000; PITT, 2000; SAMSON, 1974; RIFAI, 1969; BISSETT, 1984; NAG RAJ, 1993; BARNETT e HUNTER, 1972).

7.4.4 Teste da Capacidade de Pigmentação *In Vitro* e *In Natura*

7.4.4.1 *In vitro*: Capacidade de fungos emboloradores e manchadores em induzir pigmentação no meio de cultura

Neste experimento os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio BDA e incubados, em câmara de crescimento tipo BOD, a 22 °C (± 2 °C), sob fotoperíodo de 12 horas. A avaliação ocorreu após sete dias, com a verificação de alterações na coloração do meio de cultura, como através da presença ou não de exudação de substâncias coloridas, observando-se o verso das placas e utilizando-se da escala de notas descrita por Yang (1999) (Tabela 7.2). Foram avaliadas quatro replicatas para cada isolado.

Tabela 7.2 – Escala de notas descrita por Yang (1999)

Nota	Superfície Manchada
0	Não pigmentada
1	Pigmentação leve
2	Pigmentação moderada
3	Pesadamente pigmentada

7.4.4.2 *In natura*: Capacidade de fungos emboloradores e manchadores em induzir pigmentação em blocos de madeira de *Pinus* spp.

Blocos de madeira de *Pinus* spp., previamente perfurados em dois pontos equidistantes e desinfetados através da imersão em álcool 70% e água

destilada estéril por 2 minutos, foram depositados sobre folhas de papel filtro estéril para remoção do excesso de água, conforme metodologia descrita no item 7.4.2. Em condições assépticas, dois discos de micélio foram retirados de colônias dos fungos emboloradores e manchadores em estudo e transferidos para os orifícios dos blocos, sendo estes em seguida vedados com filme de PVC. Este processo foi realizado com quatro repetições por isolado.

A incubação ocorreu sob condição de laboratório de fitopatologia, durante trinta dias e, após este período, os blocos foram avaliados visualmente, com a finalidade de quantificar a ocorrência de emboloramento e manchamento. Para a mensuração da intensidade da pigmentação da madeira, utilizou-se a Escala de notas descrita por Yang (1999) (Tabela 7.2); para quantificar a superfície de madeira colonizada por fungos emboloradores e manchadores, foi utilizada a Escala de notas descrita por Henz e Cardoso (2005) (Tabela 7.3); para determinar o grau de emboloramento e manchamento e a superfície recoberta pelo fungo, utilizou-se a escala proposta por Benko e Highley (1990) (Tabela 7.4); e, para a avaliação da coloração do micélio e da pigmentação da madeira, usou-se a escala proposta por Held et al. (2003) (Tabela 7.5).

Tabela 7.3 – Escala de notas descrita por Henz e Cardoso (2005)

Nota	Superfície Colonizada por Fungos
0	Sem crescimento
1	Crescimento em até 10% da superfície da madeira
2	Crescimento sobre 11 a 50% da superfície
3	Mais de 51% da superfície colonizada

Tabela 7.4 – Escala de Manchamento proposta por Benko e Highley (1990c)

Notas	Sinais e Manchas
0	<u>Sem mancha</u> : sem sinais visíveis de manchamento ou fungos na superfície
1	<u>Madeira ligeiramente manchada</u> : pontos minúsculos e individuais, com diâmetro máximo de dois milímetros
2	<u>Madeira moderadamente manchada</u> : ao menos um terço da superfície manchada ou com manchas em linhas em até um meio da superfície; mancha e/ou fungos cobrindo ao menos um terço e até metade da superfície
3	<u>Madeira pesadamente manchada</u> : mais de um meio da superfície manchada; mancha e/ou mofos cobrem mais da metade da superfície

Tabela 7.5 – Escala de notas proposta por Held et al. (2003) com modificações, para avaliação da coloração do crescimento micelial e da madeira

Notas	Coloração Micelial e da Madeira
1	Micélio branco e madeira não-manchada
2	Micélio escuro (do cinza ao negro) e madeira ligeiramente cinza
3	Micélio escuro e madeira tendendo ao cinza
4	Micélio escuro e madeira cinza escuro
5	Micélio negro e madeira enegrecida
6	Micélio do amarelo ao marrom e madeira amarelada
7	Micélio variando do vermelho ao roxo e madeira tendendo ao rosa/roxo
8	Micélio em tons de verde e madeira esverdeada

7.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do levantamento de madeiras pigmentadas, provenientes de serrarias localizadas nos Estados do Paraná, São Paulo e Santa Catarina, verificou-se a ocorrência de madeiras serradas de *Pinus* spp. apresentando sintomas típicos de emboloramento e manchamento, principalmente em madeiras recém-serradas, empilhadas e mantidas à sombra. Segundo Highley (1999), este ambiente pode propiciar condições de umidade e temperatura favoráveis para o desenvolvimento dos microrganismos emboloradores; Galvão e Jankowsky (1985) relataram que o ataque destes microrganismos a toras e peças recém-cortadas ou madeiras expostas em ambiente com alta saturação de umidade é comum.

7.5.1 Isolamento dos Fungos Pigmentadores da Madeira de *Pinus* spp.

Durante o processo de isolamento, buscou-se obter o maior número possível de isolados; sendo obtidos 248 isolados fúngicos. Entretanto, após a inoculação destes isolados em blocos de madeira de *Pinus* spp. e re-isolamento, para comparação macro e microscópica dos isolados, verificou-se que apenas 165 são causadores da pigmentação da madeira e, destes, 87 isolados foram caracterizados como emboloradores e, 78 caracterizados como manchadores (Fig. 7.8). Fato este comum, uma vez que além dos emboloradores e manchadores, uma vasta gama de

microrganismos pode estar presente na madeira serrada, ou até mesmo em árvores vivas, como é o caso de fungos decompositores e fungos saprofitos (FURTADO, 2004).

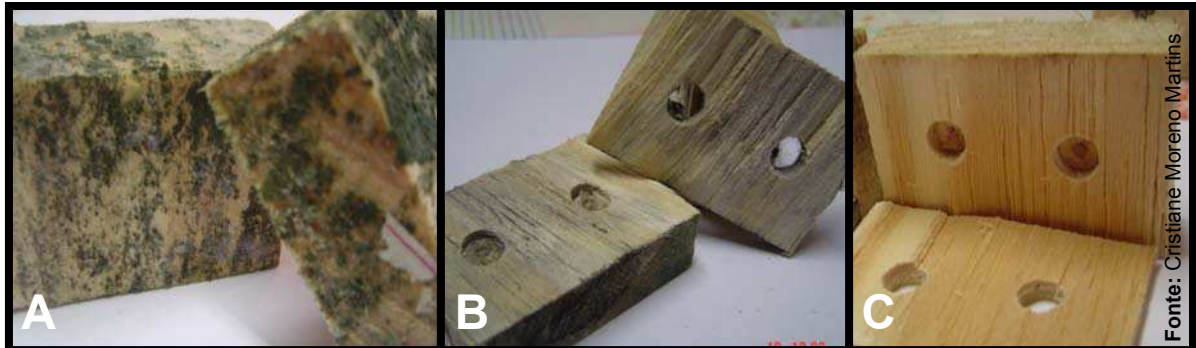


Figura 7.8 – Blocos de madeira de *Pinus* spp. inoculados com fungo causador de emboloramento (A) e com fungo causador de manchamento (B) e, testemunha não inoculada (C).

7.5.2 Identificação dos Isolados Causadores de Emboloramento e Manchamento

7.5.2.1 Fungos emboloradores

Após a averiguação das características miceliais, coloração da colônia, visualização dos isolados sobre o microscópio estereoscópico e óptico e, cultivo em meios diferenciais, foram identificados os gêneros mais representativos dos fungos emboloradores.

Através da identificação dos isolados, observou-se que dos 87 isolados pigmentadores, 50 isolados são agentes causais de emboloramento de coloração verde; apresentam colônias de crescimento rápido; conidióforos livres e ramificados; conídios arredondados e não catenulados, dispostos radialmente no ápice do conidióforo e com colorações hialinas e verdes, o que demonstrou que estes isolados pertenciam ao gênero *Trichoderma*. Com base nas características específicas de cada um dos isolados, foram identificadas as espécies *T. atroviride* (Fig. 7.9), *T. harzianum*, *T. pseudokoningii* e *T. viride* (RIFAI, 1969; BISSETT, 1984; SILVEIRA, 1995).

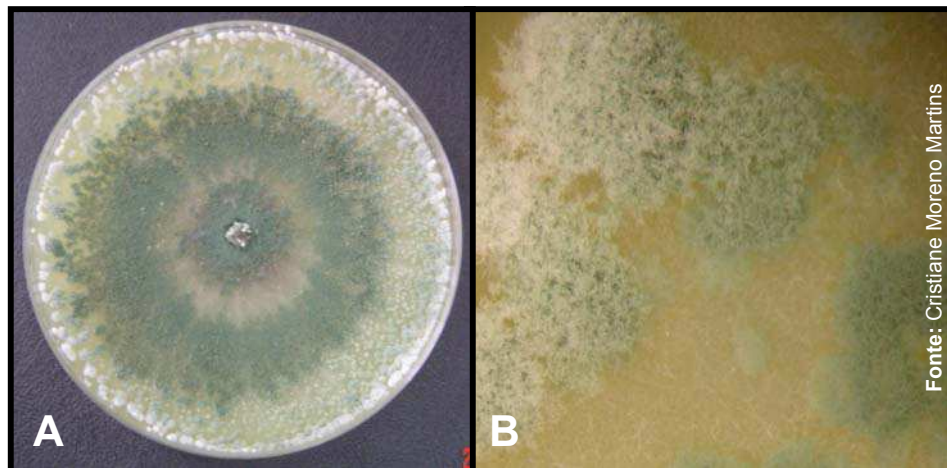


Figura 7.9 – Isolado do fungo *Trichoderma atroviride*, causador de emboloramento. Aspecto da colônia em meio BDA (A). Região em esporulação (B).

Onze isolados formavam colônias de coloração verde escura e continham conídios pequenos, unicelulares, hialinos e catenulados, produzidos em fiálides na extremidade de conidióforos longos, indicando que estes isolados pertencem ao gênero *Penicillium*. Entre as espécies encontradas estão *P. citrinum* (Fig. 7.10) e *P. lividum* (PITT, 2000; KIRK et al., 2001).

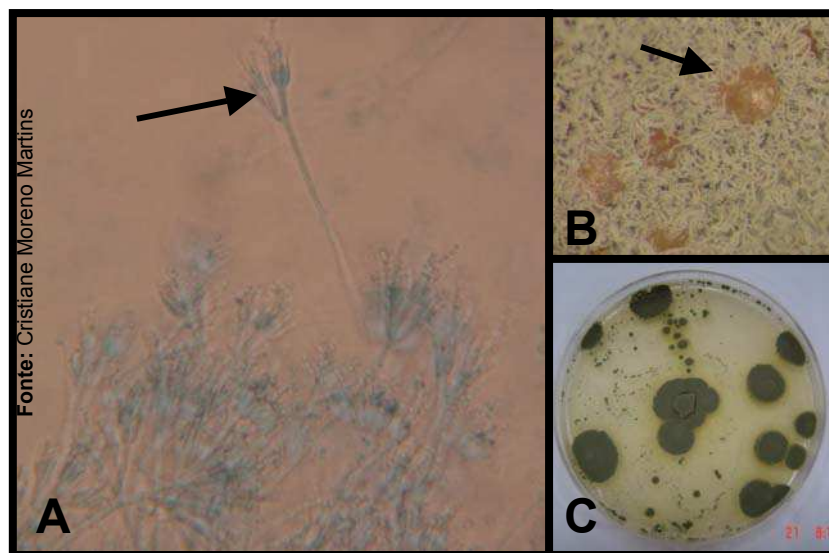


Figura 7.10 – Isolado do fungo *Penicillium citrinum*, causador de emboloramento. Conidióforo e conídios (A). Exudação micelial (B). Aspecto da colônia em meio BDA (C).

Outros dez isolados apresentavam colônias com pontuações negras; conidióforos eretos, simples e longos, com dilatação lateral em forma de vesícula; conídios diminutos, unicelulares, hialinos e catenulados, produzidos em fiálides,

características típicas do gênero *Aspergillus* e, da espécie *A. niger* (Fig. 7.11) (ELLIS, 1993; SCHUSTER et al., 2002).



Figura 7.11 – Isolado do fungo embolorador *Aspergillus niger*.

Os três gêneros acima citados, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*, da classe-forma Hyphomycetes, são saprófitas e cosmopolitas, sendo anteriormente citados por Furtado (2000) como agentes causadores de manchamento superficial.

As espécies *Trichoderma harzianum*, *T. pseudokonigii* e *T. viride*, encontradas causando emboloramento em madeiras de *Pinus* spp. nos estados do Paraná, São Paulo e Santa Catarina, também foram descrita por Hanada et al. (2003) como sendo responsáveis pelo emboloramento de 12 espécies vegetais no estado do Amazonas.

7.5.2.2 Fungos manchadores

Durante a identificação dos fungos manchadores foi observado que, dos 78 isolados pigmentadores, três isolados causavam pontuações negras na madeira e, possuíam conídio formado por cinco células, sendo as três centrais com deposição de melanina; sendo ainda relatada a presença de dois a três apêndices acrógenos, sem ramificação, característicos do gênero *Pestalotiopsis*, espécie *P. palustris* (Fig. 7.12) (NAG RAJ, 1993).

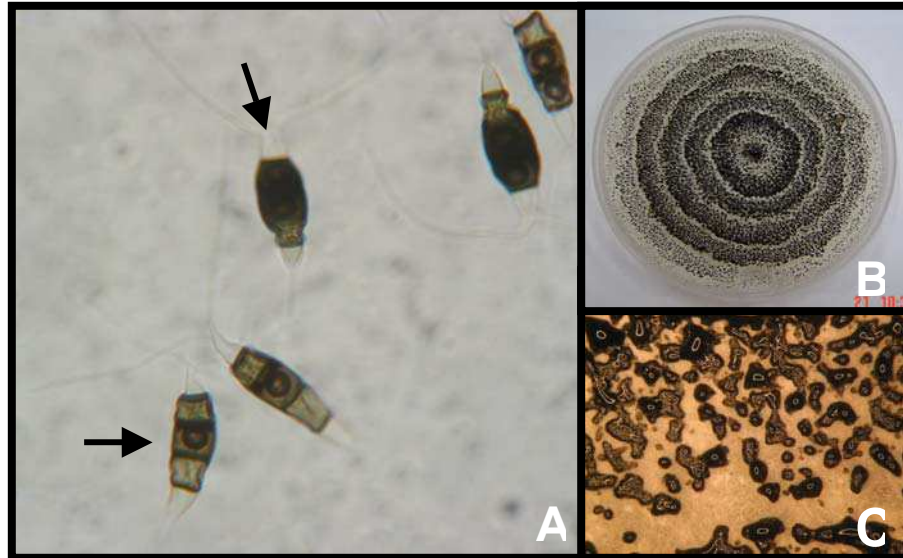


Figura 7.12 – Isolado do fungo *Pestalotiopsis palustris*, causador de manchamento. Conídios e apêndices apicais (A). Aspecto da colônia em meio de cultura BDA (B). Exudato (C).

Mesquita et al. (2006) relatou o fungo *Pestalotiopsis* spp. como causador de manchamento na madeira de *Eucalyptus*, bem como o resultado deste trabalho, que confirmou *Pestalotiopsis palustris* como agente de manchamento da madeira de *Pinus* spp.

Verificou-se que 46 isolados apresentavam picnídios com esporulação abaixo do micélio, esporos escuros com duas células, característicos do gênero *Lasiodiplodia*, espécie *L. theobromae* (Fig. 7.13) (FURTADO, 2000; KIRK et al., 2001).

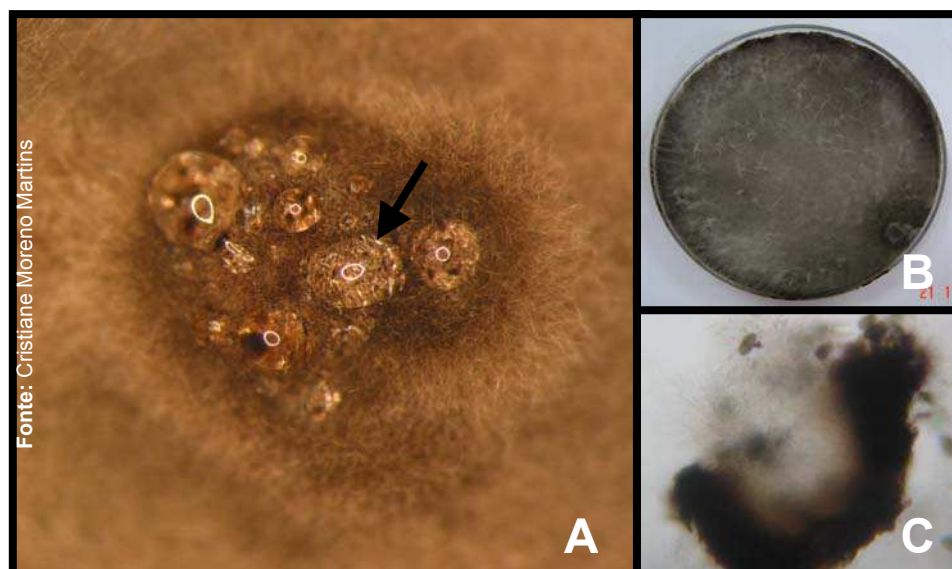


Figura 7.13 – Isolado do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, causador de manchamento. Exudato liberado pelo picnídio (A). Aspecto da colônia em meio de cultura BDA (B). Células conidiogênicas e conídios (C).

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* encontrado neste estudo e classificado como manchador da madeira de *Pinus* spp., foi anteriormente relatado como agente causal da mancha azul na África, Brasil e Venezuela, por Encinas (1996) e Alemán B. (2003).

Em 10 isolados foi observada uma coloração micelial variável do amarelo ao alaranjado, presença de feósporos, conídios contínuos e esporodóquios pontiformes, além da presença de cleistotécio, indicando que estes representavam o gênero *Epicoccum*, espécie *E. purpurascens* (Fig. 7.14) (ELLIS, 1993; SILVEIRA, 1995).

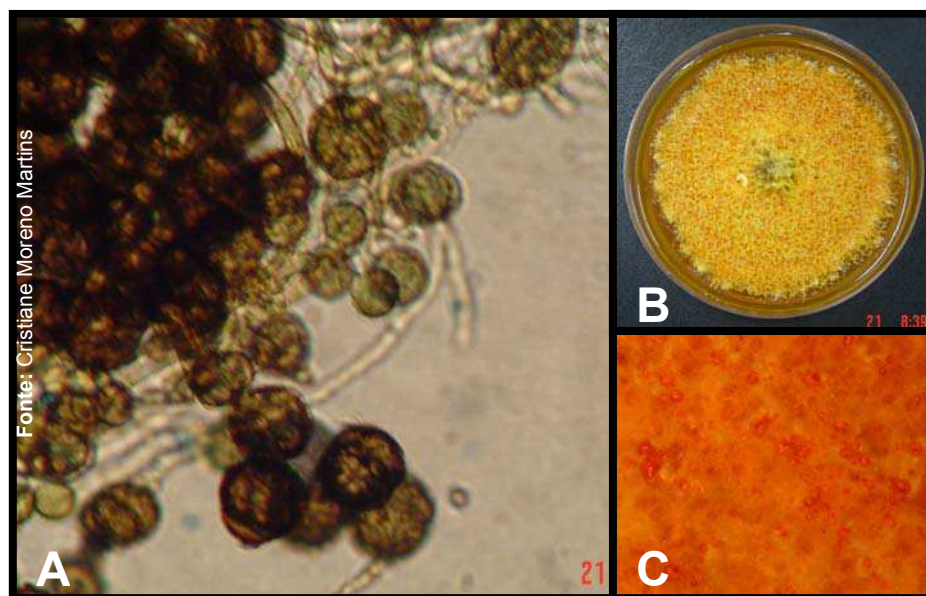


Figura 7.14 – Isolado do fungo manchador *Epicoccum purpurascens*. Conídios (A). Aspecto da colônia em meio de cultura BDA (B). Micélio aéreo e exudatos (C).

O gênero *Epicoccum* foi citado por Thwaites (2004) como agente causal de emboloramento, porém segundo resultados apresentados no trabalho de Morris e Cooper (1998), o fungo *Epicoccum purpurascens* é agente causal de manchamento, sendo responsável por manchas internas nos corpos de prova e, tendo sido encontrado colonizando uma extensa área de fibras de madeira de *Pinus* spp. reciclada.

Outros 13 isolados apresentavam micélio róseo e vináceo, presença de esporodóquios, macroconídeos hialinos, multicelulares e curvos e, microconídeos hialinos e unicelulares, indicando que estes pertenciam ao gênero *Fusarium*, espécies *Fusarium avenaceum*, *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* (Fig. 7.15) (SILVEIRA, 1995).

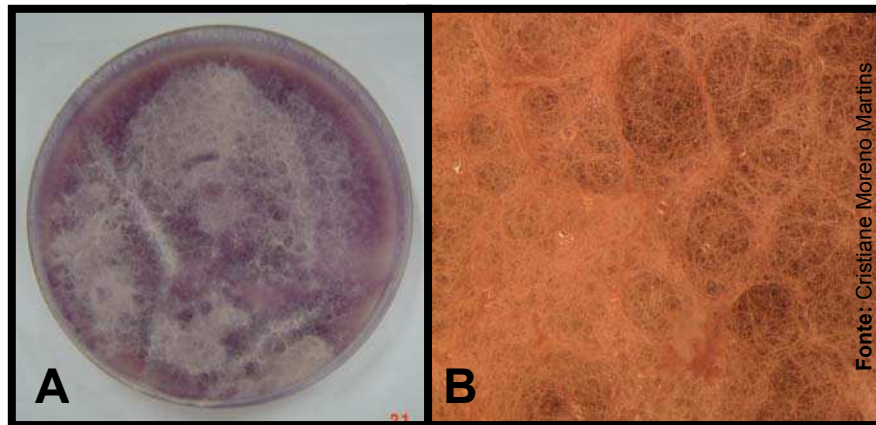


Figura 7.15 – Isolado do fungo manchador *Fusarium oxysporum*. Aspecto da colônia em meio de cultura BDA (A). Micélio aéreo (B).

Somente dois isolados apresentaram micélio aéreo flocoso, com hifas vegetativas hialinas, presença de sinemata e, apresentavam duas a quatro fiálides, com conídios helipsoidal, o que caracterizou estes isolados como membros do gênero *Paecilomyces*, espécie *P. lilacinus* (Fig. 7.16) (SAMSON, 1974).

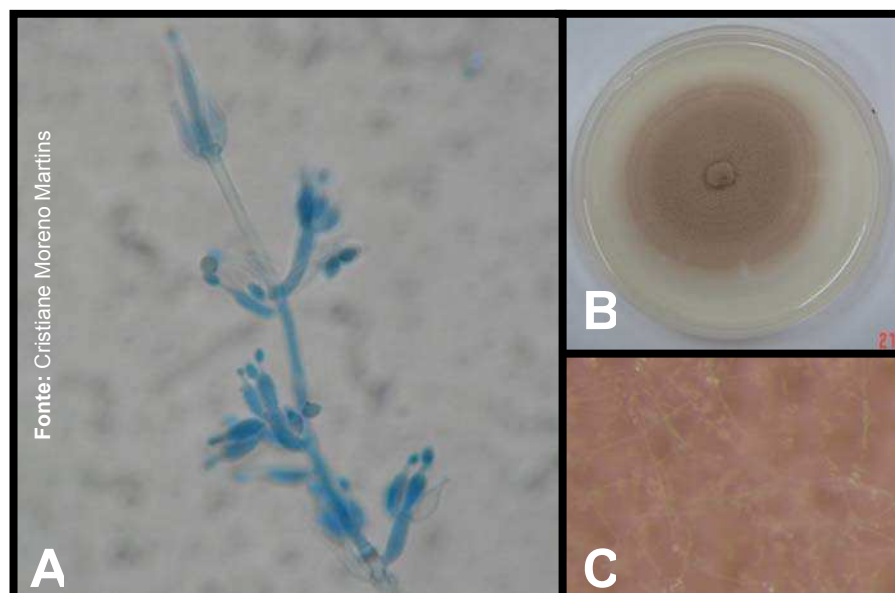


Figura 7.16 – Isolado do fungo manchador *Paecilomyces lilacinus*. Conidióforos (A), colônia em meio BDA (B) e, micélio em detalhe (C).

Os gêneros *Fusarium* e *Paecilomyces*, citados Dix e Webster (1995) como agentes causais de emboloramento, foram neste estudo classificados como manchadores da madeira de *Pinus* spp., uma vez que estes produziam manchas profundas no alburno. É válido ressaltar a afirmativa de Käärik (1975), que afirma que uma mesma espécie de fungo pode atuar de diferentes formas em diferentes

circunstâncias.

7.5.3 Teste da Capacidade de Pigmentação *In Vitro*

Neste experimento foram utilizados onze isolados de fungos emboloradores, pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* e, quinze isolados de fungos manchadores, pertencentes aos gêneros *Lasiodiplodia*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Epicoccum*.

7.5.3.1 Capacidade de fungos emboloradores em induzir pigmentação no meio de cultura

Avaliando a ação dos fungos emboloradores em pigmentar o meio de cultura (Tabela 7.6), foi observado que o fungo *Penicillium citrinum* tem grande capacidade pigmentar de cor amarelo o meio de cultura BDA, enquanto que o fungo *Penicillium lividum*, também isolado do Estado do Paraná, não apresenta tal capacidade (Fig. 7.11).

Tabela 7.6 – Avaliação dos isolados de fungos emboloradores, segundo Escala de notas descrita por Yang (1999) para manchamento em meio de cultura

ESPÉCIE	ISOLADO	ORIGEM	COR DA COLÔNIA	COR MEIO DE CULTURA	NOTA ESCALA
<i>Aspergillus niger</i>	CM E 37	Paraná	Preto	Escurecimento leve	1
<i>Aspergillus niger</i>	CM E 70B	Paraná	Preto	-	0
<i>Aspergillus niger</i>	CM E 179	Paraná	Preto	Escurecimento leve	1
<i>Penicillium citrinum</i>	CM E 101	Paraná	Verde escuro	Amarelo	3
<i>Penicillium lividum</i>	CM E 170	Paraná	Verde escuro	-	0
<i>Trichoderma atroviride</i>	CM E 160B	Paraná	Verde claro	Escurecimento leve	1
<i>Trichoderma atroviride</i>	CM E 173V	Santa Catarina	Verde claro	Escurecimento leve	1
<i>Trichoderma harzianum</i>	CM E 106B	São Paulo	Verde claro	Escurecimento leve	1

<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	CM E 17	Santa Catarina	Verde claro	Escurecimento leve	1
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	CM E 166	Paraná	Verde claro	Escurecimento leve	1
<i>Trichoderma viride</i>	CM E 172	Paraná	Verde claro	Escurecimento leve	1

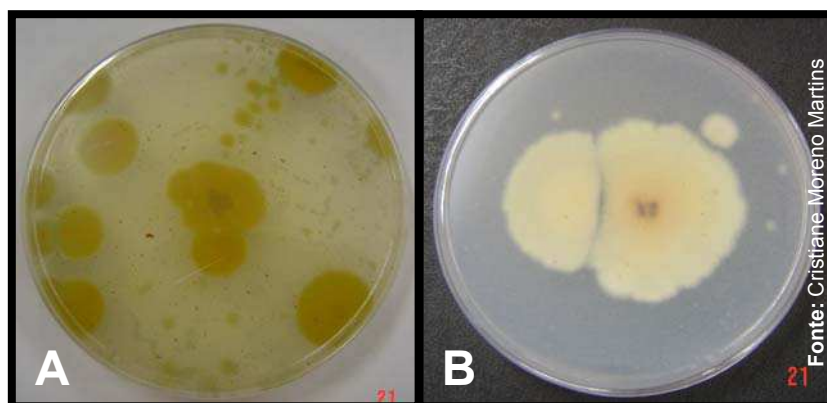


Figura 7.17 – Fungo embolorador *Penicillium citrinum*, alterando a coloração do meio de cultura BDA (A). Fungo embolorador *Penicillium lividum*, não alterando a coloração do meio de cultura BDA (B).

Dos isolados de *Aspergillus niger*, foi constatado que dois destes escureciam levemente o meio de cultura BDA, enquanto um isolado não demonstrou essa capacidade.

Os isolados de *Trichoderma atroviride* e *Trichoderma pseudokoningii*, coletados no Paraná, tiveram reação semelhante aos coletados em Santa Catarina, provocando leve escurecimento do meio de cultura; resultado idêntico ocorreu com os isolados de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma viride*, coletados nos Estados de São Paulo e Paraná, respectivamente.

7.5.3.2 Capacidade de fungos manchadores em induzir pigmentação no meio de cultura

Através da avaliação, foi determinado que o fungo *Epicoccum purpurascens* possui a capacidade de pigmentar fortemente o meio de cultura, tornando-o laranja escuro. Também foram observadas diferentes reações entre os isolados de *Fusarium*; dois isolados da espécie *F. oxysporum* pigmentam fortemente o meio de cultura, um isolado causa pigmentação moderada e um não provoca alteração no meio de cultura; *F. avenaceum* e *Fusarium* spp. causam pigmentação

moderada; e, isolados de *F. solani* causam pigmentação leve (Fig. 7.18).

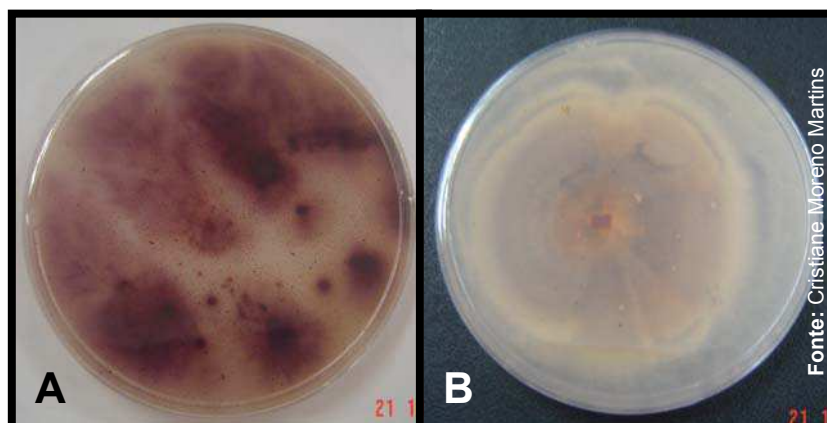


Figura 7.18 – Fungos manchadores *Fusarium oxysporum*, alterando a coloração do meio de cultura BDA (A) e, *Fusarium solani*, causando um leve escurecimento no meio de cultura, segundo Escala de notas descrita por Yang (1999).

Todos os isolados de *Lasiodiplodia theobromae* mancharam fortemente o meio, tornando-o preto. O fungo *Paecilomyces lilacinus* pigmentou moderadamente o meio, enquanto o *Pestalotiopsis palustris* foi responsável por pigmentação leve, com pequenas pontuações negras (Tabela 7.7).

Tabela 7.7 – Avaliação dos isolados de fungos manchadores, segundo Escala de notas descrita por Yang (1999) para manchamento em meio de cultura

ESPÉCIE	ISOLADO	ORIGEM	COR DA COLÔNIA	COR MEIO DE CULTURA	NOTA ESCALA
<i>Epicoccum purpurascens</i>	CM M MM	Paraná	Marrom	Laranja escuro	3
<i>Fusarium avenaceum</i>	CM M 29	Paraná	Bege	Amarelado	2
<i>Fusarium solani</i>	CM M 41B	São Paulo	Cinza	Escurecimento leve	1
<i>Fusarium</i> spp.	CM M 56	Paraná	Cinza	Escurecimento leve	1
<i>Fusarium solani</i>	CM M 59	Paraná	Bege	Escurecimento leve	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	CM M 70	Paraná	Roxo	Roxo	3
<i>Fusarium oxysporum</i>	CM M 103	Paraná	Roxo	Escurecimento leve	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	CM M 114	Paraná	Roxo	-	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	CM M 165	Paraná	Roxo	Arroxeadado	3
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM M 7	Santa Catarina	Preto	Preto	3

<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM M 10	Santa Catarina	Preto	Preto	3
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM M 43	São Paulo	Preto	Preto	3
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM M 155	Paraná	Preto	Preto	3
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM M 173P	Santa Catarina	Preto	Preto	3
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	CM M 140	Paraná	Róseo	Cinza	2
<i>Pestalotiopsis palustris</i>	CM M 139B	Paraná	Branco com pontos negros	Pequenos pontos pretos	1

7.5.4 Teste da Capacidade de Pigmentação *In Natura*

7.5.4.1 Capacidade de fungos emboloradores em induzir pigmentação em blocos de madeira de *Pinus* spp.

Com base nas avaliações realizadas, com o auxílio da escala de notas proposta por Yang (1999), foi constatado que o gênero *Trichoderma* possui a capacidade de pigmentar fortemente a madeira de pinus, seguido pelo gênero *Penicillium*; o gênero *Aspergillus* pigmenta moderadamente a madeira.

A escala de notas de Henz e Cardoso (2005) indicou que os blocos de madeira de *Pinus* spp. inoculados com o gênero *Trichoderma* apresentaram maior área colonizada quando comparados aos demais gêneros. A escala de manchamento proposta por Benko e Highley (1990) não foi suficiente para distinguir os gêneros, quanto à presença de manchas e superfície colonizada.

Com base nos resultados obtidos e, fazendo uso das três escalas, concluiu-se que as espécies *Aspergillus niger* (isolado CM E 70B), *Penicillium lividum*, *Trichoderma palustris* e *T. atroviride*, coletadas no estado do Paraná, apresentam maior capacidade de embolorar a madeira de *Pinus* spp., assim como os isolados das espécies *T. atroviride* e *T. pseudokoningii*, coletadas no estado de Santa Catarina, e da espécie *T. harzianum*, coletada no estado de São Paulo (Tabela 7.8).

Tabela 7.8 – Avaliação do grau de emboloramento de blocos de madeira de *Pinus* spp. por isolados, segundo Escala de notas descrita por Yang (1999), Henz e Cardoso (2005) e Benko e Highley (1990)

ESPÉCIE	ISOLADO	Yang (1999)	Henz e Cardoso (2005)	Benko e Highley (1990)
<i>Aspergillus niger</i>	CM E 37	2	2	3
<i>Aspergillus niger</i>	CM E 70B	3	3	3
<i>Aspergillus niger</i>	CM E 179	2	2	3
<i>Penicillium citrinum</i>	CM E 101	2	2	2
<i>Penicillium lividum</i>	CM E 170	3	3	3
<i>Trichoderma atroviride</i>	CM E 160B	3	3	3
<i>Trichoderma atroviride</i>	CM E 173V	3	3	3
<i>Trichoderma harzianum</i>	CM E 106B	3	3	3
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	CM E 17	3	3	3
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	CM E 166	3	2	2
<i>Trichoderma viride</i>	CM E 172	2	3	3

Isolados de *Penicillium* e *Trichoderma*, segundo a escala proposta por Held et al., foram caracterizadas como detentoras de micélio em tons de verde e, quando inoculados em blocos de madeira de *Pinus* spp., também produziram tons esverdeados. Já os isolados de *Aspergillus*, embora possuíssem micélio escuro, receberam notas variadas; o isolado CM E 37 foi responsável pela coloração da madeira em tom tendendo ao cinza; o isolado CM E 179 pigmentou a madeira ligeiramente de cinza, enquanto o isolado CM E 70B causou pigmentação cinza escuro na madeira (Tabela 7.9).

Tabela 7.9 – Avaliação do grau de emboloramento de blocos de madeira de *Pinus* spp. por isolados, segundo Escala de notas descrita por Held et al. (2003)

ESPÉCIE	ISOLADO	Held et al. (2003)
<i>Aspergillus niger</i>	CM E 37	3
<i>Aspergillus niger</i>	CM E 70B	5
<i>Aspergillus niger</i>	CM E 179	2
<i>Penicillium citrinum</i>	CM E 101	8
<i>Penicillium lividum</i>	CM E 170	8

<i>Trichoderma atroviride</i>	CM E 160B	8
<i>Trichoderma atroviride</i>	CM E 173V	8
<i>Trichoderma harzianum</i>	CM E 106B	8
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	CM E 17	8
<i>Trichoderma pseudokoningii</i>	CM E 166	8
<i>Trichoderma viride</i>	CM E 172	8

7.5.4.2 Capacidade de fungos manchadores em induzir pigmentação em blocos de madeira de *Pinus* spp.

Com base nas avaliações do grau de pigmentação da madeira através da escala de notas proposta por Yang (1999), foi constatado que as espécies *E. purpurascens*, *P. palustris* e *L. theobromae* possuem a capacidade de pigmentar fortemente a madeira de *Pinus* spp., seguido pela espécie *P. lilacinus* e pelo gênero *Fusarium*.

Segundo a escala de notas de Henz e Cardoso (2005), verificou-se que blocos de madeira de *Pinus* spp., quando inoculados com as espécies *E. purpurascens*, *L. theobromae* e *P. palustris*, apresentaram maior área colonizada, do que quando inoculado com os gêneros *Fusarium* e *Paecilomyces*; com exceção do isolado de *F. oxysporum* CM M 103, que apresentou crescimento comparado aos primeiros.

Através da avaliação utilizando-se da escala de manchamento proposta por Benko e Highley (1990), foi observado que as espécies *E. purpurascens*, *F. oxysporum* (isolado CM M 103), *L. theobromae* e *P. palustris* mancharam mais da metade da área dos blocos de *Pinus* spp.; os isolados de *F. avenaceum*, *F. solani* CM M 41B, *Fusarium* spp. e, *F. oxysporum* CM M 70, CM M 114 e CM M 165 apresentaram manchamento moderado; enquanto o isolado de *Fusarium solani* CM M 59 apresentou manchas em pequenos pontos individualizados.

Com base nos resultados obtidos e, fazendo uso das três escalas, concluiu-se que as espécies *E. purpurascens*, *L. theobromae* e *P. palustris*, coletadas nos estados do Paraná, São Paulo e Santa Catarina, apresentam maior capacidade de manchar a madeira de *Pinus* spp., seguido pelas espécies *F.*

oxysporum, *P. lilacinus*, *F. avenaceum* e *F. solani* (Tabela 7.10).

Tabela 7.10 – Avaliação do grau de manchamento de blocos de madeira de *Pinus* spp. por isolados, segundo Escala de notas descrita por Yang (1999), Henz e Cardoso (2005) e Benko e Highley (1990)

ESPÉCIE	ISOLADO	Yang (1999)	Henz e Cardoso (2005)	Benko e Highley (1990)
<i>Epicoccum purpurascens</i>	CM M MM	3	3	3
<i>Fusarium avenaceum</i>	CM M 29	2	2	2
<i>Fusarium solani</i>	CM M 41B	2	2	2
<i>Fusarium</i> spp.	CM M 56	2	2	2
<i>Fusarium solani</i>	CM M 59	1	1	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	CM M 70	2	2	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	CM M 103	3	3	3
<i>Fusarium oxysporum</i>	CM M 114	2	2	2
<i>Fusarium oxysporum</i>	CM M 165	2	2	2
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM M 7	3	3	3
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM M 10	3	3	3
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM M 43	3	3	3
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM M 155	3	3	3
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM M 173P	3	3	3
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	CM M 140	2	2	2
<i>Pestalotiopsis palustris</i>	CM M 139B	3	3	3

A espécie *E. purpurascens*, segundo a escala proposta por Held et al., foi classificada como possuidora de micélio de tom entre amarelo e marrom e, quando inoculada em blocos de madeira de *Pinus* spp., produtora de manchas amareladas (Fig. 8.14). Em contraponto, todos os isolados do gênero *Fusarium* e a espécie *Paecilomyces lilacinus* são detentores de micélio variando do vermelho ao roxo e produtores de pigmentação na madeira tendendo ao roxa/roxo.

Embora a maioria dos isolados de *Lasiodiplodia theobromae* possuam micélio escuro, receberam notas variadas; os isolados CM M 07, CM M 10 (provenientes de Santa Catarina) e CM M 155 (Paraná) possuem micélio negro e, quando presentes na madeira de *Pinus* spp., tornam-na enegrecida (Fig. 7.19); o

isolado CM M 43, proveniente de São Paulo possui micélio escuro e, quando presente é capaz de manchar a madeira de cinza escuro; o isolado CM M 173P (Santa Catarina), embora também possua micélio escuro, é responsável por manchas mais claras que os demais isolados, com a madeira colonizada tendendo ao cinza (Tabela 7.11).



Figura 7.19 – Fungo manchador *Epicoccum purpurascens* em placa de Petri contendo meio de cultura BDA (A) e, produzindo manchas amareladas, quando inoculado em blocos de madeira de *Pinus* spp. (B) Isolado de *Lasiodiplodia theobromae* CM M 07, quando cultivado em meio de cultura (C) e, quando inoculado na madeira de *Pinus* spp., tornam-na enegrecida (D).

Tabela 7.11 – Avaliação do grau de manchamento de blocos de madeira de *Pinus* spp. por isolados, segundo Escala de notas descrita por Held et al. (2003)

ESPÉCIE	ISOLADO	Held et al.
<i>Epicoccum purpurascens</i>	CM M MM	6
<i>Fusarium avenaceum</i>	CM M 29	7
<i>Fusarium solani</i>	CM M 41B	7
<i>Fusarium</i> spp.	CM M 56	7
<i>Fusarium solani</i>	CM M 59	7
<i>Fusarium oxysporum</i>	CM M 70	7
<i>Fusarium oxysporum</i>	CM M 103	7
<i>Fusarium oxysporum</i>	CM M 114	7
<i>Fusarium oxysporum</i>	CM M 165	7

<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM M 7	5
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM M 10	5
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM M 43	4
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM M 155	5
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CM M 173P	3
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	CM M 140	7
<i>Pestalotiopsis palustris</i>	CM M 139B	3

7.6 CONCLUSÕES

Fungos emboloradores dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* e, manchadores dos gêneros *Epicoccum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Paecilomyces* e *Pestalotiopsis*, são agentes causais de manchamento da madeira de *Pinus* spp. nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo.

As espécies mais agressivas de emboloradores são *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma pseudokoningii* e *Penicillium lividum*; *Lasiodiplodia theobromae* é a espécie mais agressiva de manchador, sendo responsável por manchas profundas e extensas na madeira de *Pinus* spp.

8 ARTIGO D – CONTROLE BIOLÓGICO DE FUNGOS EMBOLADORES E MANCHADORES DA MADEIRA DE *Pinus* spp. *In Vitro* E *In Natura*.

8.1 RESUMO

Fungos emboloradores e manchadores, causadores de manchas superficiais e internas na madeira de *Pinus* spp., podem comprometer principalmente o aspecto visual do lenho, diminuindo assim seu valor comercial. Os gêneros de maior incidência, tais como *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*, são fungos cosmopolitas, saprófitos e, que apresentam tolerância a diversos ingredientes ativos e a elevadas concentrações de soluções preservativas usadas pela indústria florestal. Atualmente, diversas pesquisas têm sido realizadas em torno do tratamento da madeira com microrganismos biocontroladores, principalmente com bactérias e cepas albinas de manchadores. Com o objetivo de identificar isolados de bactérias e actinomicetes antagonistas de fungos emboloradores e manchadores da madeira de pinus, em condições brasileiras e controladas, procedeu-se o isolamento de possíveis agentes biocontroladores, os quais foram submetidos a testes *in vitro* e *in natura*. Neste estudo foram identificados isolados antagonistas dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e de *Actinomycetes*, que apresentaram efeito antagônico, tanto *in vitro* quanto *in natura*.

Palavras-chave: Biodeterioração. Preservação da madeira. Antagonismo. *Bacillus*. *Pseudomonas*. *Actinomycetes*.

8.2 ABSTRACT

Mold and staining fungi, causers of superficial and internal spots in the pinus wood, can compromise mainly the visual aspect of the log, diminishing its commercial value. The genera with bigger incidence, like *Penicillium*, *Aspergillus* and *Trichoderma*, are cosmopolitan and saprophyte fungi that have tolerance to diverse active ingredients and raised concentrations of preservative solutions used in the forest industry. Currently, many researches have been performed about the treatment of the pinus

wood with biocontrollers, mainly with bacteria and albino strain of staining fungi. With the objective to isolate and identify antagonistic bacteria and actinomycetes of mold and staining fungi of the wood, in Brazilian and controlled conditions, proceeded the isolation from possible biocontrollers, which were submitted to *in vitro* and *in natura* tests. In this study we isolated antagonists of the genera *Bacillus*, *Pseudomonas* and of *Actinomycetes*, that had presented antagonistic effect *in vitro* and *in natura*.

Keywords: Biodeterioration. Wood preservation. Antagonism. *Bacillus*. *Pseudomonas*. *Actinomycetes*.

8.3 INTRODUÇÃO

Fungos emboloradores são agentes causais de manchas superficiais de aspecto pulverulento, constituído principalmente por massas de esporos e, que podem comprometer principalmente o aspecto visual do lenho (OLIVEIRA et al., 1986; LEPAGE, 1986 a e b; ZABEL e MORRELL, 1992). Embora a pigmentação induzidas por estes agentes na madeira de *Pinus* spp. possa ser removida pelo processo de aplainamento, a incidência destes está relacionada à redução na resistência ao impacto e no aumento da permeabilidade, fatores estes que prejudicam a absorção de preservativos (SCHEFFER, 1973; OLIVEIRA et al., 1986).

Os fungos manchadores causam a pigmentação da madeira devido à presença de hifas pigmentadas ou hialinas, que secretam substâncias coloridas (OLIVEIRA et al., 1986; ZIMMERMAN et al., 1993); essa alteração pode ser observada em cortes transversais, distribuída radialmente, devido à colonização das células do parênquima radial (OLIVEIRA et al., 1986; FURTADO, 2000). Além de diminuir o valor comercial da madeira, a presença de manchadores compromete a resistência ao impacto e à flexão e, à dureza da madeira de *Pinus* spp. (SCHEFFER, 1973; SEIFERT, 1993).

Várias espécies de emboloradores e manchadores apresentam tolerância a diversos ingredientes ativos e a elevadas concentrações de soluções preservativas usadas pela indústria florestal (SCHEFFER, 1973). Como tratamento químico da madeira apresenta custo elevado e, torna-se inviável para o tratamento de peças grandes e de grandes quantidades, além de serem altamente tóxicos e

biocidas, atualmente têm-se sugerido o tratamento da madeira com microrganismos biocontroladores, principalmente com o emprego de bactérias e cepas albinas de manchadores (ABRAHAM et al., 1997; JIN e MORRELL, 1996; YANG, 1998; HELD et al., 2003). Embora diversos trabalhos tenham sido realizados nessa área, poucos produtos comerciais para o controle biológico têm sido desenvolvidos (BRUCE et al., 2003).

Com o objetivo de identificar isolados de bactérias e actinomicetes antagonistas de fungos emboloradores e manchadores da madeira de *Pinus* spp., em condições brasileiras e controladas, procedeu-se o isolamento de possíveis agentes biocontroladores, os quais foram submetidos a testes *in vitro* e *in natura*.

8.4 MATERIAL E MÉTODOS

8.4.1 Isolados de Fungos Pigmentadores da Madeira de *Pinus* spp.

Fungos causadores de emboloramento em madeira de *Pinus* spp. *Aspergillus niger* (CM E 37, CM E 70B), *Penicillium citrinum* (CM E 101), *Penicillium lividum* (CM E 170), *Trichoderma atroviride* (CM E 160B, CM E 173V), *Trichoderma pseudoloningii* (CM E 17), *Trichoderma viride* (CM E 172), *Trichoderma harzianum* (CM E 32B); e, fungos causadores de manchamento *Epicoccum purpurascens* (CM M MM), *Fusarium* sp. (CM M 56), *Fusarium avenaceum* (CM M 29), *Fusarium oxysporum* (CM M 70, CM M 103, CM M 114, CM M 165), *Fusarium solani* (CM M 41B, CM M 59), *Lasiodiplodia theobromae* (CM M 7, CM M 10, CM M 43, CM M 155, CM M 173P), *Paecilomyces lilacinus* (CM M 140) e *Pestalotiopsis palustris* (CM M 139B), foram isolados de madeira recém-serrada provenientes de serrarias localizadas nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo, em meio de cultura extrato de malte-ágar 3% e mantidos em meio BDA, a 22 °C sob fotoperíodo de 12 horas.

8.4.2 Isolamento e Seleção de Possíveis Biocontroladores de Fungos Emboloradores e Manchadores

Nove isolados bacterianos e de actinomicetes pertencentes à Coleção de Microrganismos da Fitopatologia-Agronomia (UEL), testados em experimentos anteriores e reconhecidos como bons antagonistas de fungos fitopatogênicos, foram selecionados e utilizados neste experimento (Tabela 8.1).

Tabela 8.1 – Isolados da Coleção de Microrganismos da Fitopatologia-Agronomia (UEL), testados quanto ao efeito antagonista contra fungos emboloradores e manchadores da madeira de *Pinus* spp.

Procedência	Microrganismo	Isolado	Procedência	
Coleção de Microrganismos da Fitopatologia - Agronomia (UEL)	Bactérias não identificadas	CA7P	Rizosfera de aveia	
		DA5P	Rizosfera de aveia	
		Esc. 2		
	<i>Actinomyces</i> spp.	CAQUI		
		Débora	Ovos de <i>Meloidogyne paranaensis</i>	
		A8	Solos de áreas de cultivo de milho	
		A16	Solos de áreas de cultivo de milho	
	<i>Pseudomonas</i> spp.	P10	Solos de áreas de cultivo de milho	
		P44	Solos de áreas de cultivo de milho	

Amostras de madeira de *Pinus* spp. assintomáticas, coletadas em serrarias do Estado do Paraná, foram plaqueadas nos meios de cultura ágar-nutriente, King B, meio seletivo para *Pseudomonas fluorescens* e meio de Jensen, visando a obtenção de isolados de bactérias e actinomicetes biocontroladores a fungos emboloradores e manchadores da madeira de *Pinus* spp.

Colônias desenvolvidas sobre os meios de cultura, após dez dias de incubação em câmeras de crescimento tipo BOD, a 22 °C (± 2 °C) e fotoperíodo de 12 horas, foram repicadas para tubos de ensaio contendo meio de cultura ágar-nutriente e identificadas para posteriores avaliações.

8.4.3 Teste de Antagonismo a Fungos Emboloradores e Manchadores *In Vitro*

Para a avaliação da ação fungistática dos isolados de bactérias e actinomicetes contra os isolados de fungos emboloradores e manchadores da madeira de *Pinus* spp., foi empregada a metodologia de cultura pareada, descrita por Mariano (2002).

Para a realização deste procedimento os isolados bacterianos e de actinomicetes foram cultivados em meio de cultura ágar-nutriente e meio de Jensen, e, incubados em câmaras do tipo BOD a 22 °C (\pm 2 °C), sob fotoperíodo de 12 horas, durante três e cinco dias, respectivamente. Os fungos emboloradores e manchadores foram cultivados em meio BDA e incubados a 22 °C (\pm 2 °C), sob fotoperíodo de 12 horas, por sete dias.

Como preconizado por Mariano (2002), ao centro de cada placa de Petri contendo meio BDA foi realizada uma estria central com os isolados antagonistas e, eqüidistantes 2,5 cm da mesma, foram dispostos dois discos de 0,8 mm de micélio de fungos emboloradores e manchadores. A incubação destas placas ocorreu em câmara de crescimento tipo BOD a 22 °C (\pm 2 °C), sob fotoperíodo de 12 horas, sendo utilizadas como controle placas com meio BDA, para as quais foram repicados somente os agentes causais de pigmentação (Fig. 8.1).

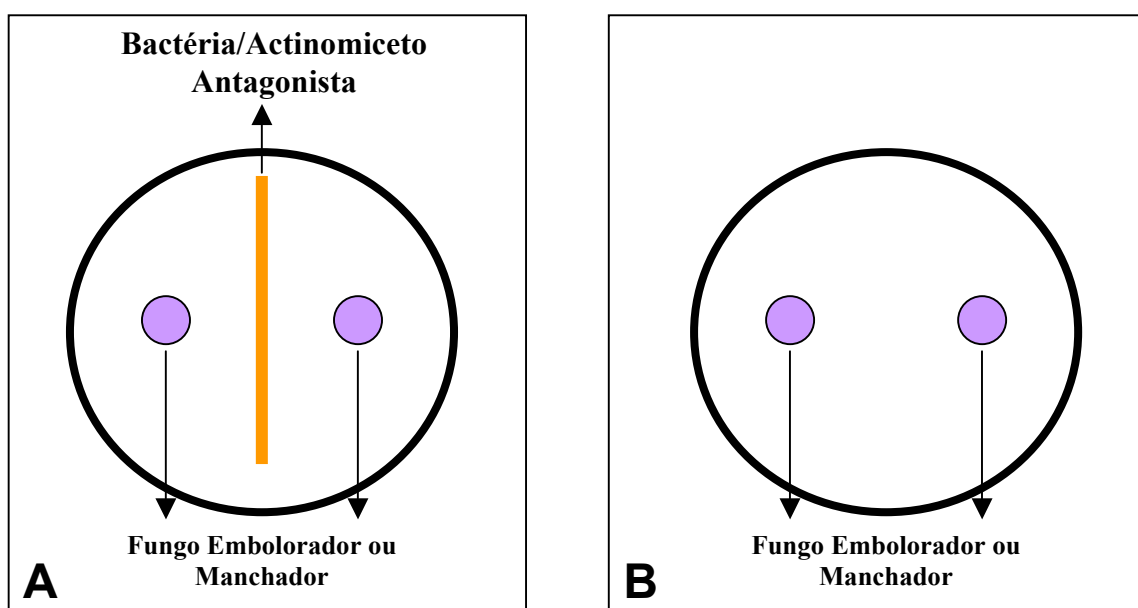


Figura 8.1 – Esquema para montagem do experimento de culturas pareadas (MARIANO, 2002). Fungo embolorador ou manchador versus bactéria/ actinomicete antagonista (A). Testemunha (B).

Para avaliação da inibição do crescimento dos emboloradores e manchadores, procedeu-se a mensuração do crescimento radial (em centímetros) das colônias aos 3, 5 e 7 dias da incubação. Os cálculos dos percentuais de redução do crescimento fúngico foram realizados com base na diferença entre a distância total e a distância real das hifas dos fungos pigmentadores e da risca bacteriana/de actinomicete ao sétimo dia de incubação.

Foram avaliadas cinco repetições, em delineamento experimental de blocos inteiramente casualizados. Os dados obtidos analisados no programa SISVAR versão 4.6 para o teste de Tukey a 5% de significância.

8.4.4 Biocontrole de Fungos Emboloradores e Manchadores em Blocos de *Pinus* spp.

8.4.4.1 Obtenção de solução de exudatos produzida por antagonistas

Para a obtenção de solução de exudatos das bactérias e actinomicetes antagonistas, procedeu-se o cultivo destes em Erlenmeyers de 250 ml, contendo 100 ml do meio de cultura líquido BD (batata e dextrose) e Jensen líquido, respectivamente, incubados a 20 °C (± 2 °C) sob agitação contínua, em escuro, durante cinco dias. As soluções contendo células e exudatos das bactérias e actinomicetes antagonistas obtidas foram filtradas com o auxílio de Kitassato e membrana de celulose com poros de 0,22 μ m (Millipore) até obtenção de suspensão livre de células, contendo apenas exudatos (Fig. 8.2). Para garantir que a solução filtrada não apresentava células bacterianas e de actinomicetes, alíquotas destes foram analisadas em microscópio óptico.

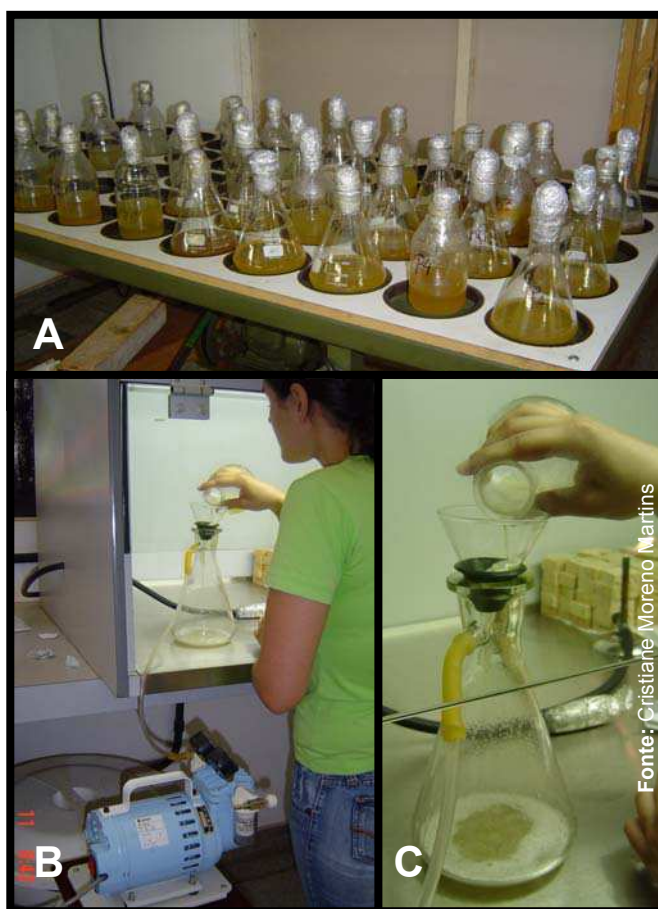


Figura 8.2 – Isolados de bactérias e actinomicetes antagonistas em meio BD (batata e dextrose) e Jensen líquido (A). Filtragem da solução bacteriana e de actinomicetes, com o auxílio de Kitassato e membrana de celulose (B e C).

8.4.4.2 Teste de antagonismo a fungos pigmentadores *in natura*

Para a realização desse experimento, blocos de madeira de *Pinus* spp. com dimensões de 5 x 4 x 2,5 cm, contendo dois orifícios com aproximadamente 0,8 mm de diâmetro e 1,25 cm de profundidade, foram submetidos à desinfecção através da imersão em álcool 70% por 2 minutos, seguido por 2 minutos em água destilada estéril e, a seguir, depositados sobre quatro folhas de papel filtro estéril, para retirada do excesso de água.

A inoculação destes blocos foi realizada transferindo-se dois discos de micélio de fungos emboloradores e pigmentadores, com aproximadamente 0,8 mm retirados de colônias desenvolvidas durante sete dias, para cada um dos orifícios, tendo o cuidado para que a superfície de crescimento do fungo sempre ficasse voltada para o lenho. Na seqüência procedeu-se a vedação dos orifícios

inoculados com filme plástico de PVC (Fig. 8.3).

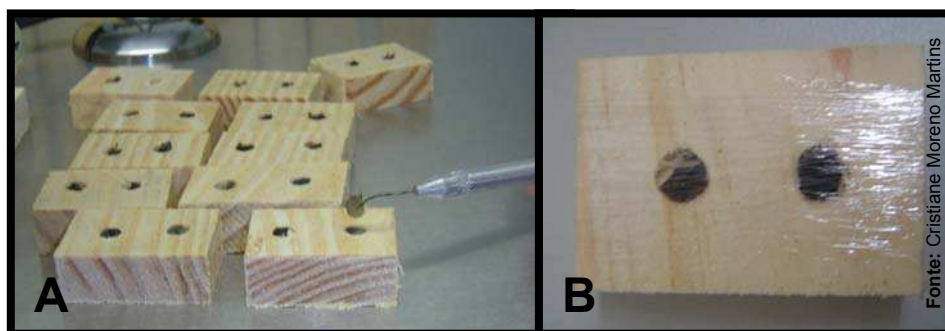


Figura 8.3 – Inoculação dos discos de micélio de fungo embolorador em blocos de madeira de *Pinus* spp. (A). Bloco inoculado e vedado com filme plástico de PVC.

Aos quinze dias da inoculação, em condição de ambiente de laboratório, procedeu-se o tratamento com os biocontroladores (isolados de bactérias e actinomicetes), imergindo-se os blocos de madeira, durante 2 minutos, em solução de exudato produzido pelos respectivos antagonistas. Após, os mesmos foram vedados e submetidos à incubação, durante 21 dias, em condições de laboratório. A testemunha consistiu de: (a) blocos de madeira sem a inoculação de emboloradores e manchadores e, sem o tratamento com os biocontroladores; e, (b) inoculação dos emboloradores e manchadores, sem o tratamento com biocontroladores.

Para a avaliação da real capacidade de antagonismo dos isolados testados os blocos foram seccionados longitudinalmente, verificando assim a presença ou ausência de pigmentação e, nos casos positivos, mensurou-se a área pigmentada quanto à extensão e a intensidade dos sinais e manchas, conforme a escala proposta por Benko e Highley (1990). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento/isolado de embolorador e manchador.

8.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.5.1 Isolamento e Seleção de Possíveis Biocontroladores de Fungos Pigmentadores da Madeira de *Pinus* spp.

Após o isolamento de bactérias e actinomicetes de madeira de *Pinus* spp. assintomáticas e, com base na capacidade de crescimento e colonização do meio de cultura BDA, foram selecionados um isolado de actinomicete, dois de *Bacillus* spp., dois isolados de *Pseudomonas* spp. e, dois de *Pseudomonas fluorescens* (Tabela 8.2). Os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* foram escolhidos, pois trabalhos anteriores indicam estes como sendo controladores de fungos emboloradore e manchadores, em testes laboratoriais (BENKO, 1988; SEIFERT et al., 1988; KREBER e MORRELL, 1993).

Tabela 8.2 – Isolados de actinomicetes e bactérias obtidos a partir de amostras de madeira de *Pinus* spp. assintomática e, testados quanto ao efeito antagonista a fungos emboloradores e manchadores

Microrganismo	Isolado
<i>Actinomyces</i> spp.	A6
<i>Bacillus</i> spp.	B1
	B3
<i>Pseudomonas</i> spp.	P3
	P4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pf1
	Pf2

8.5.2 Teste de Antagonismo *In Vitro*

8.5.2.1 Fungos emboloradores

Através das avaliações da capacidade de antagonismo contra fungos emboloradores da madeira de *Pinus* spp., foi possível observar que, de modo

geral, os isolados de actinomicetes foram mais eficazes do que os bacterianos. Apresentaram grande capacidade de antagonismo os isolados de actinomicetes A6, A8 e A16 e, o isolado bacteriano DA5P, apresentando antagonização média de 63,9, 34,8, 19,2 e 45,6%, respectivamente, dos fungos emboloradores da madeira de *Pinus* spp.

Para *Aspergillus niger*, os melhores resultados de antagonismo foram observados com os isolados DA5P, A6 e A16, respectivamente; para o gênero *Penicillium*, foram mais eficazes os isolados A6, A16 e DA5P; o gênero *Trichoderma* demonstrou maior sensibilidade aos isolados A6, A8 e DA5P (Fig. 8.4) (Tabela 8.3).

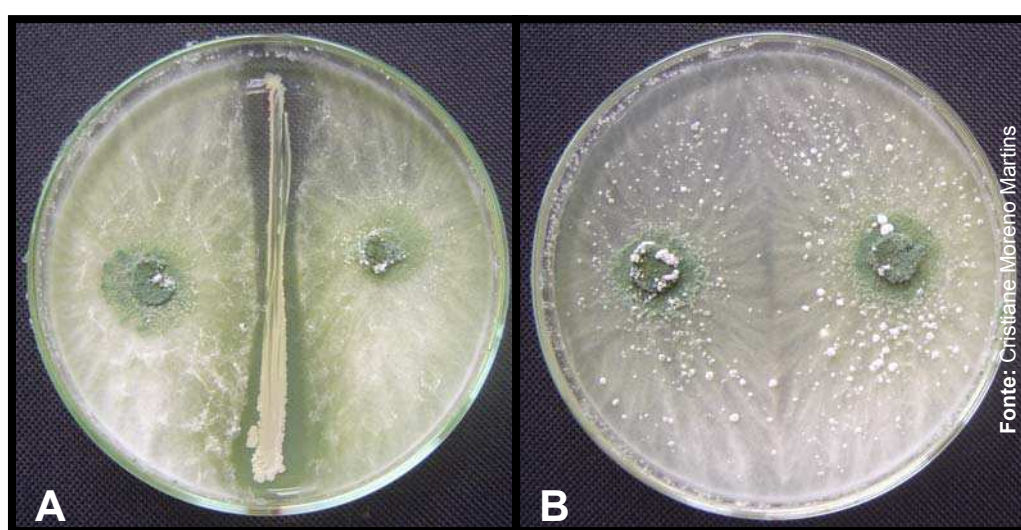


Figura 8.4 – Capacidade de antagonismo, *in vitro*, do isolado bacteriano DA5P contra o fungo embolorador do gênero *Trichoderma* (A). Testemunha (B).

Tabela 8.3 – Inibição do crescimento vegetativo (%), provocada por isolados bacterianos e de actinomicetes sobre fungos emboloradores da madeira de *Pinus* spp., *in vitro*

Microrganismos Antagonistas	<i>Penicillium</i>		<i>Aspergillus</i>		<i>Trichoderma</i>				
	CM E 101	CM E 170	CM E 37	CM E 70	CM E 17	CM E 172	CM E 160B	CM E 173V	CM E 32B
B1	0,0 d F	0,0 d F	0,0 e F	0,0 d F	4,5 def B	2,3 ef D	4,2 de C	10,9 de A	2,0 ghi E
B3	0,0 d D	0,0 d D	0,0 e D	9,6 cd A	2,5 ef C	0,0 f D	0,0 e D	5,3 ef B	0,0 i D
P3	0,0 d G	0,0 d G	15,6 cd A	0,0 d G	6,2 def D	8,6 de C	5,6 cde E	11,1 de B	5,3 fgh F
P4	0,0 d F	0,0 d F	0,0 e F	0,0 d F	4,0 def C	1,7 ef D	4,5 de B	11,1 de A	0,6 i E
P10	0,0 d E	0,5 d D	0,0 e E	0,7 d C	2,3 ef B	0,0 f E	2,3 de B	7,1 ef A	0,0 i E
P44	0,0 d E	2,3 cd B	0,0 e E	0,0 d E	2,3 ef B	0,0 f E	0,8 e C	7,1 ef A	0,4 i D
Pf 1	0,0 d G	0,0 e G	5,6 de F	0,0 d G	9,8 cde D	11,6 de B	11,1 cde C	15,6 cd A	7,1 fgh E
Pf 2	0,0 d F	0,0 e F	19,3 cd A	0,0 d F	2,4 ed D	0,0 f F	11,0 de B	7,3 ef C	0,2 i E
CA7P	0,0 d F	0,0 e F	0,0 e F	0,0 d F	15,0 cde C	16,3 de B	14,6 cde D	27,8 cd A	14,1 e E
DA5P	16,6 c H	16,4 b I	80,2 a B	80,9 a A	47,3 b D	44,6 c E	35,8 b G	40,2 b F	48,4 c C
Esc. 2	4,7 d H	0,0 d I	7,8 cde F	30,6 b A	11,8 cde D	12,9 de C	8,6 cde E	14,1 de B	5,9 fgh G
CAQUI	0,0 d H	0,0 d H	3,3 de D	16,8 cd A	3,2 ef E	0,6 ef G	3,4 de C	9,9 de B	1,0 hi F
Débora	0,0 d F	0,0 d F	0,0 e F	0,6 d E	2,3 ef C	0,0 f F	2,0 de D	7,0 ef B	42,8 d A
A6	78,1 a B	17,7 b H	61,4 b G	78,1 a B	66,1 a C	80,9 a A	63,0 a F	65,0 a D	64,5 a E
A8	7,3 d F	7,3 cd F	3,9 de G	0,1 d H	63,8 a A	55,4 b E	57,8 a C	59,8 a B	57,5 b B
A16	38,6 b B	38,6 a D	54,5 b A	29,6 b C	2,0 ef G	0,0 f H	2,4 de F	7,1 ef E	0,0 i H
Testemunha	0,1 d E	0,1 d F	0,0 e E	6,6 cd A	0,0 f F	0,0 f F	0,7 e C	2,4 f B	0,6 i D
CV (%)	5,79	4,24	9,41	8,15	5,89	6,08	7,34	4,83	3,31
DMS	8,34	6,41	12,62	10,92	7,93	8,24	10,06	6,25	4,44

** Valores totais seguidos pela mesma letra minúscula no sentido vertical e maiúsculas no sentido horizontal não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

8.5.2.2 Fungos manchadores

De modo geral, os isolados DA5P, A6 e Esc. 2 inibiram o crescimento fúngico de todos os isolados de fungos manchadores testados, com destaque de tal efeito sobre os isolados CM M 70, da espécie *Fusarium oxysporum*, CM M 139B, *Pestalotiopsis palustris*, CM M 140, *Paecilomyces lilacinus*, e CM M MM, *Epicoccum purpurascens*.

É possível concluir que o gênero *Fusarium* é mais suscetível aos isolados bacterianos DA5P e Esc. 2 e, ao actinomiceto A6. O gênero *Lasiodiplodia* apresentou maior sensibilidade aos isolados A16, A6 e A8, respectivamente. Já a espécie *Epicoccum purpurascens* é visivelmente mais sensível aos isolados A6, A16 e DA5P; *Paecilomyces lilacinus*, diferentemente, possui maior sensibilidade contra isolados bacterianos, sendo os mais eficientes DA5P, B3 e Esc. 2; os isolados que apresentaram maior porcentagem de antagonização a espécie *Pestalotiopsis palustris* foram DA5P, A16 e A6 (Fig. 8.5) (Tabela 8.4).

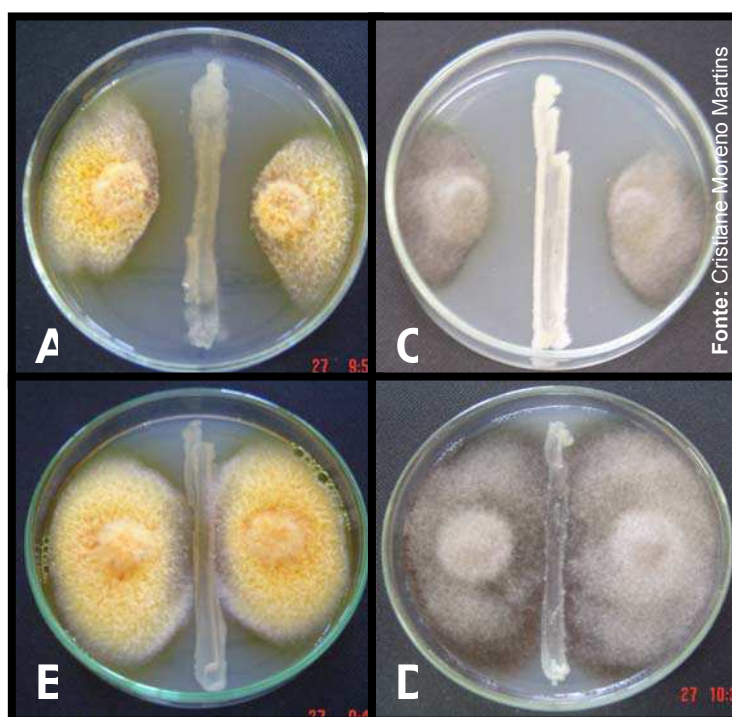


Figura 8.5 – Fungo *Epicoccum purpurascens* sendo antagonizado pelo isolado de actinomicete A16 (A) e, não sofrendo antagonismo significativo pelo isolado bacteriano P3 (B). Fungo *Lasiodiplodia theobromae* sendo antagonizado pelo isolado A16 (C) e, não sofrendo antagonismo pelo isolado de bactéria B3 (D).

Tabela 8.4 – Inibição do crescimento vegetativo (%), provocada por isolados bacterianos e de actinomicetes sobre fungos manchadores da madeira de *Pinus* spp., *in vitro*

Microrganismos Antagonistas	<i>Epicoccum</i>		<i>Fusarium</i>					<i>Lasiodiplodia</i>			<i>Paecilomyces Pestalotiopsis</i>	
	CM M MM	CM M 29	CM M 41B	CM M 56	CM M 70B	CM M 07	CM M 43	CM M 155	CM M 173P	CM M 140	CM M 139B	
B1	20,7 defg B	3,9 c D	0,0 g F	0,0 e F	0,0 e F	7,3 ef C	0,0 e F	2,7 de E	1,3 g F	32,7 de A	0,0 f F	
B3	29,1 cd B	3,1 c F	0,0 g I	4,2 de E	8,7 d C	5,3 efg D	0,0 e I	2,0 e G	0,6 g H	60,1 ab A	0,0 f I	
P3	4,9 h F	2,8 c H	0,0 g I	1,0 e I	0,0 e I	11,1 de C	3,9 de G	7,3 de D	5,3 ef E	50,5 abc A	15,6 e B	
P4	9,5 gh B	0,8 c F	0,0 g G	1,0 e G	0,0 e G	4,5 fg C	0,0 e G	3,1 de D	2,3 fg E	48,0 bc A	0,0 f G	
P10	2,0 h D	0,5 c G	22,7 c A	1,0 e H	0,0 e H	7,3 ef B	0,5 e G	2,4 de C	0,6 g F	1,4 h E	0,0 f H	
P44	28,2 cd C	8,2 c E	17,7 cd D	80,9 a A	0,2 e I	7,1 ef F	0,0 e J	3,5 de G	2,3 fg H	43,6 cd B	0,0 f J	
Pf 1	14,6 efgh C	0,0 c H	0,0 g H	0,0 e H	0,6 e G	5,6 efg D	0,0 e H	3,5 de E	2,5 fg F	56,4 ab A	19,2 e B	
Pf 2	24,8 cdef D	6,2 c G	0,0 g H	0,0 e H	0,0 e H	14,6 de C	8,6 d F	9,7 d E	10,0 d D	55,2 abc A	0,0 f H	
CA7P	29,7 cd D	7,9 c C	0,0 g G	0,0 e G	0,0 e G	7,0 ef D	0,0 e G	3,4 de E	2,4 fg F	55,2 abc A	0,0 f G	
DA5P	43,8 b E	25,3 b G	35,8 b F	55,9 b D	78,4 a B	24,9 c H	20,8 c K	24,4 c I	23,5 c J	62,7 a C	79,2 a A	
Esc. 2	35,3 bc E	47,3 a D	55,7 a B	54,2 b C	30,6 b G	9,9 def H	4,3 de J	6,1 de I	3,2 fg K	58,9 ab A	31,0 d F	
CAQUI	27,3 cdef A	24,9 b C	9,7 def G	1,3 e K	16,6 c D	14,0 d E	7,6 d I	9,8 d F	8,8 de H	25,4 ef B	7,3 f J	
Débora	12,3 fgh C	5,0 c E	2,3 efg G	17,7 c B	0,6 e J	5,3 efg D	0,0 e K	3,4 de F	1,0 g I	29,9 ef A	2,0 f H	
A6	63,8 a B	24,9 b I	16,8 cd J	9,6 d K	76,6 a A	41,8 a D	35,0 a G	36,6 ab F	37,1 a G	26,4 ef H	44,6 c C	
A8	9,7 gh H	27,1 b E	9,9 def G	3,2 de J	7,1 d I	32,3 b A	27,6 b D	29,4 bc B	28,6 b C	14,1 fg F	0,0 f K	
A16	63,6 a A	2,3 c I	0,6 fg J	0,0 e K	29,4 b G	43,8 a C	35,9 c F	37,7 ab E	38,2 a D	8,9 gh H	57,0 b B	
Testemunha	1,7 h B	0,0 c G	0,0 g G	0,5 e C	0,0 e G	0,1 g F	0,0 e G	0,2 e E	0,0 g G	3,2 gh A	0,3 f D	
CV (%)	10,90	8,60	6,53	4,86	4,62	4,78	4,46	5,41	2,73	12,38	5,95	
DMS	12,90	12,13	9,24	6,63	6,20	6,46	6,42	7,58	3,87	12,23	7,96	

** Valores totais seguidos pela mesma letra minúscula no sentido vertical e maiúsculas no sentido horizontal não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

8.5.3 Biocontrole em Blocos de *Pinus* spp.

8.5.3.1 Fungos emboloradores

Ao final das avaliações para a determinação da capacidade de antagonismo de bactérias e actinomicetes contra fungos emboloradores isolados da madeira de *Pinus* spp., foi constatado que blocos de madeira, quando inoculados com fungos do gênero *Trichoderma*, espécies *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. pseudokoningii* e *T. viride*, apresentaram redução no desenvolvimento do emboloramento quando submetidos a tratamento com solução de exudatos do isolado bacteriano Pf1, seguido dos isolados P4, P3 e Débora (Fig. 8.6).

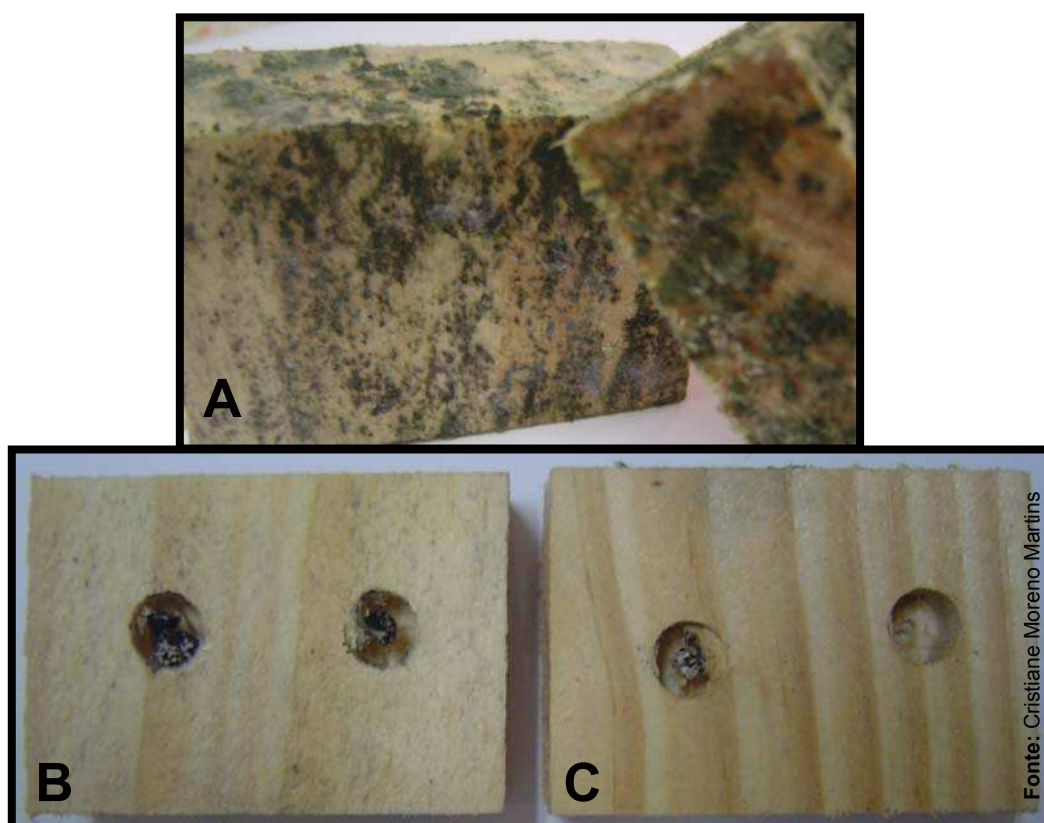


Figura 8.6 – Blocos de madeira de *Pinus* spp. inoculados com o fungo *Trichoderma pseudokoningii*, causador de emboloramento (testemunha) (A). Blocos tratados com exudatos bacterianos dos isolados de *Pseudomonas* sp. P4 (B) e *Pseudomonas fluorescens* Pf1 (C).

Redução significativa do emboloramento em blocos inoculados com o gênero *Penicillium*, espécies *P. citrinum* e *P. lividum*, foi observada quando estes

foram tratados com exudatos bacterianos P10 e B3. Através da avaliação do antagonismo sobre fungos do gênero *Aspergillus*, verificou-se que os exudatos do isolado bacteriano B3 e do actinomicete A16, afetaram o desenvolvimento fúngico.

Em geral, a maioria dos isolados bacterianos e de actinomicetes apresentaram algum grau de antagonismo contra os fungos emboloradores testados, merecendo destaque os isolados B3, Esc. 2 e Débora (Tabela 8.5).

Tabela 8.5 – Avaliação da capacidade de antagonismo de isolados bacterianos e de actinomicetes sobre a ação de fungos emboloradores inoculados em madeira de *Pinus* spp., segundo Escala de Mancharmento de Benko e Highley (1990c).

Antagonistas	<i>P. citrinum</i> CM E 101	<i>P. lividum</i> CM E 170	<i>A. niger</i> CM E 37	<i>A. niger</i> CM E 70	<i>T. pseudokoningii</i> CM E 17	<i>T. viride</i> CM E 172	<i>T. atroviride</i> CM E 160B	<i>T. atroviride</i> CM E 173V	<i>T. harzianum</i> CM E 32B
P3	2	1	2	0	1	2	1	1	0
P4	2	2	1	2	1	1	1	1	1
P10	1	1	2	0	1	2	2	3	2
P44	0	2	2	2	3	2	2	2	2
Pf1	2	2	1	2	0	1	1	1	1
Pf2	2	3	2	0	1	1	2	1	0
B1	0	2	2	1	1	2	3	2	2
B3	1	1	1	0	2	2	2	2	1
CA7P	2	3	1	2	2	2	3	1	2
DA5P	2	2	1	1	2	1	2	1	2
Esc. 2	1	2	1	2	2	2	1	1	0
CAQUI	1	2	1	2	2	1	3	3	2
Débora	2	0	2	0	1	1	1	0	2
A6	1	3	2	1	2	3	3	3	2
A8	0	3	2	1	1	1	1	1	2
A16	1	3	1	0	2	1	2	1	2
Test	2	3	2	2	3	3	3	3	3

Benko e Highley (1990a) também obtiveram sucesso no antagonismo a *Trichoderma harzianum* inoculado em blocos de *Pinus* spp., através da imersão dos blocos em solução em esporulação de um “pull” bacteriano contendo as espécies *Pseudomonas cepaci*, *Streptomyces chrestomycticus*, *S. rimosus*, *S. cinnamomeum* e *Xenorhabdus luminescent*.

Embora o uso de actinomicetes e bactérias como antagonistas de fungos emboloradores da madeira de *Pinus* spp. tenha sido eficiente, este experimento demonstrou que nem sempre o mesmo efeito antagônico pode ser observado *in vitro* e *in natura*, uma vez estes microrganismo podem se comportar de maneira distinta, quando empregados em diferentes condições.

Segundo a literatura, o controle biológico de fungos pigmentadores da madeira, utilizando de bactérias, pode ser mais efetivo com o uso de diferentes combinações de bactérias, sendo pouco provável que uma única espécie seja eficaz contra várias espécies de fungos (BENKO e HIGHLEY, 1990a).

8.5.3.2 Fungos manchadores

Com base nos resultados obtidos através da avaliação do grau de antagonismo de exudatos de bactérias e actinomicetes sobre o desenvolvimento de isolados de fungos manchadores de madeira de *Pinus* spp. (Tabela 8.6), observou-se que blocos inoculados com isolados do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, quando submetidos ao tratamento com exudatos bacterianos dos isolados Débora, seguido pelos isolados DA5P e Pf1, apresentaram redução no desenvolvimento fúngico (Fig. 8.7).

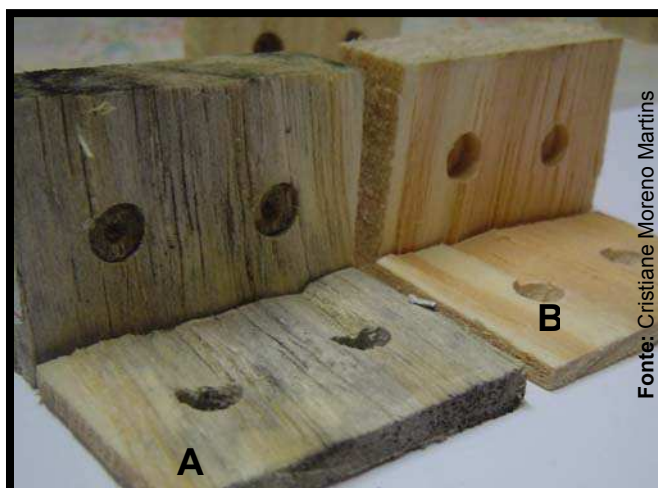


Figura 8.7 – Blocos de madeira de *Pinus* spp. inoculados com o fungo manchador *Lasiodiplodia theobromae* e não tratado com exudatos bacterianos e de actinomicetes (testemunha) (A) e, tratado com exudato bacteriano do isolado DA5P (B).

Tabela 8.6 – Avaliação da capacidade de antagonismo de isolados bacterianos e de actinomicetes sobre a ação de fungos manchadores inoculados em madeira de *Pinus* spp., segundo Escala de Manchamento de Benko e Highley (1990c).

ANTAGONISTAS	<i>Epicoccum purpurascens</i> CM M MM	<i>Fusarium avenaceum</i> CM M 29	<i>Fusarium solani</i> CM M 41B	<i>Fusarium</i> spp. CM M 56	<i>Fusarium oxysporum</i> CM M 70B	<i>Fusarium solani</i> CM M 167	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> CM M 07	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> CM M 43	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> CM M 155	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> CM M 173P	<i>Paecilomyces lilacinus</i> CM M 140	<i>Pestalotiopsis palustris</i> CM M139B
P3	1	0	0	2	2	2	3	1	2	2	2	1
P4	1	0	0	1	2	1	2	2	0	1	1	0
P10	0	0	0	0	3	2	3	1	2	2	0	1
P44	2	2	0	1	2	2	3	0	1	2	2	0
Pf1	1	0	2	1	2	1	3	0	0	2	1	1
Pf2	1	0	2	1	2	2	2	1	0	2	2	1
B1	2	1	2	2	2	3	3	2	2	1	1	2
B3	0	0	2	2	2	2	2	1	0	1	0	0
CA7P	1	1	1	1	2	2	3	0	2	1	1	1
DA5P	0	0	0	1	2	2	1	2	2	0	2	1
Esc. 2	0	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2	1
CAQUI	0	2	2	2	3	2	2	2	2	0	0	3
Débora	1	0	2	1	2	1	0	0	0	0	0	0
A6	0	0	0	1	1	2	2	1	0	2	0	3
A8	0	0	1	2	3	2	2	2	2	2	0	2
A16	1	2	0	0	2	2	2	2	2	1	2	2
Testemunha	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	3

Quando os blocos foram inoculados com o gênero *Fusarium*, espécies *F. solani*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum* e *Fusarium sp.*, foi observado redução no desenvolvimento fúngico quando estes foram tratados com exudatos do isolado bacteriano P4 e do actinomicete A6 (Fig. 8.8).

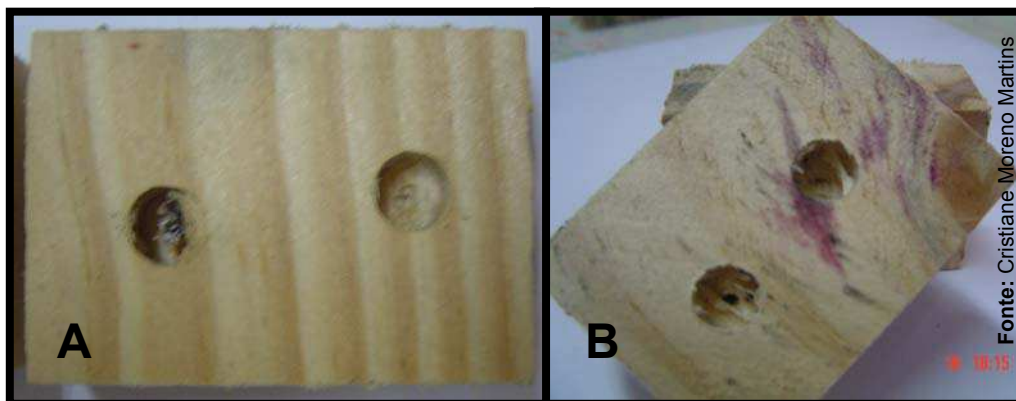


Figura 8.8 – Bloco de madeira de *Pinus* spp. inoculados com o fungo manchador *Fusarium oxysporum* e tratado com o exudato obtido da bactéria P4 (A) e, testemunha não tratada com exudatos (B).

Já os resultados das avaliações realizadas com blocos inoculados com os fungos *Epicoccum purpuracens*, *Pestalotiopsis palustris* e *Paecilomyces lilacinus*, indicaram reação antagônica quando tratados com exudatos dos isolados B3, A6, A8 e Débora.

O mesmo pode ser observado por Benko e Highley (1990c), quando se testou uma suspensão contendo bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Streptoverticillium* e *Xenorhabdus*, que foi capaz de reduzir o grau de manchamento causado por *Ceratocystis coerulea*.

Para a avaliação da capacidade de antagonismo de isolados bacterianos e de actinomicetes contra fungos manchadores da madeira de *Pinus* spp., observou-se que o método de avaliação *in natura* é mais preciso do que o *in vitro*, uma vez que este possui maior semelhança com as condições a campo.

Embora tenham sido obtidos bons resultados com a utilização de exudatos de um único isolado, Benko e Highley (1990a) preconizam que, para que o controle biológico possa ser efetivo contra um amplo espectro de fungos manchadores, é necessária a utilização de um pul bacteriano, sendo pouco provável que uma única espécie bacteriana possa ser eficaz contra uma gama de fungos manchadores de madeira.

8.6 CONCLUSÕES

Bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* e, *Actinomycetes* podem ser utilizados em testes laboratoriais, *in vitro* e *in natura*, como agentes biocontroladores de fungos emboloradores e manchadores da madeira de *Pinus* spp.

Testes laboratoriais revelaram que é possível utilizar bactérias e actinomicetos como biocontroladores destes fungos. Isolados A6, A8, A16, DA5P e Pf1, P4, P3 e Débora, demonstraram efeito antagônico sobre fungos emboloradores, *in vitro* e *in natura*, respectivamente; isolados DA5P, A6, Esc. 2 (*in vitro*) e DA5P e Pf1 (*in natura*), apresentam efeito antagônico sobre fungos manchadores, podendo ser empregados em futuros experimentos a campo.

9 CONCLUSÕES GERAIS

O método mais eficaz para o isolamento de fungos pigmentadores do lenho de *Pinus* spp. em condições brasileiras, são indicados a assepsia do material sintomático através da imersão em álcool 70%, seguido por lavagem em água destilada esterilizada, por dois minutos; plaqueamento de fragmentos de madeira em meio extrato de malte-ágar 3% e, incubação a 22 °C (± 2 °C), por 10 dias.

Para a avaliação da capacidade de colonização de fungo emboloradores e manchadores sobre a madeira e da capacidade de pigmentação, deve-se inocular os isolados em corpos de prova de *Pinus* spp. e, após 30 dias, realizar a avaliação fazendo uso da Escala de manchamento de Benko e Highley (1990c) e da Escala de notas proposta por Held et al. (2003).

Fungos emboloradores dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* e, fungos manchadores dos gêneros *Epicoccum*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Paecilomyces* e *Pestalotiopsis*, são agentes causais de pigmentação da madeira de *Pinus* spp., nos Estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo.

Como espécies de fungos mais agressivos, foram relatados os emboloradores *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma pseudokoningii* e *Penicillium lividum* e, o manchador *Lasiodiplodia theobromae*.

Isolados de *Actinomycetes*, *Pseudomonas* e *Bacillus* apresentam capacidade de antagonizar fungos emboloradores e manchadores da madeira de *Pinus* spp., *in vitro* e *in natura*, em testes laboratoriais.

Isolados A6, A8, A16, DA5P, Pf1, P4, P3 e Débora, demonstraram efeito antagônico sobre fungos emboloradores e, os isolados DA5P, A6, Esc. 2 e Pf1, apresentam efeito antagônico sobre fungos manchadores, podendo ser empregados em futuros experimentos a campo.

REFERÊNCIAS

- ABPM – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MADEIRA. Catálogo de Normas de Madeira Serrada, 2002. In: Classificação do Pinus. **Revista da Madeira**, Curitiba, n. 68, ano 12, dezembro de 2002. Disponível em: <<http://www.remade.com.br/revista/materia.php?edicao=68&id=254>>. Acesso em: dez. 2005.
- ABRAF – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF**: ano base 2005. Brasília: ABRAF, 2006. 80 p.
- ABRAHAM, L.; BREUIL, C.; BRADSHAW, D. E.; MORRIS, P. I.; BYRNE, T. Proteinases as potential targets for new generation anti-sapstain chemicals. **Forest Products Journal**, Madison, v. 47, n. 9, p. 57-62, 1997.
- AGRIZONIS, N. Crecimiento del manchado azul en rolas de pino caribe. **Boletim Técnico CVG-PROFORCA**, v. 9, p. 24-31, 1992.
- ALEMÁN B., I.; SÁNCHEZ C.; J. A.; SEALEY, M.; ROJAS, J. O.; CORCUERA, G. L. Empleo de una cepa de *Burkholderia cepacia* en el control de la mancha azul en la madera de pino caribe (*Pinus caribeeae*). **Ciencia**, v. 11, n. 1, p. 39-46, 2003.
- ALVES, M. V. G.; KOEHLER, H. S.; MELLO FILHO, B. de. Tendências e perspectivas para o setor florestal brasileiro. **International Union of Forest Research Organizations**. Disponível em: <<http://www.iufro.org/uploads/media/t1-alves-:/www.iufro.org/uploads/media/t1-alves-marcos-diag-for-br.pdf>>. Acesso em: 29 dez. 2006.
- APETORGBOR, M. M.; DARKWA, N. A.; FRIMPONG, O.; AGYEMAN, V. K. Biodeteriorating agents associated with three tropical timber species. **Forest Ecology and Management**, v. 195, n. 3, p. 311-323, 2004.
- AUER, C. G. **Doenças em Pinus no Brasil**. Colombo: IPEF, 2000. 8 p. (IPEF. Série Técnica IPEF, v. 13, n. 33, p. 67-74).
- BACHA, C. J. C.; BARROS, A. L. M. Reflorestamento no Brasil: evolução recente e perspectivas para o futuro. **Scientia Forestalis**, n. 66, p. 191-203. 2004.
- BALLARD, R. G.; WALSH, M. A.; COLE, W. E. The penetration and growth of bluestain fungi in the sapwood of lodgepole pine attacked by mountain pine beetle. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 1724-1729. 1984.

BNDES. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. **Programa de Plantio Comercial e Recuperação de Florestas**. Disponível em: <<http://www.bndes.gov.br/programas/agropecuarios/propflora.asp>>. Acesso em 08 jan. 2007.

BARNES, I.; ROUX, J.; WINGFIELD, B. D.; DUDZINSKI, M.; OLD, K. M.; WINGFIELD, M. J. *Cetarocystis pirilliformis*, a new species from *Eucalyptus nitens* in Australia. **Mycologia**, v. 95, p. 865-871. 2003.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. 3 ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1972. 241p.

BARRAS, S. J. Antagonism between *Dendroctonus frontalis* and the fungus *Ceratocystis minor*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 63, p. 1187-1190. 1970.

BARRAS, S. J. Reduction of progeny and development in the southern pine beetle following removal of symbiotic fungi. **Canadian Entomologist**, v. 105, p. 1295-1299. 1973.

BARRAS, S. J.; PERRY, T. J. Fungal symbionts in the prothoracic mycangium of *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae). **Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie**, v. 71, p. 95-104. 1972.

BASHAM, H. G. Wilt of loblolly pine inoculated with blue-stain fungi of the genus *Ceratocystis*. **Phytopathology**, v. 60, p. 750-754. 1970.

BEHRENDT, C. J. **Biological control of blue stain fungi in wood using a colorless strain of *Ophiostoma piliferum***. St. Paul: University of Minnesota, 1994. M. Sc. Thesis - University of Minnesota, Department of Plant Pathology, 1994.

BEHRENDT, C. J.; BLANCHETTE, R. A. Biological Processing of Pine Logs for Pulp and Paper. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1995-2000. 1997.

BEHRENDT, C. J.; BLANCHETTE, R. A.; FARRELL, R. L. An integrated approach, using biological and chemical control, to prevent blue stain in pine logs. **Canadian Journal of Botany**, Canadá, v. 73, n. 4, p. 613-619. 1995a.

BEHRENDT, C. J.; BLANCHETTE, R. A.; FARRELL, R. L. Biological control of blue-stain fungi in wood. **Phytopathology**, v. 85, n. 1, p. 92-97. 1995b.

BENKO, R. **Bacteria as possible organisms for biological control of blue stain.** International Research Group on Wood Preservation, doc. n. IRG/WP/1339. Available on the International Research Group on Wood Preservation, Box 5607, S-11428 Stockholm, Sweden. 1988.

BENKO, R. **Biological control of blue stain on wood with *Pseudomonas cepacia* 6253: laboratory and field test.** International Research Group on Wood Preservation, doc. n. IRG/WP/1380. Available on the International Research Group on Wood Preservation, Box 5607, S-11428 Stockholm, Sweden. 1989.

BENKO, R.; HENNINGSON, B. **Mycoparasitism of some white rot fungi on blue stain fungi in culture.** International Research Group on Wood Preservation, doc. n. IRG/WP/1339. 1986.

BENKO, R.; HIGHLEY, T. L. Biological Control of Wood-Attacking Fungi Using Bacteria. *Biodeterioration research*, v. 3, p. 327-332. 1990. In: LLEWELLYN, G. C.; O'REAR, C. E. (Ed.) **Biodeterioration Research 3: Proceedings of the 3^o meeting of the Pan American Biodeterioration Society**; 1989. New York: Plenum Press, p. 327-332. 1990a.

BENKO, R., HIGHLEY, T. L. Selection of media on screening interaction of wood attacking fungi and antagonistic bacteria. I. Interaction on agar. **Material und Organismen**, v. 25, p. 161-171. 1990b.

BENKO, R., HIGHLEY, T. L. Selection of media on screening interaction of wood attacking fungi and antagonistic bacteria. II. Interaction on wood. **Material und Organismen**, v. 25, p. 173-180. 1990c.

BERNIER JR., R.; DESROCHER, M.; JURASEK, L. Antagonistic effects between *Bacillus subtilis* and wood staining fungi. **Journal of the Institute of Wood Science**, v. 10, p. 214-216. 1986.

BERRYMAN, A. A. (Ed.) **Dynamics of Forest Insect Populations: Pattern, Causes, Implications.** New York: Plenum Press. 1988.

BERRYMAN, A. A. Resistance of conifers to invasion by bark beetle-fungus associations. **BioScience**, v. 22, p. 598-602, 1972.

BISSETT, J. A revision of the genus *Trichoderma* I. Section Longibrachiatum sect. nov. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, p. 924-931. 1984.

BLANCHETTE, R. A.; FARRELL, R. L.; BEHRENDT, C. J.; BURNES, T. A.; WENDLER, P. A.; BRUSH, T. S.; IVERSON, S. Biological treatment of pitch control and protection against sapstain in wood used for pulp and paper production. In: **Proceedings of the 7th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry**. Beijing: v. 2, pp. 591-595. 1993.

BLANCHETTE, R. A.; FARRELL, R. L.; BEHRENDT, C. J.; WHITE-MC-DOUGALL, W.; HELD, B. W. Application of biological control agents in the forest products industry. In: KREBER, B. (Ed.). **Strategies for Improving Protection of Logs and Lumber**. Forest Research Institute Bulletin n. 204, Rotorua, New Zealand. p. 81-85. 1997.

BLANCHETTE, R. A.; FARRELL, R. L.; BURNES, T. A.; WENDLER, P. A.; ZIMMERMAN, W.; BRUSH, T. S.; SNYDER, R. A. Biological control of pitch in pulp and paper production by *Ophiostoma piliferum*. **Tappi Journal**, v. 75, n. 12, p. 102-106. 1992.

BRAMBLE, W. C.; HOLST, E. C. Fungi associated with *Dendroctonus frontalis* in killing shortleaf pine and their effect on conduction. **Phytopathology**, v. 30, p. 881-899. 1940.

BRASIER, C. M.; KIRK, S. A. Sibling species within *Ophiostoma piceae*. **Mycological Research**, v. 97, p. 811-816. 1993.

BRIDGES, J. R.; MOSER, J. C. Role of two phoretic mites in transmission of bluestain fungus, *Ceratocystis minor*. **Ecological Entomology**, v. 8, p. 9-12. 1983.

BRIDGES, J. R.; NETTLETON, W. A.; CONNOR, M. D. Southern pine beetle (Coleoptera: Scolytidae) infestation without the blue stain fungus, *Ceratocystis minor*. **Journal of Economic Entomology**, v. 78, p. 325-327. 1985.

BRIGNOLAS, F.; LACROIX, B.; LIEUTIER, F.; SAUVARD, D.; DROUET, A.; CLAUDOT, A.C.; YART, A.; BERRYMAN, A. A.; CHRISTIANSEN, E. Induced responses in phenolic metabolism in two Norway spruce clones after wounding and inoculation with *Ophiostoma polonicum*, a bark beetle-associated fungus. **Plant Physiology**, v. 109, p. 821-827. 1995.

BRISSON, A.; GHARIBIAN, S. EAGEN, R.; LECLERC, D. F.; BREUIL, C. Localization and characterization of the melanin granules produced by the sapstaining fungus *Ophiostoma piceae*. **Material und Organismen**, v. 30, p. 23-32. 1996.

BROWN, H. L.; BRUCE, A. Assessments of the biocontrol potential of a *Trichoderma viride* isolate in a field trial. In: **20° Annual Meeting of the IRG**, Maastricht, Netherlands. 1998. 18 p.

BRUCE, A. Biological control of wood decay. In: BRUCE, A.; PALFREYMAN, J. W. (Ed.) **Forest Products Biotechnology**. Londres: Taylor & Francis. p. 251-267. 1998.

BRUCE, A.; STEWART, D; VERRALL, S.; WHEATLEY, R. E. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sapstain fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Amsterdam, v. 51, p. 101-108. 2003.

BRUSH, T. S.; FARRELL, R. L.; HO, L. Biodegradation of wood extractives from southern yellow pine by *Ophiostoma piliferum*. **Tappi Journal**, v. 77, p. 155-159, 1994.

CAMPBELL, M. M.; ELLIS, B. E. Fungal-elicitor mediated responses in pine cell cultures: I. Induction of phenylpropanoid metabolism. **Planta**, v. 186, p. 409-417. 1992.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. New York: Wiley. 1990.

CARLOS, V. J. O Manchamento da Madeira e sua Prevenção. **Revista da Madeira**, Curitiba, n. 360, p. 12-15. 1981.

CARVALHO, R. M. M. A.; SOARES, T. S.; VALVERDE, S. R. Setor florestal é destaque na economia brasileira. **Revista da Madeira**, Curitiba, n. 95, 2006. Disponível em: <<http://www.remade.com.br/revista/materia.php?edicao=95&id=865>>. Acesso em: julho de 2006.

CAVALCANTE, M. S. **Deterioração biológica e preservação de madeiras**. IPT. Divisão de Madeiras. São Paulo. 1982. 41 p. (Pesquisa e Desenvolvimento, v. 8).

CHIDESTER, G. H.; BRAY, M. W.; CURRAN, C. E. Characteristics of sulphite and kraft pulps from blue-stained southern pine. **Paper Trade Journal**, v. 106, n. 14, p. 43-46. 1938.

CHKRAVARTY, P.; HIRATSUKA, Y. Evaluation of *Lecythophora hollmannii* as a potential biological control agent against a blue stain fungus on *Populus tremuloides*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 101, n. 1, p. 74-79. 1994.

CHKRAVARTY, P.; TRIFONOV, L.; HUTCHINSON, L. J.; HIRATSUKA, Y.; AYER, W. A. Role of *Sporomiella similis*, as a potential bioprotectant of *Populus tremuloides* wood against the blue stain fungus *Ophiostoma piliferum*. **Canadian Journal Forest Research**, v. 24, n. 11, p. 2235-2239. 1994.

CHRISTIANSEN, E. After-effects of drought did not predispose young *Picea abies* to infection by the bark beetle-transmitted blue-stain fungus *Ophiostoma polonicum*. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v. 7, p. 557-569. 1992.

CHRISTIANSEN, E. *Ceratocystis polonica* inoculated in Norway spruce: blue-staining in relation to inoculum density, resinosis and tree growth. **European Journal of Forest Pathology**, v. 15, p. 160-167. 1985a.

CHRISTIANSEN, E. *Ips/Ceratocystis*-infection of Norway spruce: what is a deadly dosage? **Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie**, v. 99, p. 6-11. 1985b.

CHRISTIANSEN, E.; KROKENE, P. Canadian Norway spruce trees be 'vaccinated' against attack by *Ips typographus*? **Agricultural and Forest Entomology**, v. 1, p. 185-192. 1999.

CHRISTIANSEN, E.; KROKENE, P.; BERRYMAN, A. A.; FRANCESCHI, V. R.; KREKLING, T.; LIEUTIER, F.; LÖNNEBORG, A.; SOLHEIM, H. Mechanical injury and fungal infection induce acquired resistance in Norway spruce. **Tree Physiology**, v. 19, p. 399-403. 1999.

CHRISTIANSEN, E.; SOLHEIM, H. The bark beetle-associated blue-stain fungus *Ophiostoma polonicum* can kill various spruces and Douglas fir. **European Journal of Forest Pathology**, v. 20, p. 436-446. 1990.

CHRISTIANSEN, E.; WARING, R. H.; BERRYMAN, A. A. Resistance of conifers to bark beetle attack: searching for general relationships. **Forest Ecology Management**, v. 22, p. 89-106, 1987.

CIRELLI, D. P. Patterns of pentachlorophenol usage in United States of America – an overview. In: RAO, K. R. (Ed.). **Pentachlorophenol: chemistry, pharmacology, and environmental toxicology**. Plenum Press, New York. pp. 13-18. 1978.

COOK, S. B.; HAIN, F. P. Qualitative examination of the hypersensitive response of loblolly pine, *Pinus taeda* L., inoculated with two fungal associates of the southern pine beetle, *Dendrocotnus frontalis* Zimmerman (Coleoptera: Scolytidae). **Environmental Entomology**, v. 14, p. 396-400. 1985.

COPPEDGE, B. R.; STEPHEN, F. M.; FELTON, G. W. Variation in female southern pine beetle size and lipid content in relation to fungal associates. **Canadian Entomologist**, v. 127, p. 145-154. 1995.

CROAN, S. E. **Biological control of sapstain fungi in wood**. International Research Group on Wood Preservation, doc. n. IRG/WP/96-10158. 1996.

CROAN, S. E.; HIGHLEY, T. L. **Antifungal activity in metabolites from *Streptomyces rimosus***. International Research Group on Wood Preservation, doc. n. IRG/WP/1440. 1991a.

CROAN, S. E.; HIGHLEY, T. L. Biological control of the blue stain fungus *Ceratocystis coerulescens* with fungal antagonists. **Material und Organismen**, v. 25, n. 4, p. 255-266. 1991b.

CROAN, S. E.; HIGHLEY, T. L. **Control of sapwood-inhabiting fungi by fractionated extracellular metabolites from *Ciniophora puteana***. International Research Group on Wood Preservation, doc. n. IRG/WP/1494. 1991c.

CROAN, S. E.; HIGHLEY, T. L. **Biological control of sapwood-inhabiting fungi by living bacterial cells of *Streptomyces rimosus* as a bioprotectant**. International Research Group on Wood Preservation, doc. n. IRG/WP/1564-92. 1992.

CROAN, S. E.; HIGHLEY, T. L. Biological control of sapwood-inhabiting fungi by metabolites from of *Streptomyces rimosus*. In: LLEWELLYN, G. C. (Ed.) **Biodeterioration Research**, v. 4. New York: Plenum Press. 1994.

CROTEAU, R.; GURKEWITZ, S.; JOHNSON, M. A.; FISK, H. J. Biochemistry of Oleoresinosis: monoterpene and diterpene biosynthesis in lodgepole pine saplings infected with *Ceratocystis clavigera* or treated with carbohydrate elicitors. **Plant Physiology**, v. 85, p. 1123-1128. 1987.

DA COSTA, A. F. **Utilização de interações entre produtos químicos preservantes no desenvolvimento de formulações para a prevenção de fungos manchadores e emboloradores na madeira**. Curitiba: UFPR, 1999. 103 p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, 1999.

DIX, N. J.; WEBSTER, J. W. **Fungal Ecology**. London: Chapman & Hall, 1995. 549 p.

DOGRA, N.; BREUIL, C. Suppressive subtractive hybridization and differential screening identified genes differentially expressed in yeast and mycelial forms of *Ophiostoma piceae*. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) – Microbiology Letters**, Canadá, v. 238, n. 1, p. 175-181, 2004.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of Soil Fungi**. London: Academic Press, 1980. 859 p.

DORADO, J.; CLAASSEN, F. W.; LENON, G.; BEEK, T. A. Van; WIJNBERG, J. B. P. A.; SIERRA-ALVAREZ, R. Degradation and detoxification of softwood extractives by sapstain fungi. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 13-20, 2000.

DOWDING, P. The evolution of insect-fungus relationships in the primary invasion of forest timber. In: ANDERSON, J. M.; RAYNER, A. D. M.; WALTON, D. W. H. (Eds.) **Invertebrate – microbial interactions**. Cambridge University Press, Cambridge. p.133-155. 1984.

EATON, R. A.; HALE, M. D. C. **Wood Decay, Pests and Protection**. Chapman & Hall, London. 1993.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Wallingford: CAB Internacional. 1993. 608 p.

ENCINAS, O. **Development and significance of attack by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat) Griff. & Maubl. in Caribbean pine wood and some other wood species**. PhD Thesis. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Silvestria, v. 8, Uppsala, Suécia: Sweden Univ. Agric. Sci., 43 p. 1996.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2005. In: ABRAF – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF: ano base 2005**. Brasília: ABRAF, 2006. 80 p.

FARJON, A. **Pines: drawings and descriptions of the genus *Pinus***. Netherlands: Brill & Backhuys, 1984.

FARR, D. F.; BILLS, G. F.; CHAMURIS, G. P.; ROSSMAN, A. Y. **Fungi on plants and plant products in the United States**. St. Paul: APS Press. 1989.

FARRELL, R. L.; BLANCHETTE, R. A.; BRUSH, T. S.; HADAR, Y.; IVERSON, S.; KRISA, K.; WENDLER, P. A.; ZIMMEERMAN, W. Cartapip: a biopulping product for control of pitch and resin acid problems in pulp mills. **Journal Biotechnology**, v. 30, p. 115-122. 1993.

FARRELL, R. L.; DUNCAN, S.; RAM, A. P.; KAY, S. J.; HADAR, E.; HADAR, Y.; BLANCHETTE, R. A.; HARRINGTON, T. C.; MCNEW, D. Cause and prevention of sapstain in New Zealand. In: KREBER, B. (Ed.). **Strategies for Improving Protection of Logs and Lumber**. Forest Research Institute Bulletin n. 204, Rotorua, New Zealand. p. 25-30. 1997.

FARRELL, R. L.; HADAR, E.; KAY, S. J.; BALNCHETTE, R. A.; HARRINGTON, T. C. Survey of sapstain organisms in New Zealand and albino anti-sapstain fungi. In: **Proc. Biology and Prevention for Sapstain**. Whistler, B. C. Pub. n. 7273. Forest Products Society, Madison, pp. 57-62. 1998.

FERNÁNDEZ, M. M. F.; GARCÍA, A. E.; LIEUTIER, F. Effects of various densities of *Ophiostoma Ips* inoculations on *Pinus sylvestris* in north-western Spain. **Forest Pathology**, Berlin, v. 34, n. 4, p. 213-223, 2004.

FISHER, K.; AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R. A.; BURNES, T. A.; MESSNER, K.; KIRK, T. K. Reduction of resin content in wood chips during experimental biological pulping processes. **Holzforschung**, v. 48; p. 285-290. 1994.

FOURGEROUSSE, M. Les alteration fungiques des bois frais em Afrique Tropicale et plus particulierment de l'llomba et du Limba. **Bois et Forest de Tropiques**, v. 60, p. 41-56, 1958.

FRANCESCHI, V. R.; KREKLING, T.; BERRYMAN, A. A.; CHRISTIANSEN, E. Specialized phloem parenchyma cells in Norway spruce are a primary site of defense reactions. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 85, p. 601-615. 1998.

FRANKLIN, R. T. Observations on the blue stain-southern pine beetle relationship. J. Ga. Entomol. Soc., v. 5, p. 53-57. 1970. In: KLEPZIG, K. D.; WILKENS, R. T. Competitive Interactions among Symbiotic Fungi of the Southern Pine Beetle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 621-627. 1997.

FREITAG, M.; MORRELL, J. J.; BRUCE, A. Biological protection of wood: status and prospects. **Biodeterioration Abstract**, v. 5, n. 1; p. 1-13. 1991.

FURNISS, M. M.; SOLHEIM, H.; CHRISTIANSEN, E. Transmission of bluestain fungi by *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) in Norway spruce. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 83, p. 712-716. 1990.

FURTADO, E. L. **Biodegradação da madeira**. São Paulo: UNESP, 2004. 9 p.
FURTADO, E. L. **Microrganismos manchadores de madeira**. Botucatu: IPEF, 2000. 6 p. (Série Técnica IPEF, v. 13, n. 33).

GALVÃO, A. P. M.; JANKOWSKY, I. P. **Secagem racional da madeira**. São Paulo: Livraria Nobem, p. 34-67, 1985.

GOLDHAMMER, D. S.; STEPHEN, F. M.; PAINE, T. D. The effect of the fungi *Ceratocystis minor* (Hedgecock) Hunt, *Ceratocystis minor* (Hedgecock) Hunt var. *barassii* Taylor, and SJB122 on reproduction of the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimmermann (Coleoptera: Scolytidae). **Canadian Entomologist**, v. 122, p. 407-418. 1990.

GRANIER, A. Une nouvelle méthode pour la mesure du flux de sève brute dans le tronc des arbres. **Annales des Sciences Forestières**, v. 20, p. 193-200. 1985.

GRIFFIN, R. L. The precautionary approach and phytosanitary measures. **Proceedings of the BCPC Conference: Pests and Diseases**, v. 3. UK: British Crop Protection Council, p. 1153-1158. 2000.

HANADA, R. E.; SALES-CAPOS, C.; ABREU, R. L. S. de; PFENNING, L. Fungos emboloradores e manchadores de madeira em toras estocadas em indústrias madeireiras no município de Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 33, n. 3, p. 483-488, 2003.

HARDING, S. **The influence of mutualistic Blue stain Fungi on bark beetle population dynamics**. Copenhagen: Royal Veterinary and Agricultural University, 1989. PhD Thesis – Royal Veterinary and Agricultural University, Department of Zoology, 1989.

HARRINGTON, T. C. Biology and taxonomy of fungi associated with bark beetles. p. 37-58. In: SCHOWALTER, T. D.; FILIP, G. M. (Ed.). **Beetle-Pathogen Interactions in Conifer Forests**. London: Academic Press. 1993a.

HARRINGTON, T. C. Diseases of conifers caused by species of *Ophiostoma* and *Leptographium*. In: WINGFIELD, M. J.; SEIFERT, K. A.; WEBBER, J. F. (Eds.). *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: taxonomy, ecology, and pathogenicity. **American Phytopathological Society**, St. Paul, Minn. p. 161-172. 1993b.

HARRINGTON, T. C. *Leptographium* species, their distributions, hosts and insect vectors. In: HARRINGTON, T. C.; COBB JR., F. W. (Eds.). **Leptographium root diseases on conifers**. St. Paul: American Phytopathological Society. p. 1-39. 1988.

HELD, B. W.; THWAITES, J. M.; FARRELL, R. L.; BLANCHETTE, R. A. Albino Strains of *Ophiostoma* Species for Biological Control of Sapstaining Fungi. **Holzforschung**, v. 57, p. 237-242. 2003.

HENZ, G. P.; CARDOSO, F. B. Absorção de água e proliferação de fungos em madeira de *Pinus* usada como embalagem para hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 138-142. 2005.

HICKIN, N. E. **Wood Preservation**: a guide to the meaning of terms. London: Hutchinson & CO LTDA. 1971. 109 p.

HIGHLEY, T. L. Biodeterioration of Wood. In: Forest Products Laboratory. **Wood handbook**: Wood as an engineering material. Madison: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory. 463 p. 1999.

HIGHLEY, T. L.; BENKO, R.; CROAN, S. E. **Laboratory studies on control of sapstain and mould on unseasoned lumber**. International Research Group on Wood Preservation, doc. n. IRG/WP/1493, 7 p. 1991.

HIRATSUKA, Y.; CHAKRAVARTY, P.; MIAO, S.; AYER, W. A. Potential for biological protection against blue stain in *Populus tremuloides* with a hyphomycetous fungus, *Stachybotrys cylindrospora*. **Canadian Journal Forest Research**, v. 24, p. 157-179. 1994.

HODGES, C.; MCFADDEN, M. **Insects and diseases affecting Forest Plantations in Tropical America**. Southern Research Station: USDA Forest Service, pp. 365-376. 1991.

HORNTVEDT, R.; CHRISTIANSEN, E.; SOLHEIM, H.; WANG, S. Artificial inoculation with *Ips typographus*-associated blue-stain fungi can kill healthy Norway spruce tree. **Maddelser Fra Norsk Institutt for Skogforskning**, v. 38, p. 1-20. 1983.

HORNTVEDT, R.; SOLHEIM, H. Pathogenicity of *Ophiostoma polonicum* to Norway spruce: The effect of isolate age and inoculum dose. **Maddelser Fra Norsk Institutt for Skogforskning**, v. 44, p. 1-11. 1991.

HOTTER, G. S. Elicitor-induced oxidative burst and phenylpropanoid metabolism in *Pinus radiata* cell suspension cultures. **Australian Journal Of Plant Physiology**, v. 24, p. 797-804. 1997.

HULME, M. A.; SHIELDS, J. K. Antagonistic and synergistic effects for biological control of decay. In: LIESE, W. (ed.). **Biological Transformation of Wood by Microorganism**. Berlin: Springer-Verlag, p. 52-63, 1975.

IDE MAYORGA, S.; LANFRANCO, D.; PEREDO, H.; RUIZ, C.; VIVES, I. **Escarabajos de corteza y mancha azul**: Situación en Chile. Botucatu: IPEF, 2000. 10 p. (Série Técnica IPEF, v. 13, n. 33).

IEDE, E. T.; PENTEADO, S. R. C.; REIS FILHO, W.; SCHAITZA, E. G. **Situação atual do Programa de Manejo Integrado de *Sirex noctilio* no Brasil**. Botucatu: IPEF, 2000. 10 p. (Série Técnica IPEF, v. 13, n. 33).

JANKOWSKY, I. P. Fundamentos de secagem de madeiras. **Documentos Florestais**, Piracicaba, v. 10, p. 1-13. 1990a.

JANKOWSKY, I. P. Fundamentos de preservação de madeiras. **Documentos Florestais**, Piracicaba, v. 11, p. 1-12. 1990b.

JIN, Z. W.; MORRELL, J. J. Bioprotection of bamboo against fungal mould and stain. **Material und Organismen**, v. 30, n. 1, p. 57-62. 1996.

JOHNSON, M. A.; CROTEAU, R. Biochemistry of conifer resistance to bark beetles and their fungal symbionts. In: FULLER, G.; NES, D. W. (Ed.) **Ecology and Metabolism of Plant Lipids**. American Chemical Society Symposium Series 325, Washington. p. 76-92. 1987.

KÄÄRIK, A. Decomposition of wood. In: DICKINSON, C. H.; PUGH, G. J. F. (Eds.) **Biology of plant litter decomposition**. v. 1. Londres: Academic Press, p. 129-174, 1975.

KANG, S. M.; MORRELL, J. J. Fungal colonization of Douglas-fir sapwood lumber. **Mycologia**, v. 92, p. 609-615. 2000.

KATO, S.; TAKEDA, E. R. Estudo da toxidez do pentaclorofenato de sódio e do sulfato de cobre em relação ao *Gloeophyllum trabeum* (Per. ex. Fr.) Murr. **Preservação de Madeiras**, ABPM, v. 1, n. 2. 1970.

KENDRICK, W. B. The *Leptographium* complex: *Verticicladiella* Hughes. **Canadian Journal of Botany**, v. 40, p. 771-797. 1962.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. (Eds.). **Dictionary of the Fungi**. 9 ed. Wallingford (UK): CABI Publishing, 2001. 655 p.

KIRISITS, T. Pathogenicity of three blue-stain fungi associated with the bark beetle *Ips typographus* to Norway spruce in Austria. **Österreichische Zeitschrift für Pilzkunde**, v. 7, p. 191-201. 1998.

KIRISITS, T. **Untersuchungen über die Vergesellschaftung von Bläuepilzen (*Ceratocystis/Ophiostoma* spp.) mit den rindenbrütenden Fichtenborkenkäfern *Ips typographus*, *Pityogenes chalcographus* und *Hylurgops glabratus* in Osterreich**. Vienna, Austria: Universität für Bodenkultur Wien, Institute of Forest Entomology, Forest Pathology and Forest Protection, Diploma Thesis. 1996.

KIRISITS, T.; FÜHRER, E.; WINGFIELD, M. J. Pathogenicity of the bark beetle transmitted blue-stain fungi *Ceratocystis palonica* and *Ceratocystis laricicola* to Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) and to European larch (*Larix decidua* Mill.) in central Europe. In: HASENAUER, H. (Ed.). **Proceedings of the International Conference 'Forest Ecosystem Restoration - Ecological and Economical Processes in Secondary Coniferous Forests'**, 10-12 April/2000. Vienna, Austria: Institute of Forest Growth Research, University of Agricultural Sciences, p. 344-345. 2000.

KIRISITS, T.; OFFENTHALER, I. Xylem sap flow of Norway spruce after inoculation with the blue-stain fungus *Ceratocystis polonica*. **Plant Pathology**, Londres, v. 51, n. 3, p. 359-364, 2002.

KLEPZIG, K. D.; SMALLEY, E. B.; RAFFA, K. F. *Dendroctonus valens* and *Hylastes porculus* (Coleoptera: Scolytidae): Vectors of pathogenic fungi (Ophiostomatales) associated with red pine decline disease. **Great Lakes Entomology**, v. 28, p. 81-87. 1995.

KLEPZIG, K. D.; WILKENS, R. T. Competitive Interactions among Symbiotic Fungi of the Southern Pine Beetle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 621-627. 1997.

KLINGSTRÖM, A. E.; JOHANSSON, S. M. Antagonism of *Scytalidium* isolates against decay fungi. **Phytopathology**, v. 63, n. 4, p. 473-479. 1973.

KREBER, B.; KIMBERLEY, M.; EDEN, D.; CHITTENDEN, C.; VAN DER WAALS, J.; WAKELING, R.; DORSET, I. Arresto f fungal pré-infections in raw logs and freshly sawn lumber of radiata pine using Sentry®. **Forestry Products Journal**, v. 51, n. 10, p. 66-72. 2001.

KREBER, B.; MORRELL, J. J. Ability of selected bacterial and fungal bioprotectants to limit fungal stain in ponderosa pine sapwood. **Wood and Fiber Science**, v. 25, n. 1, p. 23-34. 1993.

KROKENE, P.; CHRISTIANSEN, E.; SOLHEIM, H.; BERRYMAN, A. A.; FRANCESCHI, V. R. Induced resistance to pathogenic fungi in Norway spruce. **Plant Physiology**, v. 121, p. 565-570. 1999.

KROKENE, P.; SOLHEIM, H.; LÅNGSTRÖM, B. Fungal infection and mechanical wounding induce resistance in Scots pine. **Eur. J. Plant Pathology**, v. 106, p. 537-541. 2000.

KROKENE, P.; SOLHEIM, H. Pathogenicity of four blue-stain fungi associated with aggressive and nonaggressive bark beetles. **Phytopathology**, v. 88, p. 39-44. 1998.

KRONKA, F. J. N.; BERTOLANI, F.; PONCE, R. H. (Ed.) **A Cultura de Pinus no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2005. 160 p.

LEE, S.; KIM, S. H.; BREUIL, C. The use of the green fluorescent protein as a biomarker for sapstain fungi. **Forest Pathology**, Berlin, v. 32, n. 3, p. 153-161, 2002.

LEPAGE, E. S. (Ed.). **Manual de Preservação de Madeiras**. v. 1. São Paulo: IPT, 1986a. p. 110-114.

LEPAGE, E. S. Química da madeira. In: LEPAGE, E. S. (Ed.). **Manual de Preservação de Madeiras**. v. 1. São Paulo: IPT, 1986b. p. 69-97.

LESNEY, M. S. Growth responses and lignin production in cell suspensions of *Pinus elliottii* 'elicited' by chitin, chitosan or mycelium of *Cronartium quercum* f.sp. *fusiforme*. **Plant Cell Tissue Org Cult**, v. 19, p. 23-31. 1989.

LIESE, W. Biological deterioration of wood in storage and use. **FAO / IUFRO / DI / 75/6-0**. 1975.

LIESE, W.; PECK, R. Experiences with wet storage of conifer logs. **Dan. Skovforen. Tidsskr.**, v. 69, p. 73-91. 1984.

LIESE, W.; SCHMID, R. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Wachstum von Bläuepilzen in Kiefern- und Fichtenholz. **Holz als Roh- und Werkstoff**, v. 19, p. 329-337. 1961.

LIEUTIER, F. Mechanisms of resistance in conifers and bark beetle attack strategies. In: WAGNER, M. R.; CLANCY, K. M.; LIEUTIER, F.; PAINE, T. D. (Eds.) **Mechanisms and deployment of resistance in trees to insects**. Dordrecht: Academic publishers, 2002. p. 31-75.

LIMA, L. B. Madeira reflorestada e exportação. **Revista da Madeira**, n. 99, p. 20. 2006.

LINDGREN, R. M. **Temperature, moisture, and penetration studies of wood-staining *Ceratostomella* in relation to their control**. USDA Technical Bulletin, n. 807, 35 p. Washington. 1942.

LINDGREN, R. M. Permeability of southern pine as affected by mold growth and other fungus infection. **Proceeding of The American Wood Preserver's Association**: Washington, v. 48, p. 158-174. 1952.

LOOPNAU, P.; TANGUAY, P.; BREUIL, C. Isolation and disruption of the melanin pathway polyketide synthase gene of the softwood deep stain fungus *Ceratocystis resinifera*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 33-41. 2004.

LOPES, A. B.; OLIVEIRA, M. R. V. **Praga quarentenária 7: *Ips* spp. (Coleoptera, Scolytidae)**. Brasília: Embrapa, 2002. 8 p. (Embrapa. Comunicado Técnico, 62).

LUI, J.; MORRELL, J. J. Effect of biocontrol inoculum growth conditions on subsequent chitinase and protease levels in wood exposed to biocontrols and stain fungi. **Material und Organismen**, v. 31, p. 265-279. 1997.

MALLOCH, D.; BLACKWELL, M. Dispersal biology of the Ophiostomatoid fungi. p. 195-206. In: WINGFIELD, M. J.; SEIFERT, K. A.; WEBBER, J. F. (Ed.). **Ceratocystis and Ophiostoma**: Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. St. Paul: The American Phytopathological Society. 1993.

MARTO, G. B. T.; BARRICHELO, L. E. G.; MÜLLER, P. H. Indicações para escolha de espécies de *Pinus*. **Revista da Madeira**, v. 99, p. 16-17. 2006.

MESQUITA, J. B.; LIMA, J. T.; TRUGILHO, P. F. Micobiota associada à madeira serrada de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden durante a secagem ao ar livre. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 1, p. 45-50. 2006.

MESSNER, K.; BURGEL, J.; HORVATH, E. M.; SCHLICK, A.; FLECK, V.; MARCHLER, A. State of development of the LCT method of wood preservation. **Holz Zentralblatt**, v. 122, n. 15, p. 232-233, 1996.

MILANO, S.; VIANNA NETO, J. A. A. Considerações sobre a mancha azul e bolor em madeira de *Pinus* spp. In: **1º Encontro Brasileiro em Preservação de Madeiras**. Anais... São Paulo: IPT, 1982. p. 177-183.

MILLER, R. H.; BERRYMAN, A. A.; RYAN, C. A. Biotic elicitors of defense reactions in lodgepole pine. **Phytochemistry**, v. 25, p. 611-612. 1986.

MOHALI, S. Estúdio histológico de la madera de *Pino caribe* com mancha azul causado por *Botryodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Venezuelana**, v. 6, p. 14-17, 1993.

MOHALI, S. Primer reporte en Venezuela de *Sphaeropsis sapinea*, agente causal del manchado azul en pino caribe. **Fitopatologia Venezuelana**, v. 10, p. 23, 1997.

MOHALI, S.; ENCINAS, O. Association of *Diplodia mutila* with blue stain of Caribbean pine in Venezuela. **Forest Pathology**, v. 31, p. 187-189, 2001.

MORESCHI, J. C. **Biodeterioração da Madeira**. Curitiba: UFPR/DETR. 1998. 38 p. (Apostila Técnica).

MORRELL, J. J.; DAWSON-ANDOH, B. E. Biological control: panacea or boondoggle. In: **Biology and Prevention of Sapstain**. Forest Products Society, Madison, p. 39-44. 1998.

MORRELL, L. J.; VELICHETI, R. K. **Effect of *Pseudomonas cepacia* on the activity of a mixture of wood staining fungi on ponderosa pine sapwood.** International Research Group on Wood Preservation, doc. n. IRG/WP/95-10107. 1995.

MORRELL, U.; SEXTON, C. M. Fungal staining of ponderosa pine sapwood: effects of wood preconditioning and bioprotectants. **Wood and Fibre Science**, v. 25, p. 322-325. 1993.

MORRIS, P. I.; COOPER, P. Recycled plastic/wood composite lumber attacked by fungi. **Forest Products Journal**, v. 48, n. 1, p. 86-88. 1998.

MÜLLER, J.; SCHMIDT, O. Biologischer Schutz von Kiefernholz gegen Verblauen. Holz. Zentralblatt, v. 121, p. 2017-2020. 1995. In: HELD, B. W.; THWAITES, J. M.; FARRELL, R. L.; BLANCHETTE, R. A. Albino Strains of *Ophiostoma* Species for Biological Control of Sapstaining Fungi. **Holzforschung**, v. 57, p. 237-242. 2003.

NAG RAJ, T. R. **Coelomycetous anamorphs with appendage – bearing conidia.** Canadá – Waterloo: Mycologue Publications, 1993. 1101 p.

NAGY, N. E.; FRANCESCHI, V. R.; SOLHEIM, H.; KREKLING, T.; CHRISTIANSEN, E. Wound-induced traumatic resin duct development in stems of Norway spruce (*Pinacear*): anatomy and cytochemical traits. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v. 83, n. 3, p. 302-313, 2000.

NEVILL, R. J.; ALEXANDER, S. A. Pathogenicity of three fungal associates of *Hylobius pales* and *Pissodes nemorensis* (Coleoptera: Curculionidae) to eastern white pine. **Canadian Journal Forest Research**, v. 22, p. 1438-1440. 1992.

NICHOLAS, D. D. **Wood deterioration and its prevention by preservative treatments.** v. 1. Degradation and Protection of wood. New York: Syracuse University Press. 1973. 380 p.

OFUSO-ASIEDU, A. Wood storage in Ghana. In: **Proceedings of the IUFRO Symposium on Protection of Wood Storage**, Norway and Sweden, 1972. 1973. OLIVEIRA, A. M. F.; LELIS, A. T. de; LEPAGE, E. S.; LOPES, G. A. C.; OLIVEIRA, L. C. S.; CAÑEDO, M. D.; MILANO, S. Agentes destruidores de madeira. In: LEPAGE, E. S. (ed.). **Manual de Preservação de Madeiras.** v. 1. São Paulo: IPT, 1986. p. 99-278.

OLIVEIRA, M. de. Madeira valiosa: plantio e exploração do pinus abre novos mercados e reduz a extração de espécies nativas. **Revista Pesquisa FAPESP**, Tecnologia-Engenharia Florestal, n. 115. 2005. Disponível em: <<http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=2831&bd=1&pg=1&lg=>>. Acesso em: 29 dez. 2006.

OTROSINA, W. J.; HESS, N. J.; ZARNOCH, S. J.; PERRY, T. J.; JONES, J. P. Blue-stain fungi associated with roots of southern pine trees attacked by the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis*. **Plant Disease**, v. 81, p. 942-945. 1997.

PAINE, T. D.; RAFFA, K. F.; HARRINGTON, T. C. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi and live host conifers. **Annual Review Entomology**, v. 42, p. 179-206, 1997.

PAYNE, C.; BRUCE, A.; STAINES, H. Yeast and bacteria as Biological control agents against fungal discoloration of *Pinus sylvestris* blocks in laboratory-based tests and the role of antifungal volatiles. **Holzforschung**, v. 54, n. 6, p. 563-569. 2000.

PECK, C. H. Reports of the botanist. **New York State Mus. Rep.**, v. 31, p. 19-60. 1879.

PEREIRA, B. A. Introdução de coníferas no Brasil: um esboço histórico. Piracicaba: Esalq, 1987. 34 p. Trabalho de Pós-graduação - Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz, 1987. In: NÉRI, A. C. **Parâmetros de corte na usinagem de madeiras de reflorestamento**. Campinas: UNICAMP, 2004. 154 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, 2004.

PIMENTEL, L. L. **Telhas onduladas à base de cimento portland e resíduos de *Pinus caribaea***. Campinas: UNICAMP, 2000. 82 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, 2000.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. Australia: Food Science Australia. 2000. 197 p.

PRONAF. Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar. **PRONAF Florestal**: financiamento à recomposição florestal. Disponível em: <<http://www.pronaf.gov.br/florestal/florestal1.htm>>. Acesso em: 01 jan. 2007.

RAFFA, K. F. Induced defensive reactions in conifer-bark beetle systems. In: TALLAMY, D. W.; RAUPP, M. J. (Ed.). **Phytochemical Induction by Herbivores**. New York: John Wiley & Sons, pp. 245–276. 1991.

RAFFA, K. F.; BERRYMAN, A. A. Physiological aspects of lodgepole pine wound responses to a fungal symbiont of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). **Canadian Entomologist**, v. 115, p. 723-734. 1983.

RAFFA, K. F.; KLEPZIG, K. D. Tree defense mechanisms against fungi associated with insects. p. 354-389. In: BLANCHETTE, R. A.; BIGGS, A. R. (Ed.). **Defense Mechanisms of Woody Plants Against Fungi**. Berlin: Springer-Verlag. 1992.

REID, R. W.; WHITNEY, H. S.; WATSON, J. A. Reactions of lodgepole pine to attack by *Dendroctonus ponderosae* Hopkins and blue stain fungi. Canadian Journal of Botany, v. 45, p. 1115-1126. 1967. In: KROKENE, P.; CHRISTIANSEN, E.; SOLHEIM, H.; FRANCESCHI, V. R.; BERRYMAN, A. A. Induced Resistance to Pathogenic Fungi in Norway Spruce. **Plant Physiology**, v. 121, p. 565-569. 1999.

REGLINSKI, T.; STAVELY, F. J. L.; TAYLOR, J. T. Induction of phenylalanine ammonia lyase activity and control of *Sphaeropsis sapinea* infection in *Pinus radiata* by 5-chlorosalicylic acid. **European Journal of Forest Pathology**, v. 28, p. 153-158. 1998.

RICHARDSON, D. M. (ed.). **Ecology and Biogeography of Pinus**. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 530 p.

RIFAI, M. M. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, v. 29, n. 116, 1969.

RITTER, C. R. Origem do CFO (Certificado Fitossanitário de Origem). **Floresta**, v. 30, n. 1/2, p. 75-83. 2000.

ROCHELEAU, M. J.; SITHOLÉ, B. B.; ALLEN, L. H.; IVERSON, S.; FARRELL, R. NOËL, Y. Fungal treatment of aspen chips for wood resin reduction: a laboratory evaluation. **Journal Pulp Paper Science**, v. 24, p. 37-42, 1998.

ROFF, J. W.; CSERJESI, A. J.; SWANN, G. W. **Prevention of sapstain and mold in packaged lumber**. Forintek Canada Technical Report, n. 14R, Vancouver: Forintek Canada Corp. B.C. 1980.

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

SAFRANYIK, L. SHRIMPTON, D. M.; WHITNEY, H. S. The role of host-pest interaction in population dynamics of *Dendroctonus rufipennis* (Kirby) (Coleoptera: Scolytidae). p. 1-12. In: ISAEV, A. S. (Ed.) **Proceedings, Host-Pest Interactions**. p. 24-27. IUFRO/MAB Symposium, Irkutsk, USSR Can. For. Ser. Pacific For. Res. Cent., Victoria, BC. 1983.

SALES-CAMPOS, C.; ABREU, R. L. S.; VIANEZ, B. F. Condições de uso e processamento de madeiras nas indústrias madeireiras de Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 30, n. 2, p. 319-331, 2000.

SAMSON, R. A. Paecilomyces and some allied Hyphomycetes. **Studies in Mycology**, n. 6. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmel cultures baarn, 1974.

SCHEFFER, T. C. Microbiological degradatin and the causal organism. In: NICHOLAS, D. D. (Ed.). **Wood deterioration and its prevention by preservative treatments**. v. 1. New York: Syracure University Press, 1973. p. 31-106.

SCHEFFER, T. C.; LINDGREN, R. M. **Stains of sapwood and sapwood products and their control**. USDA Technical Bulletin, n. 714. 123 p. Washington. 1940.

SCHMIDT, O.; MÜLLER, J. Praxisversuche zum biologischem Schutz von Kiefernholz vor Schimmel und Schnittholzbläue. *Holzforschung und Holzverwertung*, v. 48, p. 81-84. 1996. In: HELD, B. W.; THWAITES, J. M.; FARRELL, R. L.; BLANCHETTE, R. A. Albino Strains of *Ophiostoma* Species for Biological Control of Sapstaining Fungi. **Holzforschung**, v. 57, p. 237-242. 2003.

SCHOEMAN, M.; WEBBER, J. F.; DICKINSON, D. J. Chain-saw application of *Trichoderma harzianum* Rifai to reduce fungal deterioration of freshly felled pine logs. **Material und Organismen**, v. 28, n. 4, p. 243-250. 1993/1994.

SCHOEMAN, M.; WEBBER, J. F.; DICKINSON, D. J. The development of ideas in biological control applied to forest products. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 43, p. 109-123. 1999.

SCHUSTER, E.; COLEMAN, N. D.; FRISVAD, J. C.; DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426-435. 2002.

SEIFERT, K. A. Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. In: WINGFIELD, M. J.; SEIFERT, K. A.; WEBBER, J. F. (Eds.). ***Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity***. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minn., p. 141-151. 1993.

SEIFERT, K. A.; BREUIL, C.; ROSSINGNOL, L.; BEST, M.; SADDLER, J. H. Screening microorganisms with the potential for biological control of sapstain on unseasoned lumber. **Material und Organismen**, v. 23, p. 81-95. 1988.

SHIMIZU, J. Y. **Espécies de Pinus mais plantadas no Brasil**. Sistemas de Produção n. 5. Embrapa Florestas. Versão Eletrônica. Nov. 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pinus/CultivodoPinus/apresentacao.htm>>. Acesso em: 12 de jan. de 2006.

SHRIMPTON, D. M. Extractives associated with wound response to lodgepole pine attacked by the mountain pine beetle and associated microorganisms. **Canadian Journal of Botany**, v. 51, p. 527-534. 1973.

SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. 336p.
SOLHEIM, H. Ecological aspects of fungi associated with the spruce bark beetle *Ips typographus* in Norway. p. 235-242. In: WINGFIELD, M. J.; SEIFERT, K. A.; WEBBER, J. F. (Ed.). ***Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity***. St. Paul: The American Phytopathological Society. 1993.

SOLHEIM, H. Fungal succession in sapwood of Norway spruce infested by the bark beetle *Ips typographus*. **European Journal of Forest Pathology**, v. 22, p. 136-148. 1992.

SOLHEIM, H. Pathogenicity of some *Ips typographus*-associated blue-stain fungi to Norway spruce. **Meddelser fra Norsk Institutt for Skogforskning**, v. 40, p. 1-11. 1988.

SOLHEIM, H. Oxygen deficiency and spruce resin inhibition of growth of fungi associated with *Ips typographus*. **Mycological Research**, v. 95, p. 1387-1392. 1991.

SOLHEIM, H. Species of Ophiostomataceae isolated from *Picea abies* infested by the bark beetle *Ips typographus*. **Nordic Journal of Botany**, v. 6, p. 199-207. 1986.

SOLHEIM, H.; KROKENE, P.; LANGSTRÖM, B. Effects of growth and virulence of associated blue-stain fungi on host colonization behaviour of the pine shoot beetles *Tomicus minor* and *T. piniperda*. **Plant Pathology**, London, v. 50, n. 1, p. 111-116, 2001.

SOLHEIM, H.; SAFRANYIK, L. Pathogenicity of the spruce beetle associated blue-stain fungi, *Ceratocystis rufipenni* and *Leptographium abietinum* to Sitka spruce. **Canadian Journal Forest Research**, v. 27, p. 1336-1341. 1997.

STRANKS, D. W. Scytalidin, hyalodendrin, cytosporiopsin: antibiotics for preventing blue stain in white pine sapwood. **Wood Science**, v. 9, p. 110-112. 1976.

SYME, J. H.; SAUCIER, J. R. Effects of long-term storage of southern pine sawlogs under water sprinklers. **Forest Products Journal**, Madison, v. 45, n. 1. 1995.

TALBOT, P. H. The Sirex amylostereum-*Pinus* association. **Annals Review of Phytopathology**, n. 15, p. 41-54, 1977.

TAROCINSKI, I. E.; ZIELINSKI, M. H. **Protection of pine sawtimber and sawn timber against blue stain in Poland**. Research Group on Wood Preservation Document n. IRG/WP/3193. Available from the International Research Group on Wood Preservation, Box 5607, S-11428 Stockholm, Sweden. 1982.

THWAITES, J. M.; FARRELL, R. L.; HATA, K.; CARTER, P.; LAUSBERG, M. Sapstain fungi on *Pinus radiata* logs from New Zealand Forest to export in Japan. **Journal of Wood Science**, v. 50, p. 459–465. 2004.

United States Environmental Protection Agency. **Wood preservative pesticides: creosote, pentachlorophenol and the inorganic arsenicals: document, 4**. Registration Division, Office of Pesticide Programs, Office of Pesticide and Toxic Substances, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, 1984.

UPADHYAY, H. P. **A monograph of Ceratocystis and Ceratocystiopsis**. Athens: The University of Georgia Press, 1981. Monograph - University of Georgia, 1981. pp. 100-102.

UZUNOVIC, A.; YANG, D. Q.; PAGNÉ, P.; BREUIL, C.; BERNIER, L.; BYRNE, A.; GIGNAC, M.; KIM, S. H. Fungi that cause sapstain in Canadian softwoods. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 914-922. 1999.

VERRALL, A. F. **Absorption and penetration of preservatives applied to southern pine wood by dips or short-period soaks.** USDA Southern Forest Experiment Station. Occasional Paper, n. 157. 31 p. 1957.

WANG, S. Transpiration stream velocity in Norway spruce trees attacked by bark beetles. **Meddelser fra Norsk Institutt for Skagforskning**, v. 38, p. 4-8. 1983.

WANG, Z.; CHEN, T.; GAO, Y.; BREUIL, C.; HIRATSUKA, Y. Biological degradation of resin acids in wood chips by wood-inhabiting fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 222-225. 1995.

WARCUP, J. H. Isolation of fungi from hyphae present in soil. **Nature**, v. 175, p. 953-954. 1955.

WEHER, J. P. **Métodos práticos de tratamento preservativo de moirões roliços de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Bar et Golf.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) Universidade de São Paulo. Piracicaba/ESALQ, 1985. 207 p.

WHITE-MCDOUGALL, W. J.; BLANCHETTE, R. A.; FARRELL, R. L. Biological control of blue stain fungi on *Populus tremuloides* using selected *Ophiostoma* isolates. **Holzforschung**, v. 52, p. 234-240. 1998.

WHITNEY, H. S. Relationships between bark beetles and symbiotic organisms. In: MITTON, J. B.; STURGEON, K. B. (Eds.). **Bark Beetles in North American Conifers: a system for the study of evolutionary biology.** Austin, Texas, USA: University Texas Press, 1982. p. 183-211.

WINGFIELD, M. J.; SEIFERT, K. A.; WEBBER, L. F. (Eds.). ***Ophiostoma* and *Ceratocystis*: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity.** St. Paul, MN, USA: American Phytopathological Society Press. 1993.

YAMAOKA, Y.; SWANSON, R. H.; HIRATSUKA, Y. Inoculation of lodgepole pine with four blue-stain fungi associated with mountain pine beetle, monitored by a heat pulse velocity (HPV) instrument. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 20, p. 31-36. 1990.

YAMAOKA, Y.; TAKAHASHI, I.; IGUCHI, K. Virulence of *Ophiostomatoid* fungi associated with the spruce bark beetle *Ips typographus* f. *japonicus* in Yezo spruce. **Journal of Forest Research**, v. 5, p. 87-94. 2000.

YANG, D. Q. A new approach for potential integrated control of wood sapstain. In: **Biology and Prevention of Sapstain**. Forest Products Society, Madison, pp. 45-52. 1998.

YANG, D. Q. Isolation of staining fungi from jack pine trees. **Forest Products Journal**, v. 54, n. 12, p. 245-249. 2004.

YANG, D. Q. Staining ability of various sapstaining fungi on agar plate and on wood wafers. **Forest Products Journal**, v. 49, n. 11/12, p. 78-90. 1999.

YANG, D. Q. Staining ability of various sapstaining fungi on Jack pine short log sections. **Forest Products Journal**, v.51, n. 2, p. 73-76. 2001.

ZABEL, R. A.; MORRELL, J. J. Wood Microbiology: Decay and its Prevention. San Diego: Academic Press. 1992. In: HELD, B. W.; THWAITES, J. M.; FARRELL, R. L.; BLANCHETTE, R. A. Albino Strains of *Ophiostoma* Species for Biological Control of Sapstaining Fungi. **Holzforschung**, v. 57, p. 237-242. 2003.

ZIMMERMAN, W. C.; BLANCHETTE, R. A.; BURNES, T. A.; FARRELL, R. L. Melanin and perithecial development in *Ophiostoma piliferum*. **Mycologia**, v. 87, p. 857-863. 1993.

ZINK, P.; FENGEL, D. Studies on the colouring matter of blue-stain fungi. Part I: General characterization and the associated compounds. **Holzforschung**, v. 42, p. 217-220. 1988.

APÊNDICES

APÊNDICE A –**Relação dos Isolados de Fungos Emboloradores**

Relação dos isolados de fungos emboloradores obtidos a partir de madeiras de *Pinus* spp. provenientes de serrarias dos Estados do Paraná, São Paulo e Santa Catarina

Isolado	Procedência	Gênero	Coloração induzida na madeira
CM E 3	Santa Catarina	<i>Aspergillus</i>	Cinza
CM E 4	Santa Catarina	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 17	Santa Catarina	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 17B	Santa Catarina	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 18A	Santa Catarina	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 23	Santa Catarina	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 24	Santa Catarina	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 25	Santa Catarina	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 26	Santa Catarina	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 31B	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 32A	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 32B	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 37	Paraná	<i>Aspergillus</i>	Cinza
CM E 40	Santa Catarina	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 41B	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 42	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 44	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 45	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 46	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 47	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 48A	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 48B	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 49	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 52	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 59	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 60	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 61	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 64	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 69	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 70A	Paraná	<i>Aspergillus</i>	Cinza
CM E 70B	Paraná	<i>Aspergillus</i>	Cinza

CM E 78	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 101	Paraná	<i>Penicillium</i>	Verde
CM E 101B	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 106	São Paulo	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 106B	São Paulo	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 115	São Paulo	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 116	São Paulo	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 137	São Paulo	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 139B	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 145	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 146	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 147	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 155	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 158	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 159	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 160	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 160B	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 161	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 162	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 163	Paraná	<i>Penicillium</i>	Verde
CM E 164	Paraná	<i>Penicillium</i>	Verde
CM E 166	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 166B	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 167	Paraná	<i>Aspergillus</i>	Cinza
CM E 168	Paraná	<i>Penicillium</i>	Verde
CM E 170	Paraná	<i>Penicillium</i>	Verde
CM E 170B	Paraná	<i>Penicillium</i>	Verde
CM E 172	Paraná	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 172B	Paraná	<i>Penicillium</i>	Verde
CM E 173	Santa Catarina	<i>Penicillium</i>	Verde
CM E 173V	Santa Catarina	<i>Trichoderma</i>	Verde
CM E 179	Paraná	<i>Aspergillus</i>	Cinza
CM E 181	Paraná	<i>Penicillium</i>	Verde
CM E	São Paulo	<i>Aspergillus</i>	Cinza
CM E	São Paulo	<i>Aspergillus</i>	Cinza
CM E	São Paulo	<i>Aspergillus</i>	Cinza
CM E	São Paulo	<i>Penicillium</i>	Verde
CM E	São Paulo	<i>Penicillium</i>	Verde
CM E	São Paulo	<i>Aspergillus</i>	Cinza
CM E	São Paulo	<i>Aspergillus</i>	Cinza
CM E 185	São Paulo	Não identificado	Verde
CM E 186	São Paulo	Não identificado	Verde

CM E 190	São Paulo	Não identificado	Verde
CM E 191A	São Paulo	Não identificado	Cinza
CM E 191 B	Santa Catarina	Não identificado	Cinza
CM E 194	Santa Catarina	Não identificado	Cinza
CM E 201	Santa Catarina	Não identificado	Verde
CM E 203	Santa Catarina	Não identificado	Verde
CM E 203B	Santa Catarina	Não identificado	Verde
CM E 205	Santa Catarina	Não identificado	Verde
CM E 209	Santa Catarina	Não identificado	Verde
CM E 215	Santa Catarina	Não identificado	Verde
CM E 216	Paraná	Não identificado	Cinza
CM E 217	Paraná	Não identificado	Verde
CM E 220	Paraná	Não identificado	Verde
CM E 220B	Paraná	Não identificado	Verde

A partir do isolamento de madeira de *Pinus* spp., foram obtidos 50 isolados de fungos emboloradores do gênero *Trichoderma*, 11 do gênero *Penicillium*, 10 isolados de *Aspergillus* e, 16 isolados não foram identificados. Quanto à origem, 51 isolados são provenientes de madeiras do Estado do Paraná, 20 de Santa Catarina e 16 de São Paulo.

APÊNDICE B –

Relação dos Isolados de Fungos Manchadores

Relação dos isolados de fungos manchadores obtidos a partir de madeiras de *Pinus* spp. provenientes de serrarias dos Estados do Paraná, São Paulo e Santa Catarina

Isolado	Procedência	Gênero	Coloração induzida na madeira
CM M MM	Paraná	<i>Epicoccum</i>	Laranja/Amarelo
CM M 2	Santa Catarina	<i>Lasiodiplodia</i>	Cinza
CM M 3	Santa Catarina	<i>Lasiodiplodia</i>	Cinza
CM M 6	Santa Catarina	<i>Fusarium</i>	Cinza
CM M 7	Santa Catarina	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 8	Santa Catarina	<i>Pestalotiopsis</i>	Cinza a Preto
CM M 10	Santa Catarina	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 14	Santa Catarina	<i>Epicoccum</i>	Laranja/Amarelo
CM M 17	Santa Catarina	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 26	Santa Catarina	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 29	Paraná	<i>Fusarium</i>	Rósea
CM M 32	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 32B	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 37	Santa Catarina	<i>Epicoccum</i>	Laranja/Amarelo
CM M 38	Santa Catarina	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 40	Santa Catarina	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 41	São Paulo	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 41B	São Paulo	<i>Fusarium</i>	Rósea
CM M 42	São Paulo	<i>Lasiodiplodia</i>	Cinza
CM M 43	São Paulo	<i>Lasiodiplodia</i>	Cinza
CM M 43	São Paulo	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 44	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 48	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 48B	Paraná	<i>Epicoccum</i>	Laranja/Amarelo
CM M 56	Paraná	<i>Fusarium</i>	Rósea
CM M 56B	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 59	Paraná	<i>Fusarium</i>	Rósea
CM M 62	Paraná	<i>Fusarium</i>	Roxo

CM M 68	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 69	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 70	Paraná	<i>Fusarium</i>	Roxo
CM M 78	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 103	Paraná	<i>Fusarium</i>	Roxo
CM M 106B	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Cinza
CM M 114	Paraná	<i>Fusarium</i>	Roxo
CM M 116	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 116B	Paraná	<i>Epicoccum</i>	Laranja/Amarelo
CM M 137	São Paulo	<i>Epicoccum</i>	Laranja/Amarelo
CM M 139	Paraná	<i>Epicoccum</i>	Laranja/Amarelo
CM M 139B	Paraná	<i>Pestalotiopsis</i>	Cinza a Preto
CM M 140	Paraná	<i>Paecilomyces</i>	Róseo
CM M 142	Paraná	<i>Paecilomyces</i>	Róseo
CM M 145	Paraná	<i>Pestalotiopsis</i>	Cinza a Preto
CM M 147	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 149	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 155	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 155	São Paulo	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 160	São Paulo	<i>Lasiodiplodia</i>	Cinza
CM M 160B	São Paulo	<i>Lasiodiplodia</i>	Cinza
CM M 162	São Paulo	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 165	Paraná	<i>Fusarium</i>	Roxo
CM M 166	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 167	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 170	São Paulo	<i>Lasiodiplodia</i>	Cinza
CM M 172	São Paulo	<i>Lasiodiplodia</i>	Cinza
CM M 173	Santa Catarina	<i>Lasiodiplodia</i>	Cinza
CM M 173P	Santa Catarina	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 177	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 178	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 192	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 193	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 194	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 199	Paraná	<i>Fusarium</i>	Roxo
CM M 209	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 210	Paraná	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto

CM M 215	São Paulo	<i>Fusarium</i>	Roxo
CM M 218	São Paulo	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 219	São Paulo	<i>Lasiodiplodia</i>	Preto
CM M 220A	São Paulo	<i>Fusarium</i>	Roxo
CM M 220B	Santa Catarina	<i>Lasiodiplodia</i>	Cinza
CM M 221	Santa Catarina	<i>Lasiodiplodia</i>	Cinza
CM M 226	Santa Catarina	<i>Epicoccum</i>	Laranja/Amarelo
CM M 227	Santa Catarina	<i>Epicoccum</i>	Laranja/Amarelo
CM M 228	Santa Catarina	<i>Epicoccum</i>	Laranja/Amarelo
CM M 230	São Paulo	Não identificados	Cinza
CM M 233	São Paulo	Não identificados	Cinza
CM M 235	São Paulo	Não identificados	Cinza
CM M 238	São Paulo	Não identificados	Cinza

A partir do isolamento de madeira de *Pinus* spp., foram obtidos 78 isolados de fungos manchadores, tendo sido identificados 10 isolados do gênero *Epicoccum*, 13 isolados de *Fusarium*, 46 de *Lasiodiplodia*, 2 de *Paecilomyces*, 3 do gênero *Pestalotiopsis* e, 4 gêneros não foram identificados. Quanto à origem, 39 isolados são provenientes de madeiras do Estado do Paraná, 19 de Santa Catarina e 21 de São Paulo.

ANEXOS

ANEXO A –**Meios de Cultura Utilizados nos Experimentos**Meio Ágar-água acidificado (pH 4,5)

Ágar	20 g
Água destilada	1000 ml

Após autoclavado, o Ph do meio foi ajustado a 4,5, através da adição de HCl concentrado.

Meio Ágar nutriente

Ágar Nutriente	23 g
Água destilada	1000 ml

Após autoclavado, o pH do meio foi ajustado a 7,0, através da adição de NaOH 1 N.

Meio Ágar pobre em nutrientes (SNA)

Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4)	1 g
Nitrato de Potássio (KNO_3)	1 g
Sulfato de Magnésio ($MgSO_4$)	0,5 g
Cloreto de Potássio (KCl)	0,5 g
Glicose	0,2 ml
Sacarose	0,2 ml
Água destilada	1000 ml

Meio Batata dextrose ágar (BDA)

Batata	250 g
Dextrose	20 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada	1000 ml

A batata foi cozida durante 30 minutos em 1000 ml de água destilada e, após, filtrada com o auxílio de uma peneira.

Meio Líquido Batata dextrose (BD)

Batata	250 g
Dextrose	20 g
Água destilada	1000 ml

Preparado de acordo com o item anterior, sem a adição de ágar.

Meio CYA (Czapeck Yeast Extract Agar)

Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4)	1 g
Czapeck Concentrado	10 ml
Extrato de levedura	5 g
Sucrose	30 g
Ágar	15 g
Água destilada	1000 ml

Meio Extrato de malte-ágar (MEA)

Extrato de Malte	20 g
Peptona	1 g
Glucose	20 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 ml

Meio G25N (25% Glicerol Nitrato Ágar)

Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4)	0,75 g
Czapeck Concentrado	7,5 ml
Extrato de Levedura	3,7 g
Glicerol	250 ml
Ágar	12 ml
Água destilada	750 ml

Meio King B

Ágar	20 g
Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4)	2,5 g
Sulfato de Magnésio ($MgSO_4$)	6 g
Peptona	20 g
Glicerina	15 ml
Água destilada	1000 ml

Após autoclavado, o pH do meio foi ajustado a 7,2, através da adição de NaOH 1N.

Meio de Martin modificado para fungos

Ágar bacteriológico	25 g
Fosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	1 g
Peptona de caseína	15 g
Rosa de Bengala	0,033 g
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	0,5 g
Água destilada	1000 ml
Sulfato de estreptomicina	0,030 g

À 100 ml de água, foram adicionados e dissolvidos todos os reagentes acima descritos, com exceção ao sulfato de estreptomicina. Após adição do Rosa de Bengala, o meio foi acondicionado de modo a evitar a exposição a luz. Após a autoclavagem, com o meio a aproximadamente 45 °C, foi adicionado o sulfato de estreptomicina e o pH do meio ajustado a 4,7, através da adição de HCl concentrado.